**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA**

LUCIANE DO NASCIMENTO SIQUEIRA

**Fracionamento do bagaço de cana-de-açúcar com solventes apropriados
para a dissolução dos constituintes estruturais**

**Lorena - SP
2015**

LUCIANE DO NASCIMENTO SIQUEIRA

**Fracionamento do bagaço de cana-de-açúcar com solventes apropriados
para a dissolução dos constituintes estruturais**

Tese apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Conversão de Biomassa.

Orientador: Prof. Dr. Walter de Carvalho

Edição reimpressa e Corrigida

**Lorena - SP
Janeiro, 2015**

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

Catálogo na Publicação
Biblioteca “Cel. Luiz Sylvio Teixeira Leite”
Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Siqueira, Luciane do Nascimento

Fracionamento do bagaço de cana-de-açúcar com solventes apropriados para a dissolução dos constituintes estruturais. / Luciane do Nascimento Siqueira. – Ed. reimpr., corr. - 2015.

105 p.: il.

Tese (Doutor 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. 2014.

Orientador: Walter de Carvalho

1. Fracionamento do bagaço de cana-de-açúcar 2. Ácido fosfórico 3. Acetona 4. Água 5. Sacarificação enzimática 6. Fermentação alcoólica. I. Título. II. Carvalho, Walter, orient.

664.113 - CDU

*Aos meus pais Adelaide e
Edmundo, a minha irmã Juliana
e ao meu namorado Ronaldo Junior
pelo apoio e amor constantes.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, porque até aqui tem me abençoado e sustentado.

Aos meus amados pais, Edmundo e Adelaide, pelo amor incondicional, apoio constante e torcida. Eu não teria conseguido sem vocês!

A minha irmã, Juliana, pelo amor, incentivo e por sempre acreditar em mim, até mesmo quando eu não acreditava.

Ao meu namorado e futuro marido, Ronaldo Junior, pelo amor, carinho, companheirismo, compreensão, incentivo e paciência durante todos esses anos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Walter de Carvalho, pelos ensinamentos, dedicação e apoio durante o trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Adriane Ferreira Milagres, pelos ensinamentos e sugestões.

Aos meus familiares, pelo amor, apoio e companheirismo.

À minha querida Vó Irene (*in memoriam*), porque mesmo não entendendo porque eu ainda estava estudando, torcia e pedia a Deus por mim, e por tudo que representou em minha vida.

À família do Junior, a qual já me sinto fazer parte, pelo apoio, carinho e pelos momentos de descontração.

Às amigas Joseana, Débora e Fernanda, pela amizade, companheirismo e ajuda durante todos esses anos.

Aos amigos do laboratório de Microbiologia e Bioquímica, Paula, Maiara, Felipe, Germano, Celso e Guilherme pela amizade, apoio e pelos bons momentos de convivência.

Aos amigos que fiz no Debiq, para citar alguns, Naila, Rafael Candido, Orerves, Cibebe, Patrícia, Omar, Flávio, Cláudio, Rafael Castro, Túlio, Bruno, Isabela, Larissa Canilha e Prof. Ismael, por tornarem o 'café' muito mais agradável.

A todos funcionários do Debiq, em especial ao Zé Cobrinha, Zé Moreira, Isnaldi e Joel pela amizade e por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos professores do Departamento de Biotecnologia, pelos ensinamentos e colaboração.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

À EEL-USP, pela oportunidade de realizar o Doutorado.

À banca examinadora, pela disponibilidade em contribuir com a tese.

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não
seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma
como nos acostumamos a ver o mundo”.
Albert Einstein

RESUMO

SIQUEIRA, L. N. **Fracionamento do bagaço de cana-de-açúcar com solventes apropriados para a dissolução dos constituintes estruturais**. 2014. 105p. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2015.

Uma tecnologia para o fracionamento de materiais lignocelulósicos, baseada no uso de solventes apropriados, foi proposta para separar os principais componentes (celulose, hemicelulose e lignina). De acordo com a técnica, é adicionado ao material um solvente para celulose (ácido fosfórico concentrado); então, acetona é adicionada para promover a precipitação da celulose na forma amorfa. As etapas subsequentes são as seguintes: uma primeira extração com acetona para remover a lignina; e uma segunda extração com água, para remover a hemicelulose. Estudos aplicando o fracionamento, denominado "COSLIF" ("*cellulose solvent and organic solvent based lignocellulose fractionation*"), em diferentes materiais demonstraram altas taxas e rendimentos de hidrólise da celulose em presença de baixas cargas enzimáticas. Neste contexto, o objetivo do trabalho foi definir condições apropriadas para fracionar o bagaço de cana-de-açúcar usando o fracionamento COSLIF, com vistas à produção de etanol de 2ª geração. Para otimização das condições de fracionamento, foi realizado um planejamento fatorial 2^5 , com as seguintes variáveis: concentração de ácido fosfórico (81-85 %), temperatura (40-60 °C), tempo (30-120 min), volume de acetona (80-120 mL) e volume de água (120-160 mL), determinando, a partir da composição das frações geradas, parâmetros relacionados à recuperação e seletividade do fracionamento. Apesar de grande variabilidade experimental, conseguiu-se definir a condição ótima por meio de análise estatística, para o fracionamento de 1 g de bagaço (massa seca): ácido fosfórico (83,8 %), temperatura (45,8 °C), tempo (56,1 min), volume de acetona (91,6 mL) e volume de água (131,6 mL). Esta condição, reproduzida em escala ampliada, foi eficaz na amorfização da celulose e na separação da hemicelulose no extrato aquoso. O rendimento global ($R_{G+X(S+L)}$) obtido foi de 87,1%; o rendimento de recuperação de glucana na fração sólida ($R_{G(S)}$) foi de 84,6%; e o rendimento de recuperação de xilana na fração líquida ($R_{X(L)}$) foi de 61,0%. Em relação à seletividade de recuperação de glucana na fração sólida ($S_{G(S)}$) foi obtido 95,3%; e à seletividade de recuperação de xilana na fração líquida ($S_{X(L)}$), foi obtido 72,7%. A análise estrutural da fração sólida, por meio de difração de raios-X e termoporometria, demonstrou que a tecnologia consegue romper a estrutura do material, diminuindo a cristalinidade e aumentando a porosidade. O índice de cristalinidade, que no bagaço "*in natura*" era de 44%, foi reduzido para 0; a área superficial cumulativa para moléculas com diâmetros de até 10 nm, que no bagaço "*in natura*", era de 43 m²/g, foi aumentada para 166 m²/g. Aliada à remoção de hemicelulose, tais alterações proporcionaram elevada eficiência de sacarificação da glucana em glicose; 93%, em 24 horas de hidrólise. O hidrolisado enzimático foi fermentado por *Scheffersomyces stipitis*, com produção de 10,5 g/L de etanol em 48 horas de fermentação; o rendimento de conversão de glicose em etanol ($Y_{P/S}$) foi de 0,36 g/g, com produtividade volumétrica (Q_P) de 0,22 g/Lh.

Palavras-chave: Bagaço de cana-de-açúcar; Fracionamento; Ácido fosfórico; Acetona; Água; Sacarificação enzimática; Fermentação alcoólica.

ABSTRACT

SIQUEIRA, L. N. **Fractionation of sugarcane bagasse with solvents that promote the dissolution of structural constituents**. 2014. 105p. Thesis (Doctor of Science) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2015.

A technology for fractionating lignocellulosic materials, based on the use of suitable solvents, was proposed to separate the main components (cellulose, hemicellulose and lignin). According to the technique, a solvent for cellulose (concentrated phosphoric acid) is added to the material; then, acetone is added to promote precipitation of the cellulose in an amorphous form. The subsequent steps are as follows: a first extraction with acetone, to remove lignin; and a second extraction with water, to remove hemicellulose. Studies applying the fractionation, called "COSLIF" (*"cellulose solvent and organic solvent based lignocellulose fractionation"*), to different materials demonstrated the high rates and yields of cellulose hydrolysis in the presence of low enzymes loadings. In this context, the objective of the present study was to define appropriate conditions to fractionate the sugarcane bagasse of using the COSLIF procedure, aiming the production of 2nd generation ethanol. To optimize the conditions of fractionation, we performed a 2⁵ factorial design, with the following variables: concentration of phosphoric acid (81-85%), temperature (40-60° C), time (30-120 min), volume of acetone (80-120 mL) and volume of water (120-160 mL), determining, from the composition of the generated fractions, the parameters of recovery and selectivity. Despite of high experimental variability, it was possible to define optimum condition, by means of statistical analysis, for the fractionation of 1 g of bagasse (dry weight): phosphoric acid (83,8%), temperature (45,8° C), time (56,1 min), volume of acetone (91,6 mL) and volume of water (131,6 mL). This condition, reproduced at a larger scale, was effective in the amorphization of cellulose and in the separation of hemicellulose in the aqueous extract. The overall yield ($R_G + X_{(S+L)}$) was 87,1%. The recovery yield of glucan in the solid fraction ($G_{R(S)}$) was 84,6%; and the recovery yield of xylan in the liquid fraction ($R_{X(L)}$) was 61,0%. The selectivity of glucan recovery in the solid fraction ($S_{G(S)}$) was 95,3%; the selectivity of xylan recovery in the liquid fraction ($S_{X(G)}$) was 72,7%. The structural analysis of the solid fraction, by means of X-ray diffraction and thermoporometry, demonstrated that the technology can disrupt the structure of the material, decreasing the crystallinity and increasing the porosity. The index of crystallinity, which in the "in natura" bagasse was 44%, was reduced to 0; the surface area cumulative to molecules with diameters up to 10 nm, which in the "in natura" bagasse was 43 m²/g, was increased to 166 m²/g. Coupled with the removal of hemicellulose, such changes provided high efficiency of saccharification of glucan into glucose; 93% in 24 hours of hydrolysis. The enzymatic hydrolyzate was fermented by *Scheffersomyces stipitis*, producing 10,5 g/L ethanol in 48 hours of fermentation; the conversion efficiency of glucose into ethanol ($Y_{P/S}$) was 0,36 g/g, and the volumetric productivity (Q_P) was 0,22 g/Lhr.

Keywords: Sugarcane bagasse; Fractionation; Phosphoric acid; Acetone; Water; Enzymatic saccharification; Alcoholic fermentation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura e composição da parede celular vegetal de madeira.....	20
Figura 2- Modelo da estrutura para a celulose.....	21
Figura 3- Estrutura da celulose.....	22
Figura 4- Monossacarídeos constituintes das hemiceluloses.....	23
Figura 5- Representação da estrutura de uma arabinometilglucuronoxilana.....	23
Figura 6- Unidades fenilpropano precursoras da lignina.....	24
Figura 7- Perfil da hidrólise enzimática da celulose de bambu pré-tratado por COSLIF.....	31
Figura 8- Microscopia eletrônica de varredura de palha de milho.....	32
Figura 9- Superfície de resposta mostrando a eficiência de sacarificação enzimática de glucana.....	32
Figura 10- Perfil da hidrólise enzimática da celulose de bagaço de cana, palha de trigo, e palha de arroz pré-tratados por COSLIF.....	34
Figura 11- Esquema que mostra produtos gerados em uma biorrefinaria que utiliza materiais lignocelulósicos como matéria-prima, e respectivos usos.....	36
Figura 12- Fluxograma da metodologia empregada para análise composicional do bagaço de cana-de-açúcar.....	40
Figura 13- Detalhamento do procedimento de fracionamento COSLIF aplicado ao bagaço de cana-de-açúcar.....	43
Figura 14- Distribuição granulométrica do bagaço de cana-de-açúcar integral.....	55
Figura 15- Distribuição granulométrica do bagaço classificado.....	56
Figura 16- Amplitude dos valores de rendimento de recuperação.....	60
Figura 17- Amplitude dos valores de concentração de glicose e xilose.....	61
Figura 18- Amplitude dos valores de seletividade do fracionamento.....	62
Figura 19- Amplitude dos valores de pureza.....	63
Figura 20- Gráfico de superfície de resposta que relaciona o valor de $R_G + X(S + L)$ em função da concentração de ácido e da temperatura.....	66
Figura 21- Gráfico de superfície de resposta que relaciona o valor de $R_X(S + L)$ em função da concentração de ácido e temperatura, da concentração de ácido e tempo, e do tempo e temperatura.....	69

Figura 22- Gráfico de superfície de resposta que relaciona $R_{G(S+L)}$ em função da concentração de ácido e volume de água.....	72
Figura 23- Gráfico de superfície de resposta que relaciona o valor de $C_{G+X(L)}$ em função da concentração de ácido e da temperatura.....	75
Figura 24- Perfis de difração de raios-X determinados para o bagaço de cana-de-açúcar in natura e para as frações sólidas obtidas após o fracionamento.....	76
Figura 25- Valores de $R_{G+X(S+L)}$, $R_{G(S+L)}$ e $R_{X(S+L)}$ determinados para os experimentos do ponto central do planejamento.....	80
Figura 26- Valores de $R_{G+X(S+L)}$ obtidos na condição 26 do planejamento.....	82
Figura 27- Valores de $R_{X(S+L)}$ obtidos na condição 2 do planejamento.....	82
Figura 28- Valores de $R_{G(S+L)}$ obtidos nos experimentos de reprodutibilidade.....	83
Figura 29- Amostras úmidas e secas das frações sólidas obtidas ao final dos fracionamentos.....	84
Figura 30- Fluxograma ilustrando as principais etapas do fracionamento em escala ampliada.....	85
Figura 31- Composição química do bagaço de cana-de-açúcar 'in natura' e da fração sólida obtida após o fracionamento.....	86
Figura 32- Remoção dos componentes com o fracionamento.....	86
Figura 33- Composição química dos líquidos obtidos após a precipitação, após a extração com acetona e após a extração com água.....	87
Figura 34- Composição química dos líquidos obtidos após a precipitação, após a extração com acetona e após a extração com água.....	87
Figura 35- Balanço de massa do bagaço 'in natura' e das frações sólidas I, II e III.....	89
Figura 36- Balanço de massa das frações líquidas I, II e III.....	89
Figura 37 - Cristalinidade do bagaço de cana-de-açúcar antes e após o fracionamento.....	90
Figura 38- Perfis das concentrações de glicose e xilose e das eficiências de sacarificação da glucana e da xilana contidas na fração sólida III.....	91
Figura 39- Perfis das concentrações de glicose e xilose e das eficiências de sacarificação da glucana e da xilana contidas no bagaço 'in natura'.....	91
Figura 40- Concentrações de substrato (glicose) e produto (etanol) determinadas durante a fermentação alcoólica.....	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composição química de diferentes bagaços de cana-de-açúcar.....	26
Tabela 2- Compilação de resultados de estudos envolvendo o fracionamento COSLIF de diferentes materiais lignocelulósicos.....	28
Tabela 3- Valores reais e codificados do planejamento.....	45
Tabela 4- Composição química do bagaço de cana <i>in natura</i>	57
Tabela 5- Compilação dos valores das variáveis-resposta determinadas para os experimentos do planejamento.....	58
Tabela 6- Valores dos coeficientes de regressão do modelo usado para a predição do rendimento global.....	64
Tabela 7- Análise de variância do modelo proposto para a predição do rendimento global após o fracionamento.....	64
Tabela 8- Comparação entre os valores obtidos experimentalmente (reais) e aqueles determinados utilizando o modelo ajustado aos dados experimentais (preditos).....	65
Tabela 9- Valores dos coeficientes de regressão usado para a predição do $R_{X(S+L)}$	66
Tabela 10- Análise de variância do modelo proposto para a predição do $R_{X(S+L)}$	67
Tabela 11- Comparação entre os valores obtidos experimentalmente (reais) e aqueles determinados utilizando o modelo ajustado aos dados experimentais (preditos).....	68
Tabela 12- Valores dos coeficientes de regressão do modelo usado para a predição do $R_{G(S+L)}$	70
Tabela 13- Análise de variância do modelo proposto para a predição do $R_{G(S+L)}$	70
Tabela 14- Comparação entre os valores obtidos experimentalmente (reais) e aqueles determinados utilizando o modelo ajustado aos dados experimentais (preditos) para o rendimento de glucana nas frações sólida e líquida.....	71
Tabela 15 - Valores dos coeficientes de regressão do modelo usado para a predição da concentração de açúcares no líquido.....	72
Tabela 16- Análise de variância do modelo proposto para a predição da concentração de açúcares no líquido.....	73
Tabela 17- Comparação entre os valores obtidos experimentalmente (reais) e aqueles determinados utilizando o modelo ajustado aos dados experimentais (preditos), para a concentração de açúcares.....	74
Tabela 18- Variáveis-resposta determinadas para os experimentos do ponto central e para as triplicatas dos experimentos 2, 16 e 26.....	79

Tabela 19- Compilação dos valores das variáveis-resposta determinadas para os experimentos de ampliação de escala.....88

Tabela 20- Parâmetros da conversão de açúcares em etanol por diferentes estirpes de *Scheffersomyces stipitis*.....94

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1. Estrutura e composição da parede celular vegetal	19
2.1.1. Celulose	21
2.1.2. Hemicelulose	22
2.1.3. Lignina	24
2.1.4. Demais componentes	25
2.2. Colmo de cana-de-açúcar, Folha e Bagaço de cana-de-açúcar.....	25
2.3. Fracionamento COSLIF.....	26
2.4. Biorrefinarias	36
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.1. Bagaço de cana-de-açúcar	39
3.1.1. Caracterização granulométrica do bagaço de cana-de-açúcar.....	39
3.1.2. Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar.....	39
3.2. Fracionamento do bagaço de cana-de-açúcar	42
3.2.1. Composição química da fração sólida.....	47
3.2.2. Composição química da fração líquida.....	47
3.2.3. Variáveis-resposta do planejamento experimental.....	48
3.2.4. Análise estatística dos resultados.....	51
3.2.5. Caracterização de amostras selecionadas por difração de raios-X	52
3.3. Análise da variabilidade experimental.....	52
3.4. Fracionamento do bagaço de cana-de-açúcar em escala ampliada.....	52
3.4.1. Caracterização ultraestrutural	53
3.4.2. Sacarificação enzimática.....	53
3.4.3. Fermentação alcoólica	53
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1. Bagaço de cana-de-açúcar	55
4.1.1. Granulometria do bagaço de cana-de-açúcar.....	55
4.1.2. Composição química do bagaço de cana-de-açúcar	56
4.2. Fracionamento do bagaço de cana-de-açúcar	57
4.2.1. Compilação dos resultados	57

4.2.2. Análise estatística.....	63
4.2.3. Caracterização de amostras selecionadas por difração de raios-X	75
4.2.4. Interpretação dos resultados.....	76
4.3. Análise da variabilidade experimental	78
4.4. Fracionamento do bagaço de cana-de-açúcar em escala ampliada	85
4.4.1. Composição das frações.....	86
4.4.2. Parâmetros do fracionamento.....	88
4.4.3. Caracterização ultraestrutural.....	89
4.4.4. Sacarificação enzimática.....	90
4.4.5. Interpretação dos resultados.....	92
4.4.6. Fermentação alcoólica.....	93
5. CONCLUSÕES.....	966
REFERÊNCIAS.....	977
APÊNDICE.....	104

1. INTRODUÇÃO

Grandes investimentos em pesquisa vêm sendo realizados para o desenvolvimento de fontes renováveis de energia, já que a grande demanda por combustíveis causou decréscimo nas reservas petrolíferas e aumento na emissão de gases do efeito estufa.

Os combustíveis derivados da biomassa vegetal, como o etanol, oferecem uma alternativa renovável aos combustíveis fósseis derivados do petróleo.

No Brasil, a produção de etanol é realizada pelo processo de fermentação alcoólica de açúcares hexoses, por leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. A matéria-prima utilizada na produção deste biocombustível é o caldo de cana-de-açúcar, obtido da cana-de-açúcar.

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, com área cultivada estimada em 9.098 mil hectares. Em média, 53,91% da cana-de-açúcar produzida no Brasil será destinada à produção de álcool e 46,09% para produção de açúcar, segundo estimativa da CONAB para a safra 2014/2015 (CONAB, 2014).

Após a extração do caldo da cana-de-açúcar, é gerado o bagaço da cana-de-açúcar, um material lignocelulósico constituído por celulose, hemicelulose e lignina, além de pequenas quantidades de cinzas e extrativos. Este material constitui-se em um dos principais subprodutos da indústria sucroalcooleira.

Além dos açúcares contidos no caldo da cana-de-açúcar, os açúcares derivados da celulose (glicose) e da hemicelulose (xilose, arabinose, glicose, manose e galactose) do bagaço da cana-de-açúcar também poderiam ser utilizados como substratos para a produção de etanol, permitindo às usinas aumentar sua capacidade de produção, sem, contudo, aumentar a área de plantio utilizada para o cultivo desta gramínea. Entretanto, os açúcares do bagaço da cana-de-açúcar encontram-se na forma de polímeros (celulose e hemicelulose) associados entre si e recobertos por uma macromolécula aromática complexa (lignina), formando uma estrutura recalcitrante difícil de ser desestruturada e convertida em monossacarídeos fermentescíveis.

Recentemente, uma nova tecnologia de fracionamento de materiais lignocelulósicos, baseada na utilização de solventes (COSLIF – Cellulose solvent and organic solvent based lignocellulose fractionation), foi proposta para separar os principais componentes dos materiais lignocelulósicos (celulose, hemicelulose e lignina), sob condições moderadas de reação.

De acordo com a técnica, um solvente para celulose (ácido fosfórico concentrado) é adicionado ao material. Em seguida, adiciona-se acetona para promover a reprecipitação da celulose em uma forma amorfa. Os passos subsequentes são usados para fracionar a biomassa: uma primeira extração com acetona, para remoção da lignina; e uma segunda extração com água, para remoção da hemicelulose.

Estudos aplicando o fracionamento COSLIF a diferentes matérias-primas têm apresentado altas taxas e rendimentos de hidrólise da celulose em presença de baixas cargas de enzimas. A alta seletividade e o alto rendimento observados no fracionamento têm servido de base inclusive para propor a utilização, tanto dos açúcares como da lignina, como precursores na síntese de produtos com maior valor agregado.

Neste contexto, o presente estudo propõe definir condições adequadas de fracionamento do bagaço de cana-de-açúcar empregando a tecnologia COSLIF, visando à produção de etanol a partir dos açúcares derivados da celulose e da hemicelulose.

Como metas: definir condições adequadas para fracionar os principais constituintes do bagaço de cana-de-açúcar (celulose, hemicelulose e lignina) com alto rendimento e alta seletividade; ampliar a escala do fracionamento, com vistas à realização de estudos subsequentes de sacarificação enzimática e fermentação alcoólica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Estrutura e composição da parede celular vegetal

A estrutura e a composição dos materiais lignocelulósicos variam grandemente, dependendo do tecido e do estágio de desenvolvimento do vegetal (MAZIERO et al., 2013).

Em uma parede celular vegetal genérica (Figura 1), as cadeias de celulose encontram-se na forma de fibrilas elementares, que se associam fortemente à hemicelulose e lignina para formar as microfibrilas (ZHANG; LYND, 2004). Cada célula é constituída por uma parede primária fina, inicialmente depositada durante o crescimento das células, que circunda uma parede secundária. Em madeiras, a parede secundária é constituída por três camadas (S1, S2 e S3). Essas camadas são compostas predominantemente por celulose, com espessura variável de acordo com o tipo de célula (FENGEL; WEGENER, 1989). As células encontram-se separadas pela lamela média, que é uma camada fina com elevada concentração de lignina (FENGEL; WEGENER, 1989).

Figura 1 - Estrutura e composição da parede celular vegetal de madeira.

Fonte: Adaptado de Silva et al., (2009).

Para a análise estrutural da parede celular, tem-se utilizado a microscopia de força atômica (AFM), entre outras técnicas de análise. Ding e Himmel (2006), utilizando esta técnica, conseguiram captar imagens da parede celular primária, e propuseram um modelo de biossíntese das fibrilas elementares de celulose, sendo estas sintetizadas a partir de rosetas hexagonais contendo 36 cadeias de glucana (Figura 2).

Figura 2 - Modelo da estrutura para a celulose: fibrila elementar (A e B); microfibrila (C); microfibrila (D e E).

Fonte: Adaptado de Ding; Himmel, (2006).

2.1.1. Celulose

A celulose é o polímero natural mais abundante encontrado no planeta terra e sua biossíntese anual é estimada entre 10^{10} e 10^{11} toneladas (SAMIR; ALLOIN; DUFRESNE, 2005). Como o principal constituinte da biomassa vegetal, a celulose é encontrada na

parede celular de vegetais. Entretanto, a celulose também pode ser sintetizada por alguns animais (tunicados, por exemplo), bactérias (LYND et al., 2002) e algas (SUGIYAMA; VUONG; CHANZY, 1991).

De estrutura homopolissacarídica e não ramificada, a molécula de celulose é constituída exclusivamente por monômeros de D-glicose. A unidade estrutural repetitiva é composta por duas moléculas de glicose eterificadas por ligações β -(1-4) glicosídicas (Figura 3), ou seja, por unidades consecutivas de celobiose (FENGEL; WEGENER, 1989).

Figura 3 - Estrutura da celulose, formada por unidades consecutivas de celobiose.

Fonte: Fengel; Wegener, (1989).

A celulose apresenta regiões altamente ordenadas (regiões cristalinas), estabilizadas por muitas pontes de hidrogênio intra e intermoleculares, e regiões menos ordenadas ou amorfas (FAN et al., 1987). A cristalinidade é normalmente expressa em porcentagem, através do índice de cristalinidade, que varia de acordo com a origem do material e com o método de análise (ZHANG; LYND, 2004).

2.1.2. Hemicelulose

A hemicelulose é considerada o segundo composto orgânico mais abundante, estando presente em todas as camadas da parede celular dos vegetais em associação com a celulose e a lignina (BISARIA; GHOSE, 1981).

Trata-se de um heteropolissacarídeo complexo, composto por pentoses (D-xilose e L-arabinose) e hexoses (D-glicose, D-galactose e D-manose), ácido D-glucurônico, ácido 4-O-metil-glucurônico e grupos acetila (Figura 4). Altamente ramificada e amorfa, esta fração é geralmente mais reativa do que a celulose (FENGEL; WEGENER, 1989).

Figura 4 - Monossacarídeos constituintes das hemiceluloses: D-glicose (1), D-galactose (2), L-arabinose (3), D-xilose (4), D-manose (5), ácido 4-O-metil-D-glucurônico (6), L-ramnose (7).

Fonte: Adaptado de Pitarelo, (2007).

A Figura 5 apresenta a estrutura simplificada da hemicelulose de gramíneas (arabinometilglucuronoxilana acetilada), caracterizada pela presença de arabinoxilanas.

Figura 5 - Representação da estrutura de uma arabinometilglucuronoxilana.

Fonte: Adaptado de Ek; Gellerstedt; Henriksson, (2009).

Independente da região do vegetal em que a hemicelulose esteja localizada, existem as interações entre os componentes estruturais, principalmente com as fibrilas elementares de celulose, outros polissacarídeos não celulósicos e, na maioria dos casos, com a molécula de lignina. As ligações não-covalentes entre as cadeias de xilana e outros polissacarídeos envolvem basicamente as pontes de hidrogênio; porém, ligações covalentes também são responsáveis por conectar hemicelulose e lignina e alguns ácidos fenólicos (JOSELEAU; COMTAT; RUEL, 1992).

As ramificações da cadeia principal determinam a solubilidade e a interação da molécula com os demais componentes lignocelulósicos, e influenciam no modo e na extensão da hidrólise enzimática (KULKARNI; SHENDYE; RAO, 1999).

2.1.3. Lignina

A lignina corresponde à fração não polissacarídica mais abundante presente nos materiais lignocelulósicos. Com grande complexidade molecular, a lignina é sintetizada por via radicalar, a partir de três alcoóis *p*-hidróxi-cinâmílicos precursores: álcool *p*-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico (Figura 6). De acordo com o grau de metoxilação do anel aromático, a unidade básica é dita do tipo H ou *p*-hidroxi-fenil (não metoxilada, derivada do álcool *p*-cumarílico), do tipo G ou guaiacil (com uma metoxila, derivada do álcool coniferílico) ou do tipo S ou siringil (com duas metoxilas, derivada do álcool sinapílico) (FENGEL; WEGENER, 1989).

A proporção encontrada entre as unidades constituintes da lignina varia de acordo com a espécie vegetal. Esta diversidade tem sido utilizada até para fins taxonômicos. As ligninas oriundas de madeiras de coníferas são ricas em unidades guaiacil, sendo denominadas de ligninas tipo G. Já as ligninas de folhosas apresentam maior proporção de unidades siringil, sendo denominadas de ligninas tipo GS. As ligninas de gramíneas possuem quantidades significativas dos três tipos de precursores – denominadas ligninas do tipo HGS (CARVALHO et al., 2009; RAMOS, 2003).

Figura 6 - Unidades fenilpropano precursoras da lignina. (I) Álcool *p*-cumarílico; (II) Álcool coniferílico; (III) Álcool sinapílico.

Fonte: Fengel e Wegener, (1989).

A lignina é muito importante para os vegetais, já que envolve as microfibrilas celulósicas, conferindo proteção contra a degradação química e/ou biológica, além de prover suporte estrutural e impermeabilidade, evitando o colapso dos vasos condutores (FENGEL; WEGENER, 1989).

2.1.4. Demais componentes

Os demais componentes presentes na biomassa lignocelulósica incluem uma variedade de compostos orgânicos cuja presença é influenciada por vários fatores, entre os quais os de natureza genética e ambiental. Esses componentes dividem-se, basicamente, em duas classes: a primeira engloba materiais conhecidos como extrativos, por serem solúveis em água, solventes orgânicos neutros, ou volatilizados a vapor; a segunda, materiais que não são extraíveis com os solventes mencionados, como por exemplo, alguns compostos inorgânicos (cinzas) e proteínas (RAMOS, 2003). A soma destes componentes pode representar entre 5 e 20% de todo o material (FENGEL; WEGENER, 1989).

Tais constituintes são frequentemente responsáveis por características como cor, cheiro, resistência natural ao apodrecimento e propriedades abrasivas (D' ALMEIDA, 1988).

2.2. Colmo, Folha e Bagaço de cana-de-açúcar

A análise morfológica das células que compõem o colmo da cana-de-açúcar revela fibras abundantes próximas da casca, chamada de córtex, na forma de feixes fibrovasculares, além das células de parênquima que estocam sacarose e predominam no interior do colmo, chamado de medula. Há, entretanto, fibras, vasos e parênquima distribuídos em todo o entrenó (SANJUAN et al., 2001).

A análise química das frações supramencionadas mostra diferenças significativas; por exemplo, os conteúdos de cinzas e de extrativos da medula são bem maiores que os do córtex (SANJUAN et al., 2001).

Recentemente, Souza et al. (2013) estudaram a estrutura e composição da parede celular de folhas e colmos de cana-de-açúcar imaturas, tendo verificado poucas diferenças na composição das paredes celulares; que, entretanto, se mostraram constituídas por diferentes tipos de hemicelulose, demandando a utilização de diferentes enzimas para a sacarificação dos polissacarídeos constituintes.

O bagaço de cana-de-açúcar, obtido após a moagem dos colmos para extração do caldo rico em açúcares fermentescíveis, é o principal subproduto gerado pela indústria sucroalcooleira (PANDEY et al., 2000). Conforme pode ser observado na Tabela 1, a composição química do bagaço de cana-de-açúcar também é variável.

Tabela 1 - Composição química de diferentes bagaços de cana-de-açúcar

	Milne et al., 1992	Seabra et al., 2010	Templeton et al., 2010	Canilha et al., 2011
Glucana (%)	38,60	39,50	39,00	44,90
Xilana (%)	20,40	21,90	21,80	22,20
Arabinana (%)	1,70	1,80	1,80	1,10
Galactana (%)	0,60	0,70	0,80	-
Acetil (%)	-	3,40	3,30	2,60
Lignina (%)	23,10	25,10	24,80	19,30
Cinzas totais (%)	4,00	2,20	3,90	1,40
Extrativos (%)	4,40	4,60	5,70	8,50

- = não foi quantificado.

Em função de sua estrutura e composição, o bagaço de cana-de-açúcar não é um material propício à degradação enzimática (MENDES et al., 2011). Como ocorre também para os demais materiais lignocelulósicos, a hidrólise enzimática de seus polissacarídeos constituintes é limitada pela baixa acessibilidade das fibrilas celulósicas, que restringe a ação das celulasas, e pela presença de hemicelulose e lignina na superfície destas, que impede o acesso das enzimas aos substratos (KIM; HOLTZAPPLE, 2006; ZHANG et al., 2007; ZHANG, 2008).

De fato, os fatores que afetam a hidrólise enzimática da biomassa são influenciados por propriedades físicas e químicas dos substratos. Essas propriedades podem estar relacionadas com a própria fibrila elementar de celulose (cristalinidade e grau de polimerização) e com o material como um todo (conteúdo e distribuição de lignina e hemicelulose, tamanho e distribuição de poros e área superficial específica). Entretanto, nenhum destes fatores isoladamente é capaz de explicar a recalcitrância de materiais lignocelulósicos à hidrólise enzimática (ESTEGHLALIAN; MANSFIELD; SADDLER, 2002).

2.3. Fracionamento COSLIF

O desenvolvimento de um pré-tratamento de lignocelulósicos em condições brandas de reação é almejado não somente por diminuir o custo do processo e o investimento inicial de capital, como também por reduzir a degradação de açúcares e a formação de inibidores (McMILLAN, 1994).

A tecnologia de fracionamento COSLIF, baseada na utilização de solventes sob condições moderadas de reação, foi desenvolvida para separar os componentes

lignocelulósicos em celulose amorfa, hemicelulose, lignina e ácido acético (ZHANG et al., 2007; MOXLEY et al, 2008; SATHITSUKSANOH et al., 2009).

COSLIF é um método que combina o solvente não volátil para a celulose (ácido fosfórico), um segundo solvente orgânico altamente volátil (acetona) e água para separar os componentes lignocelulósicos, com reciclagem dos dois primeiros solventes (ZHANG et al., 2007).

O ácido fosfórico concentrado rompe o complexo lignina-carboidrato, dissolve as fibrilas de celulose e hemicelulose, hidrolisa a celulose e hemicelulose a fragmentos com baixo grau de polimerização, e remove grupos acetil da hemicelulose para formar ácido acético (ZHANG et al., 2007). A acetona precipita a celulose e hemicelulose, dissolvidas previamente pelo H_3PO_4 , e dissolve parte da lignina. A extração subsequente com acetona é realizada para retirar a lignina solúvel residual e remover o ácido fosfórico residual do precipitado sólido. Finalmente, água é utilizada para a extração da hemicelulose e remoção da acetona residual (ZHANG et al., 2007).

O ácido fosfórico concentrado é um solvente para celulose com grande potencial para aplicação em biorrefinarias, porque tem menor custo se comparado com líquidos iônicos, é compatível com água, apresenta capacidade de dissolução de celulose em baixa temperatura, não é volátil, apresenta estabilidade química e é de fácil reciclagem (MOXLEY et al, 2008).

Estudos sugerem que a concentração do ácido fosfórico é o fator mais importante para o adequado condicionamento do material visando à hidrólise enzimática subsequente. Zhang et al. (2006), por exemplo, estudaram a dissolução de celulose microcristalina (Avicel) e de papel de filtro, e observaram que a concentração do ácido fosfórico, quando acima de 83%, foi capaz de dissolver os dois materiais.

A Tabela 2 compila resultados de estudos envolvendo o fracionamento COSLIF de diferentes materiais lignocelulósicos, reportados pelo grupo do Dr. Y. H. Percival Zhang, idealizador da tecnologia, incluindo os rendimentos e seletividades alcançados para o fracionamento de glucana e xilana, e para a sacarificação enzimática de glucana.

Tabela 2 - Compilação de resultados de estudos envolvendo o fracionamento COSLIF de diferentes materiais lignocelulósicos

	Zhang, 2007	Moxley, 2008	Sathitsuksanoh, 2009	Sathitsuksanoh, 2010	Sathitsuksanoh, 2012a
MP	Palha de milho	Fibras de cânhamo	Junco	Bambu	'Miscanthus'/Álamo
CA	84%	84%	85%	85%	85%
T	50°C	50°C	50°C	50°C	50°C
t	45 min	60 min	60 min	60 min	60 min
SO	acetona	Acetona	etanol (95% v/v)	etanol (95% v/v)	etanol (95% v/v)
VSO _{PPT}	20 mL de acetona	30 mL de acetona	20 mL de etanol	20 mL de etanol	20 mL de etanol
VSO _{EXT}	120 mL de acetona	80 mL de acetona	40 mL de etanol	40 mL de etanol	40 mL de etanol
V _{H2O}	120 mL de água	160 mL de água	80 ml de água	80 ml de água	80 mL de água
R _{G + X (S + L)}	94,30%	92,90%	94,70%	96,90%	95,50%
R _{G (S + L)}	97,60%	92,70%	97,40%	98,40%	98,30%
R _{X (S + L)}	88,40%	93,30%	89,70%	92,70%	87,40%
S _{G (S)}	95,10%	100%	96,10%	95,50%	86,60%
S _{X (L)}	80,20%	49,50%	61,20%	69,10%	75,20%
$\eta_{G \rightarrow g}$	96 - 97 % / 24 h / 15 FPU	96 % / 24 h / 15 FPU	94 % / 24 h / 15 FPU	92 % / 24 h / 15 FPU	94,6 % / 24 h / 15 FPU

*MP = matéria-prima; CA = concentração do ácido fosfórico; T= temperatura de reação; t = tempo de reação; SO = solvente orgânico; VSO_{PPT} = volume de solvente orgânico utilizado na precipitação; VSO_{EXT} = volume de solvente orgânico utilizado na extração; V_{H2O} = volume de água utilizado na extração; rendimentos (R) e seletividades (S) do fracionamento, calculados conforme descrito no item 3.2.3; $\eta_{G \rightarrow g}$ = eficiência da hidrólise enzimática de glucana à glicose, com os respectivos tempos e cargas enzimáticas utilizados na sacarificação.

Inicialmente, o fracionamento COSLIF foi testado em algumas matérias-primas visando à sacarificação enzimática dos polissacarídeos constituintes, das quais Avicel (celulose microcristalina) e α -celulose (96% de celulose e 4% de hemicelulose) foram convertidos completamente a açúcares solúveis em 3 h, mostrando que a celulose com alto grau de pureza pode ser hidrolisada muito rápida e eficientemente. Para celulose de gramíneas (palha de milho e 'switchgrass') e de folhosas (álamo híbrido), as amostras pré-tratadas foram hidrolisadas com rendimentos de 94% em 12 h e de 96-97% em 24 h. As taxas e rendimentos de hidrólise foram as mais altas encontradas na literatura, evidenciando que a tecnologia foi eficaz na superação das duas principais causas da recalcitrância de materiais lignocelulósicos: baixa acessibilidade da celulose cristalina e presença de lignina e hemicelulose na superfície das fibrilas de celulose. A tecnologia de fracionamento atuou via rompimento da estrutura cristalina da celulose, aliado à remoção de lignina e hemicelulose das faces reativas da celulose (ZHANG et al., 2007).

Moxley et al. (2008) investigaram o efeito das condições de pré-tratamento COSLIF (concentração do ácido, tempo de reação e temperatura de reação) sobre a digestibilidade enzimática da celulose em fibras de cânhamo. As concentrações de H_3PO_4 testadas foram 76, 81, 84 e 85,9%. Para concentrações maiores que 81%, a amostra apresentou rápida hidrólise e alta digestibilidade. Nenhuma diferença significativa foi observada para 84 e 85,9%. Foi testado o efeito de diferentes tempos de reação (30 a 120 min) na digestibilidade da glucana, com a concentração do ácido fosfórico mantida em 84%. Amostras tratadas por 60 e 120 min não apresentaram diferença significativa quanto à digestibilidade (96%). Com 30 minutos de reação, a digestibilidade foi muito menor, de apenas 64%. A temperatura de reação foi investigada utilizando ácido fosfórico a 84% e tempo de 60 min, tendo sido verificado que altas temperaturas dissolvem a celulose rapidamente; mas podem resultar em degradação de açúcar, além do maior consumo energético. Houve um incremento na digestibilidade enzimática quando a temperatura aumentou de 40 para 50°C; entretanto, não houve nenhum incremento à 60°C. Portanto, a melhor condição testada de pré-tratamento para fibra de cânhamo foi com ácido fosfórico a 84%, 50°C por 60 min (MOXLEY et al., 2008).

Sathitsuksanoh et al. (2009) aplicaram a tecnologia COSLIF no fracionamento de junco, variando algumas condições de pré-tratamento e utilizando etanol como solvente orgânico, para redução de custos operacionais e de investimento em capital necessário para a reciclagem do solvente. As condições de reação analisadas foram teor de umidade da biomassa (5, 10 e 15%), temperatura da reação (40, 50 e 60°C) e tempo de reação (30, 60 e 90 min), as quais foram otimizadas pela metodologia de análise de

superfícies de resposta. As condições otimizadas, definidas após a análise estatística dos resultados, foram 50 °C e 60 min, na presença de ácido fosfórico a 85%, independente do teor de umidade da amostra. A digestibilidade de glucana (94%) em presença da maior carga enzimática utilizada (15 FPU de celulase e 30 unidades de β -glicosidase por grama de glucana) foi ligeiramente menor do que os resultados prévios (96 – 97%) para palha de milho, 'switchgrass', álamo híbrido e fibra de cânhamo. A pequena diferença foi atribuída à remoção menos eficiente de lignina no pré-tratamento, provavelmente pela redução do volume de solvente orgânico (de 80 para 40 mL) usado na 1ª etapa de extração. A mudança do solvente orgânico para etanol trouxe vantagens, porque o etanol é quimicamente mais estável do que a acetona e pode ser recuperado depois da fermentação alcoólica, ao fim do processo de conversão microbiológica.

Sathitsuksanoh et al. (2010) aplicaram a tecnologia COSLIF modificada (utilização de etanol como solvente orgânico) em bambu (ácido fosfórico a 85%, 50°C, por 60 min), seguida pela hidrólise enzimática com baixas cargas de celulase. Foi obtida alta digestibilidade de glucana no material pré-tratado com uma carga enzimática de apenas 1 FPU por grama de glucana (88,2% com 72 h de hidrólise). Este resultado foi atribuído à drástica mudança na estrutura do material, provocada pelo pré-tratamento. A acessibilidade das enzimas à celulose foi medida baseada na máxima capacidade de adsorção de uma proteína não-hidrolítica (TGC), constituída por tioredoxina, proteína verde fluorescente e módulo de ligação à celulose, com tamanho semelhante à endoglucanase I de *Trichoderma reesei*. Os resultados mostraram que a tecnologia COSLIF aumenta muito a acessibilidade ao substrato; acarretando em alta e rápida sacarificação de glucana com baixa carga de enzima (Figura 7).

Figura 7 - Perfil da hidrólise enzimática da celulose de bambu pré-tratado por COSLIF, (A) a diferentes cargas enzimáticas, e (B) em diferentes tempos de hidrólise.

Fonte: Sathitsuksanoh et al., (2010).

Utilizando palha de milho como matéria-prima, ZHU et al. (2009) compararam o fracionamento COSLIF com o pré-tratamento empregando ácido sulfúrico diluído em termos de hidrólise enzimática e estrutura supramolecular, incluindo a acessibilidade do substrato às enzimas. Com carga enzimática de 15 FPU de celulase por grama de glucana, a digestibilidade do material pré-tratado por COSLIF foi maior que 90% após 12 h de hidrólise; e alcançou 97% após 24 h. Já o pré-tratamento com ácido diluído apresentou taxa de hidrólise menor, alcançando 84% de digestibilidade de glucana com 72 h de hidrólise. Com baixa carga de enzimas (5 FPU por grama de glucana), a digestibilidade enzimática da biomassa pré-tratada por COSLIF foi de 93% em 24 h de hidrólise, enquanto que a digestibilidade da biomassa pré-tratada por ácido diluído alcançou somente 60% em 72 h. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (Figura 8) evidenciaram que o pré-tratamento COSLIF rompe a estrutura fibrilar do material,

‘amorfizando’ a celulose, enquanto o pré-tratamento com ácido diluído apenas remove a hemicelulose, o que explica a maior acessibilidade da celulase provocada pelo pré-tratamento COSLIF (ZHU et al, 2009).

Figura 8 - Microscopia eletrônica de varredura de palha de milho: (A) antes do pré-tratamento; (B) pré-tratado com ácido diluído e (C) pré-tratado via COSLIF.

Fonte: Zhu et al., (2009).

Outro estudo, conduzido por Rollin et al. (2011), comparou os pré-tratamentos COSLIF e Imersão em Amônia Aquosa (SAA), empregando ‘switchgrass’ como matéria-prima. Foi evidenciado que o aumento da área superficial acessível às celulasas é mais importante que a diminuição do teor de lignina, no que se refere à liberação efetiva de açúcares por hidrólise enzimática (Figura 9).

Figura 9 - Superfície de resposta mostrando a eficiência de sacarificação enzimática de glucana em função da remoção de lignina e do aumento de área acessível à celulase em 72 h de hidrólise enzimática.

Fonte: Rollin et al., (2011).

O pré-tratamento COSLIF não proporcionou uma deslignificação efetiva, porém apresentou grande aumento da área superficial acessível à celulase, resultando em rápida taxa de hidrólise. Em contrapartida, o pré-tratamento SAA removeu grande quantidade de lignina, mas proporcionou pequeno aumento na acessibilidade da celulose, levando a uma menor taxa de hidrólise. Verificou-se que o pré-tratamento COSLIF resultou em rápida e eficiente sacarificação da celulose (85% em 72 h) na presença de pequena carga enzimática (3 FPU/g de glucana) (ROLLIN et al., 2011).

Sathitsuksanoh et al. (2012a) aplicaram o fracionamento COSLIF para uma variedade de matérias-primas, incluindo gramíneas, folhosas e coníferas; entre elas, bagaço de cana-de-açúcar, palha de trigo e palha de arroz (Figura 10). Todas as matérias-primas apresentaram alta digestibilidade de glucana (acima de 93% com 5 FPU por grama de glucana) e rápida hidrólise após o pré-tratamento, mostrando que a tecnologia independe da natureza da matéria-prima e pode ser utilizada para processar diversos tipos de biomassa. Ainda, foi chamada atenção para o fato de que tal pré-tratamento, independente das características da matéria-prima, é essencial para a implementação de biorrefinarias capazes de utilizar diferentes fontes de biomassa e manter a biodiversidade local.

Figura 10 - Perfil da hidrólise enzimática da celulose de bagaço de cana (A), palha de trigo (B), e palha de arroz (C) pré-tratados por COSLIF. As condições foram 50°C, ácido fosfórico a 85% e tempo de 45 min para palha de trigo, e 30 min para bagaço de cana e palha de arroz.

Fonte: Sathitsuksanoh et al., (2012a).

Um dos objetivos do fracionamento COSLIF é a ‘amorfização’ da celulose, que acontece durante a fase de reação com ácido fosfórico concentrado seguida pela precipitação com acetona. Tal ‘amorfização’ pode ser estimada pelo índice de cristalinidade do material, que apesar de considerado uma característica fundamental do substrato que afeta a hidrólise enzimática da celulose (LAUREANO-PEREZ et al., 2005),

deve ser interpretado com cautela. Sathitsuksanoh et al. (2011), por exemplo, aplicaram o pré-tratamento COSLIF em 'switchgrass' e determinaram o índice de cristalinidade utilizando as técnicas de difração de raios X, ressonância magnética nuclear e espectroscopia de infravermelho. Os autores demonstraram que o material pré-tratado foi rapidamente hidrolisado com alta eficiência a baixa carga enzimática, em grande parte devido à 'amorfização' da celulose. No entanto, os índices de cristalinidade determinados para os diferentes materiais gerados no estudo variaram dependendo da técnica de análise, metodologia de cálculo e forma de condicionamento da amostra. Foi sugerido que o índice de cristalinidade não pode, ainda, ser considerado como um parâmetro absoluto para a predição da eficácia do pré-tratamento no que tange à sacarificação enzimática da celulose.

Além do pré-tratamento COSLIF, o pré-tratamento de materiais lignocelulósicos com líquidos iônicos apropriados também acarreta em diminuição dos valores de índice de cristalinidade, pelo rompimento da estrutura cristalina da celulose (ZHAO et al., 2009). Por outro lado, pré-tratamentos como explosão a vapor e tratamento com ácidos diluídos geralmente aumentam os índices de cristalinidade, porque removem frações amorfas da estrutura lignocelulósica; hemicelulose, neste caso (KIM; LEE, 2005).

A tecnologia COSLIF já foi aplicada em palha de milho empregando o líquido iônico cloreto de butil-3-metilimidazol ([BMIM]Cl) como solvente de celulose, ao invés de H_3PO_4 concentrado (SATHITSUKSANOH et al., 2012b). Comparativamente, as digestibilidades enzimáticas do material pré-tratado com ácido fosfórico concentrado e ([BMIM]Cl) foram iguais a 96% e 55%, respectivamente, após 72 h de hidrólise com 5 FPU de celulase por grama de glucana. Os autores atribuíram a hidrólise incompleta observada após o pré-tratamento com líquido iônico a uma combinação de fatores, a saber: diminuição da estabilidade da celulase na presença do líquido iônico residual; presença de lignina residual no sólido pré-tratado; e, principalmente, menor acessibilidade e recuperação de glucana após o pré-tratamento.

Apesar da comprovada eficiência em melhorar a digestibilidade enzimática da celulose, a tecnologia COSLIF possui algumas limitações importantes; entre elas, a utilização de grandes volumes de solventes e, possivelmente, o alto investimento em capital necessário para o sistema de reciclagem de solventes, sendo primordial que estas limitações sejam superadas para a sua viabilidade econômica (ZHANG et al., 2007).

2.4. Biorrefinarias

A comprovada efetividade da tecnologia COSLIF no fracionamento dos principais constituintes da biomassa lignocelulósica (ZHANG et al., 2007; MOXLEY et al., 2008; SATHITSUKSANO et al., 2009; SATHITSUKSANO et al., 2010) cria oportunidades para a implementação industrial de biorrefinarias lignocelulósicas, que têm por objetivo a obtenção de produtos de maior valor agregado a partir deste tipo de matéria-prima renovável (Figura 11), contribuindo para a viabilidade econômica e para a sustentabilidade ambiental dos processos de conversão.

Figura 11 - Esquema que mostra produtos gerados em uma biorrefinaria que utiliza materiais lignocelulósicos como matéria-prima, e respectivos usos.

Fonte: Adaptado de Villegas; Gnansounou, (2008).

De modo geral, biorrefinarias podem ser classificadas em três diferentes grupos, dependendo da matéria-prima utilizada: existem as biorrefinarias baseadas em carboidratos ('sugar biorefinery'); as biorrefinarias baseadas em biomassas de natureza lignocelulósica ('lignocellulosic biorefinery') e as biorrefinarias baseadas em lipídios ('lipid biorefinery') (OCTAVE; THOMAS, 2009). As primeiras propõem a utilização dos açúcares

que atuam como reservas de energia nos vegetais, como a sacarose e o amido, que são açúcares mais acessíveis, adequados às necessidades fisiológicas. O segundo modelo de biorrefinaria baseia-se na utilização dos constituintes estruturais do vegetal, que são compostos de maior complexidade estrutural e, por isso, de menor acessibilidade. As terceiras baseiam-se em grupos específicos de vegetais capazes de produzir e armazenar triglicerídeos, que também atuam como reserva energética.

Partindo do vegetal 'in natura', os componentes da biomassa precisam ser separados antes da sua transformação em produtos químicos. Primeiramente, devem ser separados os frutos, as sementes, as folhagens e a casca, e depois extraídos os óleos essenciais e os carboidratos não-estruturais. Após esta separação, tem-se o lenho propriamente dito, que contém celulose, hemicelulose e lignina (SCHUCHARDT et al., 2001).

De acordo com Zhang (2008), tecnologias de fracionamento de materiais lignocelulósicos que permitam a co-utilização efetiva de ácido acético, lignina e hemicelulose, além de celulose, serão fundamentais para a viabilidade da implantação das biorrefinarias lignocelulósicas. Para isso, um método eficaz de pré-tratamento e fracionamento de materiais lignocelulósicos deve ter as seguintes características: (1) levar a alto rendimento em açúcares, com baixa degradação; (2) permitir rentabilidade econômica; (3) operar a baixa temperatura (que apresenta benefícios como pouca ou nenhuma degradação de açúcares, baixa formação de inibidores e diminuição do investimento em capital); (4) acarretar em 'amorfização' da celulose (para aumento da taxa de hidrólise, permitindo a obtenção de alto rendimento em glicose com menor uso de enzimas); (5) permitir ampla aplicabilidade a várias matérias-primas.

Estudos da tecnologia COSLIF demonstraram ser esta uma tecnologia eficiente de fracionamento, que possui as características supracitadas. A utilização sequencial de solvente de celulose não-volátil (ácido fosfórico concentrado), solvente orgânico altamente volátil (acetona) e água, sob condições modestas de reação, isola os componentes da biomassa lignocelulósica com base na solubilidade de cada componente (ZHANG, 2008).

Segundo o National Renewable Energy Laboratory, as biorrefinarias podem produzir tanto produtos químicos em pequeno volume, mas com alto valor de mercado (*specialties*), quanto combustíveis para transporte em grande volume, mas com baixo valor de mercado (*commodities*); em ambos os casos, podendo gerar, concomitantemente, eletricidade, para sua própria manutenção e para comercialização. Enquanto os produtos de alto valor agregado melhoram a rentabilidade do processo de

conversão como um todo, os produtos de menor valor agregado ajudam a satisfazer as necessidades de energia renovável.

Werpy e colaboradores (2004), do United States Department of Energy, organizaram um relatório identificando doze blocos de construção produzidos a partir de açúcares da lignocelulose, via conversão química ou biológica, sendo que cada um deles pode ser subsequentemente convertido à vários produtos químicos de interesse comercial. Os blocos de construção são: 1,4-diácidos (ácido succínico, fumárico e málico); ácido 2,5-dicarboxi-furano; ácido 3-hidróxi-propionico; ácido aspártico; ácido sacárico; ácido glutâmico; ácido itacônico; ácido levulínico; 3-hidroxi-butirolactona; glicerol; sorbitol; e xilitol/arabinitol.

De acordo com Zhang et al. (2007), a celulose obtida do fracionamento COSLIF é amorfa, o que oferece vantagens como rápida e eficiente sacarificação na presença de baixas cargas de enzimas. Isto possibilita menor investimento de capital com reatores, e a glicose obtida pode ser convertida a uma série de substâncias por vias química e bioquímica.

Ainda, de acordo com os mesmos autores, a partir dos açúcares hemicelulósicos e do ácido acético, podem-se produzir plásticos biodegradáveis e muitos outros produtos químicos. Os oligossacarídeos gerados também podem ser utilizados como aditivos para ração animal. Ainda, o furfural, produto de desidratação da xilose, pode ser utilizado como um precursor na fabricação de lubrificantes, revestimentos e adesivos, entre outros.

Em 2007, foi organizado um segundo relatório pelo United States Department of Energy (HOLLADAY et al., 2007), avaliando as possíveis utilizações da lignina. O relatório divide as possibilidades em três categorias: oportunidades de curto prazo (combustível e gaseificação); oportunidades de médio prazo (macromoléculas); e oportunidades de longo prazo (aromáticos). Nas oportunidades de curto prazo, a lignina é usada como fonte de energia, e meios severos são utilizados para alterar, também severamente, sua estrutura. Nas oportunidades de médio prazo, o oposto é considerado, ou seja, busca-se preservar a estrutura molecular da lignina. Nas oportunidades de longo prazo, busca-se agregar valor aos compostos aromáticos derivados da lignina.

De acordo com Zhang et al. (2007), em uma biorrefinaria, o destino da lignina depende grandemente do tipo de pré-tratamento aplicado para a sua obtenção. Atualmente, esta fração não é utilizada massivamente devido ao limitado suprimento de material puro e com alta qualidade; no entanto, o fracionamento COSLIF constitui-se em proposta promissora para a obtenção de lignina com qualidade adequada para agregação de valor, devido ao processamento sob condições brandas de reação.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado foi adquirido da Usina Ester localizada em Cosmópolis/SP. O bagaço foi, primeiro, seco à temperatura ambiente. Depois, peneirado manualmente, para retirada das frações de maiores tamanhos. Finalmente, homogeneizado granulometricamente, e apenas a fração retida entre as peneiras de 20 e 65 *mesh* foi utilizada.

3.1.1. Caracterização granulométrica do bagaço de cana-de-açúcar

Para caracterização granulométrica do bagaço, foi utilizado um conjunto de peneiras padronizadas da série Tyler, determinando a fração mássica retida em cada uma. As peneiras utilizadas foram de 6, 10, 20, 35, 65 e 150 *mesh*, com aberturas de 3,36, 1,68, 0,84, 0,42, 0,21 e 0,11 mm, respectivamente. Para esta análise, foram utilizadas amostras de 20 g. As peneiras foram posicionadas em ordem decrescente de tamanho das malhas, de modo que a primeira peneira fosse aquela com malha de maior abertura e a última fosse aquela que tivesse a menor abertura. O sistema de peneiras foi acoplado a um agitador magnético e em seguida a amostra de bagaço foi adicionada à primeira peneira. A agitação do sistema foi feita durante 1h, na máxima frequência.

3.1.2. Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar

As amostras do bagaço foram caracterizadas quanto à sua composição química (teor de glucana, xilana, arabinana, acetil, lignina, extrativos e cinzas) segundo metodologia adaptada do National Renewable Energy Laboratory (SLUITER et al, 2008). A análise foi feita para o bagaço 'in natura' e para o bagaço fracionado, conforme ilustrado na Figura 12.

Após moagem a 20 *mesh*, foram pesados 4,5 g de amostra para extração em Soxhlet. Primeiramente com água (800 mL por 24 h), seguido pela extração com etanol 95% (800 mL por 24 h). O teor de extrativos foi determinado através das massas secas do material antes e após a extração.

As cinzas foram determinadas para o material não extraído, com rampa de aquecimento em forno mufla até atingir 575 °C, seguido de manutenção do material nesta temperatura por 2 h. Depois de resfriado, foi determinado o peso seco.

Figura 12 - Fluxograma da metodologia empregada para análise composicional do bagaço de cana-de-açúcar.

Fonte: Arquivo pessoal.

Para a hidrólise ácida, 0,3 g de bagaço foram pesados em tubo de ensaio e misturados com 3 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 72% (m/m), durante 1 h, em banho-maria, a 30 °C. A reação foi interrompida com a adição de 84 mL de água destilada para diluição do ácido a 4% e resfriamento à temperatura ambiente. O conteúdo do tubo foi transferido para um frasco Erlenmeyer de 250 mL, fechado hermeticamente e autoclavado a 121 °C, por 1 h. Juntamente, foi autoclavada uma solução padrão de açúcares no mesmo pH, para avaliação da degradação térmica.

Após o resfriamento à temperatura ambiente, a suspensão obtida foi filtrada em papel de filtro.

O resíduo sólido (lignina insolúvel + cinzas) retido no papel foi lavado com 500 mL de água destilada, seco em estufa a 105 °C até massa constante e calcinado em mufla a

575 °C. Após resfriamento, o material calcinado foi quantificado gravimetricamente. Pela diferença entre a massa do resíduo seco e a massa das cinzas, foi possível determinar a porcentagem de lignina insolúvel em ácido.

O teor de lignina solúvel em H₂SO₄ foi determinado pela medida de absorbância em espectrofotômetro a 240 nm ($\epsilon = 25 \text{ L/g cm}$); sendo que o sobrenadante da autoclavagem (hidrolisado) foi diluído apropriadamente.

A concentração de lignina total no material de partida, solúvel e insolúvel, foi considerada como a soma das massas de lignina solúvel e insolúvel, em relação à massa do material de partida.

O hidrolisado e a solução padrão de açúcares foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para determinação das concentrações de glicose, xilose, arabinose e ácido acético, nas seguintes condições: detector de índice de refração, coluna BIO RAD Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm), temperatura da coluna de 45 °C, solução de ácido sulfúrico 0,01N como fase móvel, fluxo de 0,6 mL/min e volume de 20 μL de amostra injetada. As amostras foram filtradas previamente em filtro 'Sep-Pack' C18 (Millipore).

As concentrações de açúcares monoméricos e de ácido acético, determinadas por CLAE, foram convertidas nos teores dos respectivos componentes conforme descrito a seguir.

Para o cálculo do teor de glucana no bagaço, utilizou-se a Equação 1:

$$\% \text{ glucana} = ([\text{gli}] * 0,9 * V) / \text{MS} * 100 \quad (1)$$

Onde [gli] é a concentração de glicose determinada por CLAE; 0,9 é o fator de conversão de glicose à glucana; V é o volume de hidrolisado (0,087 L); MS é a massa seca da amostra.

Para o cálculo do teor de xilana no bagaço, utilizou-se a Equação 2:

$$\% \text{ xilana} = ([\text{xil}] * 0,88 * V) / \text{MS} * 100 \quad (2)$$

Onde [xil] é a concentração de xilose determinada por CLAE; 0,88 é o fator de conversão de xilose à xilana; V é o volume de hidrolisado (0,087 L); MS é a massa seca da amostra.

Para o cálculo do teor de arabinana no bagaço, utilizou-se a Equação 3:

$$\% \text{ arabinana} = (([\text{ara}] * 0,88 * V) / \text{MS}) * 100 \quad (3)$$

Onde [ara] é a concentração de arabinose determinada por CLAE; 0,88 é o fator de conversão de arabinose à arabinana; V é o volume de hidrolisado (0,087 L); MS é a massa seca da amostra.

Para o cálculo do teor de acetil no bagaço, utilizou-se a Equação 4:

$$\% \text{ acetil} = (([\text{ác. acético}] * 0,72 * V) / \text{MS}) * 100 \quad (4)$$

Onde [ác. acético] é a concentração de ácido acético determinada por CLAE; 0,72 é o fator de conversão de ácido acético à acetil; V é o volume de hidrolisado (0,087 L); MS é a massa seca da amostra.

3.2. Fracionamento do bagaço de cana-de-açúcar

O fracionamento dos componentes estruturais do bagaço de cana-de-açúcar (celulose, hemicelulose e lignina) foi realizado utilizando a tecnologia COSLIF; de acordo com o procedimento experimental ilustrado na Figura 13.

Figura 13 - Detalhamento do procedimento de fracionamento COSLIF aplicado ao bagaço de cana-de-açúcar.

Fonte: Arquivo pessoal.

Inicialmente, foi colocado, em tubo de centrífuga de 50 mL, 1 g de bagaço classificado (massa seca; umidade $\approx$ 10%), água (volume apropriado), e 8 mL de ácido fosfórico concentrado. A mistura foi aquecida em banho maria e agitada manualmente com bastão de vidro, com variação da concentração do ácido, do tempo de residência e da temperatura de reação, de acordo com um planejamento fatorial 2^5 composto.

Ao final do tempo de residência, a mistura foi resfriada em banho de gelo. Em seguida, foi adicionada acetona (30 mL) para precipitação da celulose e da hemicelulose, e extração da lignina na fase líquida. Na sequência, a mistura foi centrifugada (3.600 rpm, 20 min) e o sobrenadante descartado.

Posteriormente, foi utilizada acetona para lavar o precipitado sólido (Fração sólida I) e remover a lignina residual, por dissolução. A acetona foi adicionada ao precipitado, e a mistura foi então agitada manualmente por 5 min com bastão de vidro, à temperatura ambiente. Foram realizadas 4 extrações seguidas de 4 centrifugações à 3.600 rpm por 20 min (variando o volume de acetona utilizado em cada extração, de acordo com o previsto

pela matriz experimental), para separação dos sólidos; os sobrenadantes (Fração líquida II) foram descartados.

Na segunda extração, foi utilizada água destilada para lavar o precipitado sólido (Fração sólida II) e remover a hemicelulose solúvel. A água destilada foi adicionada ao precipitado, que foi agitado manualmente por 5 min à temperatura ambiente. Foram realizadas 5 extrações seguidas de 5 centrifugações à 3.600 rpm por 20 min (variando o volume de água utilizado em cada extração, de acordo com o previsto pela matriz experimental), para separação dos sólidos; os sobrenadantes (Fração líquida III) foram coletados e reunidos, para caracterização subsequente. Os sólidos extraídos também foram coletados e reunidos, para caracterização subsequente.

A Tabela 3 apresenta a matriz do planejamento experimental utilizado para o estudo do fracionamento, com os valores reais e codificados das variáveis independentes; um planejamento fatorial 2^5 composto, com 8 repetições do ensaio no ponto central.

Para a realização da análise estatística, os valores reais das variáveis independentes foram codificados, de acordo com a Equação 5:

$$V_C = (V_R - V_0) / (\Delta V_R / 2) \quad (5)$$

Onde V_C é o valor codificado da variável independente; V_R é o valor real da variável independente; V_0 é o valor real da variável independente no nível central; e ΔV_R é a diferença entre o valor real máximo e o valor real mínimo da variável independente.

Tabela 3 - Valores reais e codificados das variáveis independentes do planejamento fatorial 2^5 completo com 8 repetições do ponto central

Experimento	Variáveis									
	Valores Codificados					Valores Reais				
	Conc. Ácido (%)	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Vol. Acetona (mL)	Vol. Água (mL)	Conc. Ácido (%)	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Vol. Acetona (mL)	Vol. Água (mL)
1	-1	-1	-1	-1	-1	82,2	45,8	56,1	91,6	131,6
2	1	-1	-1	-1	-1	83,8	45,8	56,1	91,6	131,6
3	-1	1	-1	-1	-1	82,2	54,2	56,1	91,6	131,6
4	1	1	-1	-1	-1	83,8	54,2	56,1	91,6	131,6
5	-1	-1	1	-1	-1	82,2	45,8	93,9	91,6	131,6
6	1	-1	1	-1	-1	83,8	45,8	93,9	91,6	131,6
7	-1	1	1	-1	-1	82,2	54,2	93,9	91,6	131,6
8	1	1	1	-1	-1	83,8	54,2	93,9	91,6	131,6
9	-1	-1	-1	1	-1	82,2	45,8	56,1	108,4	131,6
10	1	-1	-1	1	-1	83,8	45,8	56,1	108,4	131,6
11	-1	1	-1	1	-1	82,2	54,2	56,1	108,4	131,6
12	1	1	-1	1	-1	83,8	54,2	56,1	108,4	131,6
13	-1	-1	1	1	-1	82,2	45,8	93,9	108,4	131,6
14	1	-1	1	1	-1	83,8	45,8	93,9	108,4	131,6
15	-1	1	1	1	-1	82,2	54,2	93,9	108,4	131,6
16	1	1	1	1	-1	83,8	54,2	93,9	108,4	131,6
17	-1	-1	-1	-1	1	82,2	45,8	56,1	91,6	148,4
18	1	-1	-1	-1	1	83,8	45,8	56,1	91,6	148,4
19	-1	1	-1	-1	1	82,2	54,2	56,1	91,6	148,4
20	1	1	-1	-1	1	83,8	54,2	56,1	91,6	148,4
21	-1	-1	1	-1	1	82,2	45,8	93,9	91,6	148,4
22	1	-1	1	-1	1	83,8	45,8	93,9	91,6	148,4
23	-1	1	1	-1	1	82,2	54,2	93,9	91,6	148,4
24	1	1	1	-1	1	83,8	54,2	93,9	91,6	148,4
25	-1	-1	-1	1	1	82,2	45,8	56,1	108,4	148,4

Experimento	Variáveis									
	Valores Codificados					Valores Reais				
	Conc. Ácido (%)	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Vol. Acetona (mL)	Vol. Água (mL)	Conc. Ácido (%)	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Vol. Acetona (mL)	Vol. Água (mL)
26	1	-1	-1	1	1	83,8	45,8	56,1	108,4	148,4
27	-1	1	-1	1	1	82,2	54,2	56,1	108,4	148,4
28	1	1	-1	1	1	83,8	54,2	56,1	108,4	148,4
29	-1	-1	1	1	1	82,2	45,8	93,9	108,4	148,4
30	1	-1	1	1	1	83,8	45,8	93,9	108,4	148,4
31	-1	1	1	1	1	82,2	54,2	93,9	108,4	148,4
32	1	1	1	1	1	83,8	54,2	93,9	108,4	148,4
33	-2,378	0	0	0	0	81,0	50,0	75,0	100,0	140,0
34	2,378	0	0	0	0	85,0	50,0	75,0	100,0	140,0
35	0	-2,378	0	0	0	83,0	40,0	75,0	100,0	140,0
36	0	2,378	0	0	0	83,0	60,0	75,0	100,0	140,0
37	0	0	-2,378	0	0	83,0	50,0	30,0	100,0	140,0
38	0	0	2,378	0	0	83,0	50,0	120,0	100,0	140,0
39	0	0	0	-2,378	0	83,0	50,0	75,0	80,0	140,0
40	0	0	0	2,378	0	83,0	50,0	75,0	120,0	140,0
41	0	0	0	0	-2,378	83,0	50,0	75,0	100,0	120,0
42	0	0	0	0	2,378	83,0	50,0	75,0	100,0	160,0
43	0	0	0	0	0	83,0	50,0	75,0	100,0	140,0
44	0	0	0	0	0	83,0	50,0	75,0	100,0	140,0
45	0	0	0	0	0	83,0	50,0	75,0	100,0	140,0
46	0	0	0	0	0	83,0	50,0	75,0	100,0	140,0
47	0	0	0	0	0	83,0	50,0	75,0	100,0	140,0
48	0	0	0	0	0	83,0	50,0	75,0	100,0	140,0
49	0	0	0	0	0	83,0	50,0	75,0	100,0	140,0
50	0	0	0	0	0	83,0	50,0	75,0	100,0	140,0

Conforme pode ser observado, as variáveis do planejamento e seus respectivos níveis reais, definidos após revisão da literatura, foram: concentração de H_3PO_4 (81 – 85%); temperatura de reação (40 – 60 °C); tempo de reação (30 – 120 min); volume de solvente orgânico usado na primeira extração (80 – 120 mL); volume de água usado na segunda extração (120 – 160 mL).

Para cada condição do planejamento, as frações sólida e líquida remanescentes do fracionamento foram congeladas para análise posterior.

3.2.1. Composição química da fração sólida

As frações sólidas congeladas foram transferidas para placas de Petri e secas à temperatura ambiente. O material teve sua massa seca determinada e foi então caracterizado quimicamente, conforme descrito no item 3.1.2.

3.2.2. Composição química da fração líquida

As frações líquidas congeladas foram descongeladas e tiveram seus volumes determinados. Na sequência, foram analisadas por CLAE quanto à composição e concentração de açúcares monoméricos (glicose, xilose e arabinose) e oligoméricos (glucana, xilana e arabinana), ácido acético, produtos de desidratação de açúcares (furfural e hidroximetilfurfural), lignina solúvel e cinzas.

Para a quantificação de açúcares monoméricos e ácido acético, utilizou-se CLAE conforme descrito no item 3.1.2. Os açúcares oligoméricos foram quantificados de acordo com a metodologia proposta pelo National Renewable Energy Laboratory (SLUITER et al, 2006), após pós-hidrólise com H_2SO_4 a 4% (m/m).

Para a determinação das concentrações de furfural e hidroximetilfurfural, foram utilizadas as seguintes condições: coluna C18 (3,9 x 300 mm), temperatura da coluna de 30 °C, detector de ultra-violeta SPD-10A UV-VIS (276 nm), solução de acetonitrila/água (1:8) com 1% de ácido acético como fase móvel, fluxo de 0,8 mL/min e volume da amostra injetada de 20 µL. As amostras foram previamente filtradas em membranas de 0,45 µm (Millipore).

Para quantificação da lignina solúvel e cinzas no extrato aquoso utilizou-se a metodologia descrita no item 3.1.2.

3.2.3. Variáveis-resposta do planejamento experimental

As variáveis-resposta do planejamento experimental foram rendimento e pureza de açúcares, conforme proposto por Yoo et al. (2011), além de seletividade e concentração de açúcares.

Em termos de rendimento, considerou-se: Rendimento global, ou rendimento de glucana e xilana no sólido e no líquido ($R_{G+X(S+L)}$); Rendimento de glucana no sólido e no líquido ($R_{G(S+L)}$); Rendimento de xilana no sólido e no líquido ($R_{X(S+L)}$); Rendimento de glucana no sólido ($R_{G(S)}$); Rendimento de xilana no sólido ($R_{X(S)}$); Rendimento de xilana no líquido ($R_{X(L)}$); e Rendimento de glucana no líquido ($R_{G(L)}$). Em termos de seletividade, considerou-se: Seletividade de glucana no sólido ($S_{G(S)}$); e Seletividade de xilana no líquido ($S_{X(L)}$). Em termos de pureza, considerou-se: Pureza de glucana no sólido ($P_{G(S)}$); e Pureza de xilana no líquido ($P_{X(L)}$). Em termos de concentração de açúcares, considerou-se: Concentração de glicose oligomérica no líquido ($C_{G(L)}$); Concentração de xilose oligomérica no líquido ($C_{X(L)}$) e Concentração de glicose oligomérica somada à xilose oligomérica no líquido ($C_{G+X(L)}$).

O Rendimento global, ou rendimento de glucana e xilana na fração sólida e na fração líquida (%), foi calculado de acordo com a Equação 6:

$$R_{G+X(S+L)} = (((G_S + (g_L * 0,9)) + (X_S + (x_L * 0,88))) / (G_I + X_I)) * 100 \quad (6)$$

Onde G_S é a massa de glucana (g) no sólido após o fracionamento; g_L é a massa de glicose (g) no líquido após o fracionamento; 0,9 é o fator de conversão de glicose para glucana; X_S é a massa de xilana (g) no sólido após o fracionamento; x_L é a massa de xilose (g) no líquido após o fracionamento; 0,88 é o fator de conversão de xilose para xilana; G_I é a massa de glucana (g) no material inicial e X_I é a massa de xilana (g) no material inicial.

O Rendimento de glucana no sólido e no líquido (%) foi calculado com base na Equação 7.

$$R_{G(S+L)} = (G_S + (g_L * 0,9)) / G_I * 100 \quad (7)$$

Onde G_S é a massa de glucana (g) no sólido após o fracionamento; g_L é a massa de glicose (g) no líquido após o fracionamento; 0,9 é o fator de conversão de glicose para glucana e G_I é a massa de glucana (g) no material inicial.

O Rendimento de xilana no sólido e no líquido (%) foi calculado com base na Equação 8.

$$R_{X(S+L)} = (X_S + (x_L * 0,88)) / X_I * 100 \quad (8)$$

Onde X_S é a massa de xilana (g) no sólido após o fracionamento; x_L é a massa de xilose (g) no líquido após o fracionamento; 0,88 é o fator de conversão de xilose para xilana e X_I é a massa de xilana (g) no material inicial.

O Rendimento de glucana no sólido (%) foi calculado com base na Equação 9.

$$R_{G(S)} = (G_S / G_I) * 100 \quad (9)$$

Onde G_S é a massa de glucana (g) no sólido após o fracionamento e G_I é a massa de glucana (g) no material inicial.

O Rendimento de xilana no sólido (%) foi calculado com base na Equação 10.

$$R_{X(S)} = (X_S / X_I) * 100 \quad (10)$$

Onde X_S é a massa de xilana (g) no sólido após o fracionamento e X_I é a massa de xilana (g) no material inicial.

O Rendimento de xilana no líquido (%) foi calculado com base na Equação 11.

$$R_{X(L)} = (x_L * 0,88) / X_I * 100 \quad (11)$$

Onde x_L é a massa de xilose (g) no líquido após o fracionamento; 0,88 é o fator de conversão de xilose para xilana e X_I é a massa de xilana (g) no material inicial.

O Rendimento de glucana no líquido (%) foi calculado com base na Equação 12.

$$R_{G(L)} = (g_L * 0,9) / G_I * 100 \quad (12)$$

Onde g_L é a massa de glicose (g) no líquido após o fracionamento; 0,9 é o fator de conversão de glicose para glucana e G_I é a massa de glucana (g) no material inicial.

A seletividade de glucana no sólido (%) foi calculada com base na Equação 13.

$$S_{G(S)} = G_S / (G_S + (g_L * 0,9)) * 100 \quad (13)$$

Onde G_S é a massa de glucana (g) no sólido após o fracionamento, g_L é a massa de glicose (g) no líquido após o fracionamento e 0,9 é o fator de conversão de glicose para glucana.

A seletividade de xilana no líquido (%) foi calculada com base na Equação 14.

$$S_{X(L)} = (x_L * 0,88) / (X_S + (x_L * 0,88)) * 100 \quad (14)$$

Onde x_L é a massa de xilose (g) no líquido após o fracionamento; 0,88 é o fator de conversão de xilose para xilana e X_S é a massa de xilana (g) no sólido após o fracionamento.

A pureza de glucana no sólido (%) foi calculada com base na Equação 15.

$$P_{G(S)} = (G_S / M_S) * 100 \quad (15)$$

Onde G_S é a massa de glucana (g) no sólido após o fracionamento e M_S é a massa seca de sólido (g).

A pureza de xilana no líquido (%) foi calculada com base na Equação 16.

$$P_{X(L)} = (x_L * 0,88) / M_S * 100 \quad (16)$$

Onde x_L é a massa de xilose (g) no líquido; 0,88 é o fator de conversão de xilose para xilana; M_S é a massa seca de sólidos na fração líquida.

A concentração de glicose oligomérica no líquido (g/L) foi calculada com base na Equação 17.

$$C_{G(L)} = [g_L]_{\text{depois pós-hid}} - [g_L]_{\text{antes pós-hid}} \quad (17)$$

Onde $[g_L]_{\text{depois pós-hid}}$ é a concentração de glicose (g/L) obtida no extrato aquoso após a pós-hidrólise e $[g_L]_{\text{antes pós-hid}}$ é a concentração de glicose (g/L) obtida no extrato aquoso antes da pós-hidrólise.

A concentração de xilose oligomérica no líquido (g/L) foi calculada de acordo com a Equação 18.

$$C_{X(L)} = [x_L]_{\text{depois pós-hid}} - [x_L]_{\text{antes pós-hid}} \quad (18)$$

Onde $[x_L]_{\text{depois pós-hid}}$ é a concentração de xilose (g/L) obtida no extrato aquoso após a pós-hidrólise e $[x_L]_{\text{antes pós-hid}}$ é a concentração de glicose (g/L) obtida no extrato aquoso antes da pós-hidrólise.

A concentração conjunta de glicose e xilose oligoméricas no líquido (g/L) foi calculada de acordo com a Equação 19.

$$C_{G+X(L)} = C_{G(L)} + C_{X(L)} \quad (19)$$

Onde $C_{G(L)}$ é a concentração de glicose oligomérica no líquido (g/L), calculada de acordo com a equação 17; e $C_{X(L)}$ é a concentração de xilose oligomérica no líquido (g/L), calculada de acordo com a equação 18.

3.2.4. Análise estatística dos resultados

Modelos empíricos (Equação 20) foram ajustados aos dados experimentais utilizando o software Design Expert 5.0, de acordo com a metodologia de superfície de resposta (BOX et al., 1978).

$$Y_i = b_0 + \sum_{i=1}^n b_i x_i \quad (20)$$

Onde Y_i representa a variável resposta; b_0 , a constante; b_i , o termo linear; e x_i , os níveis codificados das variáveis independentes.

A avaliação dos modelos foi feita com base na significância estatística do modelo e da falta de ajuste, considerando-se também a amplitude e distribuição dos resíduos e o desvio padrão residual, calculado de acordo com a Equação 21 (ANDRADE, 2012).

$$RSD(\%) = \left(\frac{\sqrt{\frac{(\sum y_R - y_P)^2}{n}}}{\bar{y}_R} \right) \times 100 \quad (21)$$

Onde y_R é o valor real, y_P é o valor predito, n é o número de experimentos e $\bar{y}_R$ é a média dos valores reais.

3.2.5. Caracterização de amostras selecionadas por difração de raios-X

A cristalinidade dos bagaços de cana-de-açúcar, antes e depois do fracionamento COSLIF, foi determinada no Departamento de Engenharia de Materiais da EEL/USP, utilizando um difratômetro com tubo gerador de raios-X, no intervalo de $2\theta = 10^\circ$ a $2\theta = 40^\circ$. A partir dos difratogramas, o índice de cristalinidade foi calculado de acordo com a Equação 22, após subtração dos sinais correspondentes à difração do compartimento de amostra com (amostras úmidas) ou sem (amostras secas) água (SEGAL et al, 1959).

$$I_c = ((I_{002} - I_{am}) / I_{002}) \times 100 \quad (22)$$

Onde I_c é o índice de cristalinidade (%), I_{002} é a intensidade de difração em $2\theta = 22,6^\circ$ e I_{am} é a intensidade de difração em $2\theta = 18,0^\circ$.

3.3. Análise da variabilidade experimental

A variabilidade experimental associada ao fracionamento foi analisada considerando as octuplicatas conduzidas no ponto central do planejamento fatorial (exps. 43-50), além de novos experimentos em triplicatas conduzidos nas condições que apresentaram maior rendimento global (exp. 26); maior rendimento de glucana (exp. 16) e maior rendimento de xilana (exp. 2). Os fracionamentos e as análises das frações foram realizados de acordo com o item 3.2.

3.4. Fracionamento do bagaço de cana-de-açúcar em escala ampliada

Após a definição da condição otimizada, o fracionamento foi conduzido em escala ampliada; em 20 vezes. A condição de fracionamento foi a seguinte: concentração de ácido fosfórico à 83,8% (+1); temperatura de $45,8^\circ\text{C}$ (-1); tempo de 56,1 min (-1); volume de acetona de 1832 mL (-1) e volume de água de 2632 mL (-1).

Neste experimento, que foi conduzido em duplicatas, foram caracterizadas, quanto à composição, a fração sólida III e as frações líquidas denominadas I, II e III, recuperadas após as diferentes etapas do fracionamento; conforme descrito nos itens 3.2.1 e 3.2.2. As variáveis-resposta do fracionamento foram aquelas descritas no item 3.2.3.

3.4.1. Caracterização ultraestrutural

Foram realizadas a caracterização ultraestrutural do bagaço não fracionado e do bagaço fracionado, úmido e seco à temperatura ambiente.

As amostras foram caracterizadas quanto aos perfis de difração de raios-X, conforme descrito no item 3.2.5, e de distribuição de tamanhos de poros, pela técnica de termoporometria, nos Laboratórios de Desenvolvimento de Processos do CTBE, conforme segue: A análise foi conduzida utilizando DSC (calorimetria diferencial de varredura), com técnica que consistiu em congelar as amostras úmidas (0,05 g) à -70°C, o que foi seguido pelo aumento gradual de temperatura com acompanhamento da quantidade de calor consumida na fusão da água retida nos poros de diferentes diâmetros. O resultado de cada análise foi representado pelo cumulativo de área superficial em função do diâmetro de poros, calculado de acordo com a equação de Gibbs-Thomson (DRIEMEIER et al. 2012).

3.4.2. Sacarificação enzimática

A fração sólida obtida após a extração com água (fração sólida III) foi submetida a ensaios de sacarificação enzimática. O extrato utilizado para a sacarificação foi um coquetel enzimático experimental produzido especialmente para o processamento de materiais lignocelulósicos, denominado “Extrato I” (SANTOS, 2010).

Os ensaios de hidrólise enzimática foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 125 mL. Em cada frasco, foi adicionado tampão citrato de sódio (50 mM, pH 4,8), sólidos (5%; massa seca), enzimas (10 FPU/ g) e surfactante (Tween 20; 0,025 g/g). O volume final em cada experimento (25 mL) foi completado com água destilada. As sacarificações foram conduzidas a 45 °C, em shaker a 150 rpm. Nos tempos de 0, 6 e 24 horas de hidrólise enzimática, foram retiradas alíquotas de 0,5 mL; em seguida, estas alíquotas foram fervidas por 5 min, e centrifugadas por 15 min a 4.500 rpm.

Foi avaliada também a hidrólise enzimática do bagaço de cana não fracionado, para comparação, nas mesmas condições experimentais.

3.4.3. Fermentação alcoólica

O hidrolisado obtido após a sacarificação enzimática foi utilizado como fonte de carbono para o cultivo de *Scheffersomyces stipitis* DSM 3651, visando à produção de

etanol. Após ajuste de pH em 6,0, com NaOH, foi esterilizado a 111° C por 15 min, e centrifugado assepticamente, para remoção de precipitados.

O inóculo foi preparado transferindo 1 mL de células (ressuspendidas a partir de cultivo em ágar extrato de malte) para frascos Erlenmeyer (500 mL) contendo 200 mL de meio composto por 30 g/L de xilose, 3 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de extrato de malte e 5 g/L de peptona. Os meios foram incubados em shaker a 30° C e 200 rpm durante 24 h. Após, as células foram recolhidas por centrifugação a 4500 rpm por 15 min e ressuspendas em água destilada estéril.

As fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio inoculado com 2 g/L de células; composto pelos hidrolisados suplementados com 3 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de extrato de malte e 5 g/L de peptona. Os frascos foram incubados em shaker, a 30° C e 200 rpm, durante 48 h. Nos tempos de 0, 4, 8, 24 e 48 horas de fermentação, foram coletadas alíquotas de 0,5 mL. As amostras foram centrifugadas por 15 min a 4.500 rpm e, a partir dos sobrenadantes, as concentrações de glicose e etanol foram determinadas por HPLC.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Bagaço de cana-de-açúcar

4.1.1. Granulometria do bagaço de cana-de-açúcar

A análise granulométrica foi realizada para o bagaço *in natura* (integral) e depois de classificado granulometricamente. A Figura 14 apresenta a distribuição granulométrica do bagaço integral, como veio da usina, antes de passar pela separação granulométrica.

Figura 14 - Distribuição granulométrica do bagaço de cana-de-açúcar integral.

Fonte: Arquivo pessoal.

É possível observar que a maior fração mássica (25,0%) ficou retida na peneira de abertura 3,36 mm (6 *mesh*). A segunda maior fração mássica (21,3%) passou na peneira de 0,84 mm (20 *mesh*) e ficou retida na peneira de 0,42 mm (35 *mesh*). A menor concentração em massa (1,3%) passou pela peneira de 0,11 mm (150 *mesh*) e ficou retida no fundo.

Esteves (2011) estudou a distribuição granulométrica de uma amostra de bagaço de cana-de-açúcar, utilizando peneiras padronizadas com aberturas de 3,36; 1,68; 0,84; 0,42 e 0,21 mm, e observou que a maior fração mássica (25,7%) passou pela peneira de abertura 0,84 mm (20 *mesh*) e ficou retida na peneira de abertura 0,42 mm (35 *mesh*); 19,4% da massa ficou retida na peneira de maior abertura, 3,36 mm (6 *mesh*).

Estes resultados mostram diferença entre as distribuições granulométricas de amostras de bagaço de cana, confirmando a heterogeneidade deste material lignocelulósico (DRIEMEIER et al., 2011).

O bagaço foi então peneirado manualmente para retirada das frações de maiores tamanhos. Posteriormente, foi fracionado em peneiras com malhas padronizadas. Apenas a fração retida entre as peneiras de 20 e 65 *mesh* foi utilizada no estudo. Figura 15 apresenta os resultados da análise granulométrica do bagaço assim obtido.

Figura 15 - Distribuição granulométrica do bagaço classificado (-20/+65 *mesh*).

Fonte: Arquivo pessoal.

No material classificado, a maior parte da massa (62,25%) ficou retida na peneira de abertura de 0,42 mm (35 *mesh*), seguida pela peneira de abertura de 0,21 mm (65 *mesh*) que reteve 32,25% da massa de bagaço.

4.1.2. Composição química do bagaço de cana-de-açúcar

As composições químicas do bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, integral e classificado, estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 – Composição química do bagaço de cana *in natura**

Componentes (%)	Bagaço integral	Bagaço classificado
Glucana	46,3 ± 1,0	45,1 ± 0,6
Xilana	20,6 ± 0,4	23,7 ± 0,4
Arabinana	2,0 ± 0,0	2,1 ± 0,2
Acetil	3,2 ± 0,2	3,9 ± 0,1
Lignina Insolúvel	17,1 ± 0,3	16,6 ± 0,6
Lignina Solúvel	3,5 ± 0,3	4,1 ± 0,1
Extrativos	5,6 ± 0,4	3,3 ± 0,7
Cinzas	4,3 ± 0,1	2,5 ± 0,4

* O desvio padrão do bagaço integral foi calculado a partir de duplicatas; já o desvio padrão do bagaço classificado foi calculado a partir de triplicatas.

Comparando-se estatisticamente a composição química do bagaço integral e do bagaço classificado, os teores de xilana, acetil, extrativos e cinzas apresentaram diferenças significativas ao nível de 5% ($p < 0,05$).

Dos trabalhos utilizados como referência (Tabela 1), apenas Canilha et al. (2011) e Templeton et al. (2010) especificaram a granulometria do material utilizado, que foi bem próxima daquela usada neste estudo. Canilha et al. (2011) utilizaram bagaço que passou pela peneira de malha de 0,84 mm (20 *mesh*); Templeton et al. (2010), material com granulometria entre 0,84 mm (20 *mesh*) e 0,19 mm (74 *mesh*). A composição do bagaço fracionado aproxima-se dos valores encontrados por Canilha et al. (2011), à exceção dos teores de extrativos e acetil. Os bagaços de cana utilizados por Milne et al. (1992), Seabra et al. (2010) e Templeton et al. (2010) apresentaram composições químicas muito semelhantes entre si, mas consideravelmente diferentes dos valores encontrados no presente estudo no que se refere aos teores de glucana, lignina e extrativos.

4.2. Fracionamento do bagaço de cana-de-açúcar

4.2.1. Compilação dos resultados

A tabela 5 compila os valores das principais variáveis resposta determinadas para os experimentos do planejamento fatorial composto.

Tabela 5 - Compilação dos valores das variáveis resposta determinadas para os experimentos do planejamento fatorial composto

Exp.	$R_{G+X(S+L)}$	$R_G(S+L)$	$R_X(S+L)$	$R_G(S)$	$R_G(L)$	$R_X(L)$	$R_X(S)$	$S_G(S)$	$S_X(L)$	$P_G(S)$	$P_X(L)$	$C_G(L)$	$C_X(L)$	$C_{G+X(L)}$
1	62,6	58,3	70,8	56,5	1,8	47,4	23,5	96,9	66,9	56,3	38,7	0,1	1,0	1,1
2	58,7	44,5	85,6	41,7	2,8	73,9	11,8	93,6	86,3	36,9	36,2	0,1	1,5	1,6
3	28,7	28,9	28,4	25,7	3,2	28,4	0,0	88,8	100	25,9	67,0	0,1	0,6	0,7
4	51,7	66,1	24,2	50,8	15,4	24,2	0,0	76,8	100	51,5	48,8	0,6	0,5	1,1
5	63,9	60,1	71,1	56,0	4,1	65,6	5,5	93,2	92,2	48,6	84,1	0,2	1,4	1,5
6	63,9	63,6	64,7	59,3	4,2	64,7	0,0	93,4	100	59,0	62,4	0,2	1,4	1,5
7	31,5	42,0	11,7	36,6	5,4	11,7	0,0	87,2	100	43,7	27,7	0,3	0,3	0,5
8	40,6	55,1	13,1	50,5	4,6	6,9	6,2	91,6	52,4	50,1	23,8	0,2	0,1	0,3
9	57,4	50,5	70,5	50,5	0,0	54,9	15,6	100	77,9	47,8	60,7	0,0	1,1	1,1
10	66,8	58,3	82,9	53,1	5,2	71,7	11,2	91,1	86,5	49,7	96,8	0,2	1,5	1,7
11	47,3	54,8	32,8	52,1	2,7	32,8	0,0	95,1	100	51,2	45,4	0,1	0,7	0,8
12	60,6	71,2	40,3	57,2	14,0	40,3	0,0	80,3	100	54,2	60,4	0,5	0,8	1,4
13	36,7	33,0	43,8	30,1	2,9	43,8	0,0	91,3	100	30,4	91,5	0,1	0,9	1,0
14	68,6	69,6	66,7	63,9	5,8	66,7	0,0	91,7	100	59,4	47,0	0,2	1,4	1,7
15	38,4	51,5	13,5	45,5	6,0	13,5	0,0	88,3	100	44,5	24,1	0,2	0,3	0,5
16	66,3	85,5	30,0	51,7	33,8	30,0	0,0	60,4	100	51,1	46,9	1,3	0,6	2,0
17	65,4	55,6	84,1	51,9	3,8	71,3	12,8	93,2	84,8	51,1	54,3	0,1	1,4	1,5
18	60,9	59,0	64,5	57,0	2,0	54,7	9,9	96,6	84,7	55,2	39,4	0,1	1,0	1,1
19	41,8	60,7	5,9	60,7	0,0	5,9	0,0	100	100	58,5	14,3	0,0	0,1	0,1
20	51,1	62,8	28,9	58,8	4,0	28,9	0,0	93,6	100	58,1	32,9	0,1	0,5	0,7
21	60,8	66,1	50,7	60,5	5,6	50,7	0,0	91,5	100	61,5	45,3	0,2	0,9	1,1
22	68,6	70,0	65,9	62,4	7,5	65,9	0,0	89,2	100	59,6	51,7	0,3	1,3	1,5
23	46,0	61,3	17,0	56,5	4,8	17,0	0,0	92,22	100	54,1	22,4	0,2	0,3	0,5
24	59,2	72,4	34,2	54,5	17,8	34,2	0,0	75,4	100	58,9	43,4	0,6	0,6	1,3
25	61,9	58,8	67,9	58,8	0,0	55,4	12,4	100	81,7	54,7	48,6	0,0	1,0	1,0

Exp.	$R_{G+X(S+L)}$	$R_G(S+L)$	$R_X(S+L)$	$R_G(S)$	$R_G(L)$	$R_X(L)$	$R_X(S)$	$S_G(S)$	$S_X(L)$	$P_G(S)$	$P_X(L)$	$C_G(L)$	$C_X(L)$	$C_{G+X(L)}$
26	73,7	75,4	70,4	56,9	18,5	57,2	13,2	75,5	81,3	51,3	34,0	0,7	1,1	1,8
27	57,9	66,6	41,3	59,5	7,1	41,3	0,0	89,3	100	55,5	29,8	0,2	0,8	1,0
28	62,2	64,0	58,9	56,3	7,7	58,9	0,0	88,0	100	54,0	53,3	0,3	1,1	1,4
29	38,5	56,6	4,1	56,6	0,0	4,1	0,0	100	100	53,1	13,1	0,0	0,1	0,1
30	63,2	65,4	59,2	53,7	11,7	52,8	6,4	82,1	89,3	54,8	41,2	0,4	1,0	1,4
31	48,6	62,2	22,7	52,8	9,3	22,7	0,0	85,0	100	51,4	24,5	0,3	0,4	0,8
32	41,8	52,6	21,3	43,5	9,0	17,7	3,5	82,8	83,5	46,6	18,3	0,3	0,3	0,6
33	54,2	56,2	50,4	54,3	1,9	50,4	0,0	96,6	100	51,9	42,1	0,1	1,0	1,1
34	53,3	55,7	48,7	52,7	3,1	48,7	0,0	94,5	100	51,7	34,3	0,1	1,0	1,1
35	56,6	52,0	65,4	52,0	0,0	43,0	22,4	100	65,7	43,6	21,9	0,0	0,8	0,8
36	43,1	61,5	8,3	40,2	21,2	8,3	0,0	65,5	100	46,6	8,6	0,8	0,2	0,9
37	54,7	52,2	59,5	52,2	0,0	49,7	9,8	100	83,6	47,7	26,8	0,0	0,9	0,9
38	50,6	63,2	26,5	54,4	8,8	26,5	0,0	86,1	100	52,1	29,4	0,3	0,5	0,8
39	63,2	64,8	60,3	56,2	8,6	60,3	0,0	86,7	100	52,0	32,4	0,3	1,2	1,5
40	49,9	53,9	42,5	50,2	3,6	42,5	0,0	93,3	100	49,0	35,8	0,1	0,9	1,0
41	57,2	65,1	42,0	51,9	13,2	42,0	0,0	79,7	100	51,2	48,4	0,5	0,9	1,5
42	58,1	60,0	54,6	56,4	3,6	54,6	0,0	94,1	100	56,0	34,6	0,1	0,9	1,0
43	50,7	52,0	48,2	47,7	4,2	41,6	6,6	91,8	86,2	53,5	37,0	0,2	0,8	1,0
44	52,1	54,0	48,5	43,0	11,0	48,5	0,0	79,7	100	43,7	45,1	0,4	1,0	1,4
45	53,0	55,4	48,3	51,6	3,8	48,3	0,0	93,2	100	53,2	40,6	0,1	0,9	1,1
46	40,0	34,7	50,0	31,6	3,2	50,0	0,0	90,8	100	31,7	41,0	0,1	1,0	1,1
47	55,8	61,1	45,8	58,4	2,7	45,8	0,0	95,6	100	52,7	44,9	0,1	0,9	1,0
48	50,1	56,3	38,4	53,2	3,1	38,4	0,0	94,6	100	53,7	37,8	0,1	0,8	0,9
49	58,1	59,6	55,1	56,2	3,4	55,1	0,0	94,2	100	51,5	43,1	0,1	1,1	1,2
50	41,1	53,1	18,3	53,1	0,0	18,3	0,0	100	100	52,2	31,8	0,0	0,3	0,3

* As siglas das variáveis resposta, bem como as unidades, estão explicitadas no item 3.2.3.

As amplitudes verificadas para as variáveis-resposta $R_{G+X(S+L)}$, $R_{G(S+L)}$, $R_{X(S+L)}$, $R_{G(S)}$, $R_{X(S)}$, $R_{G(L)}$ e $R_{X(L)}$ estão compiladas na Figura 16.

Figura 16 - Amplitude dos valores de rendimento de recuperação, de glucana e xilana, nas frações sólida e líquida.

Fonte: Arquivo pessoal.

Em termos de rendimento global de glucana e xilana, nas frações sólida e líquida ($R_{G+X(S+L)}$), a condição 26 apresentou o melhor resultado (73,7%). Zhang e colaboradores (2007), fracionando palha de milho com ácido fosfórico a 84%, temperatura de 50 °C, 45 min de tempo de reação, 120 mL de acetona e 120 mL de água, obtiveram 94,3% de $R_{G+X(S+L)}$. Sathitsuksanoh et al. (2012a), fracionando uma mistura de 'miscanthus' e álamo com ácido fosfórico a 84,5%, temperatura de 50 °C, 60 min de tempo de reação, 40 mL de etanol e 80 mL de água, obtiveram um rendimento de 95,5%.

Com relação aos valores de $R_{G(S+L)}$, o melhor rendimento (85,5%) foi obtido na condição 16 (ácido fosfórico a 83,8%, temperatura de 54,2 °C, 93,9 min de tempo de reação, 108,4 mL de acetona e 131,6 mL de água); o pior (28,9%), na condição 3. Zhang e colaboradores (2007), fracionando palha de milho, obtiveram 97,6% de rendimento de glucana; também considerando a recuperação nas frações sólida e líquida.

O maior valor de $R_{G(S)}$ (63,9%) foi obtido na condição 14; o menor (25,7%), na condição 3.

Estes dados mostram que, no que concerne a recuperação de glucana, a consideração conjunta das frações sólida e líquida, ao invés da consideração isolada da fração sólida, aumenta o rendimento de 63,9% para 85,5%.

Em relação aos valores de $R_{x(S+L)}$, o maior valor (85,6%) foi obtido na condição 2 (ácido fosfórico a 83,8%, temperatura de 45,8 °C, 56,1 min de tempo de reação, 91,6 mL de acetona e 131,6 mL de água); o menor (4,1%), na condição 29. Verificou-se que o maior valor de rendimento de recuperação de xilana nas frações sólida e líquida observado no presente estudo foi próximo daqueles reportados na literatura: 88,4% em palha de milho (ZHANG et al., 2007), 89,7% em junco (SATHITSUKSANOH et al., 2009) e 87,4% em uma mistura de 'miscanthus' e álamo (Sathitsuksano et al., 2012a).

O maior valor de $R_{x(L)}$ (73,9%) também foi obtido na condição 2; inclusive, tendo sido superior àqueles reportados por Zhang et al. (2007), 70,8% em palha de milho, por Sathitsuksano et al. (2009), 54,9% em junco, e por Sathitsuksano et al. (2012a), 65,9% em uma mistura de 'miscanthus' e álamo.

Novamente, a consideração conjunta de duas frações (sólida e líquida), ao invés da consideração isolada de uma única fração (líquida, no caso), aumentou o rendimento de recuperação do açúcar em questão (xilana); de 73,9% para 85,6%.

As amplitudes verificadas para a concentração de açúcares na fração líquida, parâmetro também considerado muito importante para a avaliação do fracionamento, em razão da utilização na produção subsequente de etanol, são apresentadas na Figura 17.

Figura 17 - Amplitude dos valores de concentração de glicose e xilose na fração líquida.

Fonte: Arquivo pessoal.

Conforme pode ser observado, a maior concentração de glicose (1,3 g/L), encontrada exclusivamente na forma oligomérica, foi obtida no experimento 16; em vários experimentos não se detectou a presença deste açúcar na fração líquida.

Em relação à concentração de xilose, também encontrada exclusivamente na forma

oligomérica, a maior concentração (1,5 g/L) foi obtida nos experimentos 2 e 10; a menor (0,1 g/L), nos experimentos 8, 19 e 29.

Considerando a utilização destes açúcares para a produção de etanol por via fermentativa, constata-se a necessidade imperativa de prévia sacarificação e concentração.

A Figura 18 apresenta as amplitudes determinadas para a seletividade do fracionamento; glucana na fração sólida, e xilana na fração líquida.

Figura 18 - Amplitude dos valores de seletividade do fracionamento, para glucana na fração sólida, e para xilana na fração líquida.

Fonte: Arquivo pessoal.

Verificou-se que vários experimentos (9, 19, 25, 29, 35, 37 e 50) proporcionaram valores de $S_{G(s)}$ iguais a 100%, o que significa que, nestas condições, toda a glucana recuperada, assim o foi na fração sólida. Os valores de $R_{G(s)}$ obtidos nestes experimentos, entretanto, não passaram de 60,7%: 50,5%, 60,7%, 58,8%, 56,6%, 52,0%, e 52,2%; respectivamente.

Comportamento semelhante foi observado para os valores de $S_{x(L)}$, em que os experimentos 3 a 4, 6 a 7, 11 a 16, 19 a 24, 27 a 29, 31, 33 a 34, 36, 38 a 42, e 44 a 50 também proporcionaram valores de seletividade para a recuperação de xilana na fração líquida iguais a 100%; mas rendimentos de recuperação deste açúcar nesta fração ($R_{x(L)}$) variando entre 4,1 e 66,7%.

Neste contexto, é válido mencionar que, nos trabalhos compilados na Tabela 2, os valores de seletividade para a recuperação de glucana na fase sólida foram relativamente altos, variando entre 86,6 e 100%; ocorrendo em associação a valores de recuperação de glucana e xilana nas frações sólida e líquida próximos aos máximos teóricos (92,9 a 96,9%). No que se refere aos valores de seletividade para a recuperação de xilana na fase líquida, entretanto, os valores compilados na mesma Tabela não passaram de 80%; chegando a 49,5% no fracionamento de fibra de cânhamo com ácido fosfórico a 84% durante 60 min a 50 °C.

Por fim, a Figura 19 apresenta as amplitudes verificadas para as purezas, de glucana na fração sólida ($P_{G(S)}$), e de xilana na fração líquida ($P_{X(L)}$).

Figura 19 - Amplitude dos valores de pureza, para glucana na fração sólida, e para xilana na fração líquida.

Fonte: Arquivo pessoal.

A condição experimental que apresentou o maior valor de $P_{G(S)}$ (61,5%) foi a 21; a que apresentou o menor valor (25,9%), a 3. Com relação aos valores de $P_{X(L)}$, a maior pureza (96,8%) foi obtida na condição 10; a menor (8,6%), na condição 36.

Uma maior pureza de glucana na fração sólida é um indicativo de melhor digestibilidade enzimática; da mesma forma, uma maior pureza de xilana na fração líquida é um indicativo de melhor fermentabilidade. Entretanto, estes parâmetros também se subordinam aos respectivos rendimentos de recuperação de açúcares ($R_{G(S)}$, e $R_{X(L)}$), que, nos experimentos 21 (60,5%) e 10 (71,7%), foram consideravelmente menores que 100%.

4.2.2. Análise estatística

Para elaboração dos modelos empíricos visando às predições das variáveis dependentes em função dos níveis das variáveis independentes, utilizou-se a metodologia descrita no item 3.2.4.

4.2.2.1. Elaboração do modelo empírico para predição do rendimento global de glucana e xilana, nas frações sólida e líquida

Na Tabela 6, são apresentados os valores dos coeficientes de regressão mantidos no modelo que relaciona a variável dependente com as variáveis que a influenciam, bem como seus respectivos níveis de significância.

Tabela 6 - Valores dos coeficientes de regressão do modelo usado para a predição do rendimento global após o fracionamento

Fator	Coeficiente	Erro-padrão	t_{calc}	p
Constante	53,75	1,19		
A	3,89	1,28	3,05	0,0038
B	-5,31	1,28	-4,16	0,0001

A= Concentração do ácido fosfórico; B= Temperatura.

De acordo com os dados apresentados, o modelo que relaciona o $R_{G+X(S+L)}$ com as variáveis independentes é fornecido pela Equação 23.

$$R_{G+X(S+L)} = 53,75 + 3,89 A - 5,31 B \quad (23)$$

Onde $R_{G+X(S+L)}$ é o rendimento de glucana e xilana nas frações sólida e líquida, obtido em função dos valores codificados de concentração de ácido (A) e temperatura (B).

A análise de variância do modelo (Tabela 7) mostra que o mesmo é significativo e não apresenta falta de ajuste.

Tabela 7 – Análise de variância do modelo proposto para a predição do rendimento global após o fracionamento

CV	GL	SQ	MQ	F_{calc}	p
Modelo	2	1877,37	938,69	13,31	< 0,0001
Resíduo	47	3315,69	70,55		
Falta de ajuste	40	3023,23	75,58	1,81	0,2109
Erro puro	7	292,46	41,78		
Total	49	5193,06			

CV= causa de variação; GL= graus de liberdade; SQ= soma quadrática; MQ= média quadrática.

Conforme pode ser observado na Tabela 8, o valor do resíduo chegou a -18,46% (experimento 13); o que significa que o valor de $R_{G+X(S+L)}$ obtido experimentalmente (36,71%) foi 18,46% menor que aquele determinado utilizando o modelo ajustado aos dados experimentais (55,17%).

Tabela 8 - Comparação entre os valores obtidos experimentalmente (reais) e aqueles determinados utilizando o modelo ajustado aos dados experimentais (preditos), com as respectivas diferenças (resíduos), para o rendimento global após o fracionamento

Exp.	Valor Real	Valor Predito	Resíduo	Exp.	Valor Real	Valor Predito	Resíduo
1	62,64	55,17	7,47	26	73,68	62,95	10,73
2	58,68	62,95	-4,27	27	57,90	44,54	13,36
3	28,74	44,54	-15,80	28	62,23	52,32	9,91
4	51,67	52,32	-0,65	29	38,51	55,17	-16,66
5	63,91	55,17	8,74	30	63,24	62,95	0,29
6	63,95	62,95	1,00	31	48,56	44,54	4,02
7	31,53	44,54	-13,01	32	41,78	52,32	-10,54
8	40,62	52,32	-11,70	33	54,18	44,49	9,69
9	57,37	55,17	2,20	34	53,30	63,00	-9,70
10	66,82	62,95	3,87	35	56,61	66,38	-9,77
11	47,26	44,54	2,72	36	43,13	41,11	2,02
12	60,58	52,32	8,26	37	54,72	53,75	0,97
13	36,71	55,17	-18,46	38	50,55	53,75	-3,20
14	68,64	62,95	5,69	39	63,22	53,75	9,47
15	38,39	44,54	-6,15	40	49,93	53,75	-3,82
16	66,34	52,32	14,02	41	57,17	53,75	3,42
17	65,45	55,17	10,28	42	58,13	53,75	4,38
18	60,93	62,95	-2,02	43	50,69	53,75	-3,06
19	41,81	44,54	-2,73	44	52,13	53,75	-1,62
20	51,12	52,32	-1,20	45	52,98	53,75	-0,77
21	60,76	55,17	5,59	46	40,00	53,75	-13,75
22	68,55	62,95	5,60	47	55,81	53,75	2,06
23	46,01	44,54	1,47	48	50,13	53,75	-3,62
24	59,20	52,32	6,88	49	58,06	53,75	4,31
25	61,90	55,17	6,73	50	41,06	53,75	-12,69

RSD = 15%

A superfície de resposta descrita pela Equação 23 é apresentada na Figura 20, mostrando que o valor de $R_{G + X(S + L)}$ é otimizado com o aumento da concentração de ácido e com a diminuição da temperatura; sendo o efeito da última, mais pronunciado que o da primeira.

Figura 20 - Gráfico de superfície de resposta que relaciona o valor de $R_{G+X(S+L)}$ em função da concentração de ácido e da temperatura empregadas durante o fracionamento.

Fonte: Arquivo pessoal.

4.2.2.2. Elaboração do modelo empírico para predição do rendimento de xilana, nas frações sólida e líquida

A Tabela 9 apresenta os valores dos coeficientes de regressão mantidos no modelo que relaciona o $R_{X(S+L)}$ com as variáveis significativas, bem como seus respectivos níveis de significância.

Tabela 9 - Valores dos coeficientes de regressão do modelo usado para a predição do $R_{X(S+L)}$ após o fracionamento

Fator	Coeficiente	Erro-padrão	t_{calc}	p
Constante	45,16	1,78		
A	3,94	1,91	2,06	0,0449
B	-16,96	1,91	-8,88	< 0,0001
C	-8,00	1,91	-4,19	0,0001

A= Concentração do ácido fosfórico; B= Temperatura; C= Tempo.

De acordo com os dados apresentados, o modelo que relaciona a variável dependente com as variáveis independentes que a influenciam é fornecido pela Equação 24.

$$R_{X(S+L)} = 45,16 + 3,94 A - 16,96 B - 8,00 C \quad (24)$$

Onde $R_{X(S+L)}$ pode ser determinado em função dos valores codificados da concentração de ácido (A), temperatura (B) e tempo (C).

A análise de variância do modelo (Tabela 10) mostra que o mesmo é significativo e não apresenta falta de ajuste.

Tabela 10 – Análise de variância do modelo proposto para a predição do $R_{X(S+L)}$ após o fracionamento

CV	GL	SQ	MQ	F_{calc}	p
Modelo	3	15899,31	5299,77	33,52	< 0,0001
Resíduo	46	7272,43	158,10		
Falta de ajuste	39	6359,63	163,07	1,25	0,4076
Erro puro	7	912,81	130,40		
Total	49	23171,75			

CV= causa de variação; GL= graus de liberdade; SQ= soma quadrática; MQ= média quadrática.

Na Tabela 11, pode-se observar que o valor do resíduo chegou a -46,10% (experimento 29); mostrando um desvio excessivo do valor obtido em relação ao valor esperado para esta condição de fracionamento.

Tabela 11 - Comparação entre os valores obtidos experimentalmente (reais) e aqueles determinados utilizando o modelo ajustado aos dados experimentais (preditos), com as respectivas diferenças (resíduos), para o rendimento de xilana nas frações sólida e líquida após o fracionamento

Exp.	Valor Real	Valor Predito	Resíduo	Exp.	Valor Real	Valor Predito	Resíduo
1	70,81	66,18	4,63	26	70,39	74,05	-3,66
2	85,64	74,05	11,59	27	41,34	32,26	9,08
3	28,38	32,26	-3,88	28	58,92	40,14	18,78
4	24,22	40,14	-15,92	29	4,07	50,17	-46,10
5	71,15	50,17	20,98	30	59,16	58,05	1,11
6	64,69	58,05	6,64	31	22,68	16,26	6,42
7	11,65	16,26	-4,61	32	21,26	24,14	-2,88
8	13,12	24,14	-11,02	33	50,39	35,79	14,60
9	70,47	66,18	4,29	34	48,68	54,52	-5,84
10	82,94	74,05	8,89	35	65,37	85,49	-20,12
11	32,85	32,26	0,59	36	8,28	4,82	3,46
12	40,31	40,14	0,17	37	59,49	64,19	-4,70
13	43,81	50,17	-6,36	38	26,51	26,13	0,38
14	66,74	58,05	8,69	39	60,29	45,16	15,13
15	13,46	16,26	-2,80	40	42,46	45,16	-2,70
16	29,97	24,14	5,83	41	42,01	45,16	-3,15
17	84,09	66,18	17,91	42	54,60	45,16	9,44
18	64,54	74,05	-9,51	43	48,22	45,16	3,06
19	5,90	32,26	-26,36	44	48,50	45,16	3,34
20	28,93	40,14	-11,21	45	48,32	45,16	3,16
21	50,65	50,17	0,48	46	50,00	45,16	4,84
22	65,88	58,05	7,83	47	45,79	45,16	0,63
23	17,04	16,26	0,78	48	38,43	45,16	-6,73
24	34,16	24,14	10,02	49	55,13	45,16	9,97
25	67,86	66,18	1,68	50	18,27	45,16	-26,89

RSD = 27%

As superfícies de resposta descritas pela Equação 24 são apresentadas na Figura 21. O gráfico que relaciona $R_{X(S+L)}$ com concentração de ácido e temperatura (Figura 21A) mostra que a variável resposta é otimizada com o aumento da concentração do ácido e com a diminuição da temperatura. Por sua vez, a superfície de resposta para $R_{X(S+L)}$ em função da concentração de ácido e do tempo (Figura 21B) mostra que o rendimento de recuperação é otimizado com o aumento da concentração do ácido e com a diminuição do tempo. Por fim, o gráfico que relaciona a variável dependente com o tempo e a temperatura (Figura 21C) mostra um aumento da primeira associado à diminuição dos últimos.

O efeito mais pronunciado da temperatura em relação àqueles da concentração de ácido e do tempo de pré-tratamento é evidenciado tanto pelas inclinações das curvas de

superfície de resposta (Figura 21) quanto pelos coeficientes de regressão do modelo ajustado aos dados experimentais (Equação 24).

Figura 21 - Gráfico de superfície de resposta que relaciona o valor de $R_X(S+L)$ em função (A) da concentração de ácido e temperatura, (B) da concentração de ácido e tempo, e (C) do tempo e temperatura empregados durante o fracionamento.

Fonte: Arquivo pessoal.

4.2.2.3. Elaboração do modelo empírico para predição do rendimento de glucana, nas frações sólida e líquida

A Tabela 12 apresenta os valores dos coeficientes de regressão mantidos no modelo que relaciona o valor de $R_{G(S+L)}$ com as variáveis que o influenciam, bem como seus respectivos níveis de significância.

Tabela 12 - Valores dos coeficientes de regressão do modelo usado para a predição do $R_{G(S+L)}$ após o fracionamento

Fator	Coeficiente	Erro-padrão	t_{calc}	p
Constante	58,26	1,33		
A	3,86	1,43	2,71	0,0094
E	2,40	1,43	1,68	0,0991

A= Concentração do ácido fosfórico; E= Volume de água.

De acordo com os dados, o modelo que relaciona o $R_{G(S+L)}$ com as variáveis independentes que o influenciam é fornecido pela Equação 25.

$$R_{G(S+L)} = 58,26 + 3,86 A + 2,40 E \quad (25)$$

Com o uso desta equação, o valor predito para $R_{G(S+L)}$ pode ser determinado a partir dos valores codificados de concentração de ácido (A) e volume de água (E).

Enquanto a concentração do ácido influencia o $R_{G(S+L)}$ com um nível de significância de 5%, a influência exercida pelo volume de água utilizado na segunda extração (após a extração com acetona) só é significativa quando se considera um nível de significância igual a 10%.

A análise de variância do modelo (Tabela 13) mostra que o mesmo é significativo e não apresenta falta de ajuste.

Tabela 13 - Análise de variância do modelo proposto para a predição do $R_{G(S+L)}$ após o fracionamento

CV	GL	SQ	MQ	F_{calc}	p
Modelo	2	896,41	448,20	5,08	0,0100
Resíduo	47	4145,65	88,21		
Falta de ajuste	40	3685,01	92,13	1,40	0,3398
Erro puro	7	460,64	65,81		
Total	49	5042,06			

CV= causa de variação; GL= graus de liberdade; SQ= soma quadrática; MQ= média quadrática.

Conforme pode ser observado na Tabela 14, o valor do resíduo chegou a 25,73%; no experimento 16.

Tabela 14 - Comparação entre os valores obtidos experimentalmente (reais) e aqueles determinados utilizando o modelo ajustado aos dados experimentais (preditos), com as respectivas diferenças (resíduos), para o rendimento de glucana nas frações sólida e líquida após o fracionamento.

Exp.	Valor Real	Valor Predito	Resíduo	Exp.	Valor Real	Valor Predito	Resíduo
1	58,34	52,00	6,34	26	75,40	64,53	10,87
2	44,50	59,73	-15,23	27	66,61	56,80	9,81
3	28,93	52,00	-23,07	28	63,98	64,53	-0,55
4	66,11	59,73	6,38	29	56,63	56,80	-0,17
5	60,11	52,00	8,11	30	65,39	64,53	0,86
6	63,55	59,73	3,82	31	62,17	56,80	5,37
7	41,98	52,00	-10,02	32	52,57	64,53	-11,96
8	55,09	59,73	-4,64	33	56,17	49,07	7,10
9	50,48	52,00	-1,52	34	55,73	67,45	-11,72
10	58,34	59,73	-1,39	35	52,01	58,26	-6,25
11	54,84	52,00	2,84	36	61,45	58,26	3,19
12	71,24	59,73	11,51	37	52,22	58,26	-6,04
13	32,98	52,00	-19,02	38	63,19	58,26	4,93
14	69,64	59,73	9,91	39	64,76	58,26	6,5
15	51,50	52,00	-0,50	40	53,85	58,26	-4,41
16	85,46	59,73	25,73	41	65,14	52,55	12,59
17	55,64	56,80	-1,16	42	59,99	63,97	-3,98
18	59,03	64,53	-5,5	43	51,98	58,26	-6,28
19	60,70	56,80	3,9	44	54,04	58,26	-4,22
20	62,80	64,53	-1,73	45	55,43	58,26	-2,83
21	66,08	56,80	9,28	46	34,74	58,26	-23,52
22	69,96	64,53	5,43	47	61,08	58,26	2,82
23	61,25	56,80	4,45	48	56,29	58,26	-1,97
24	72,36	64,53	7,83	49	59,61	58,26	1,35
25	58,77	56,80	1,97	50	53,05	58,26	-5,21

RSD = 16%

A superfície de resposta descrita pela Equação 25 é apresentada na Figura 22, mostrando que o valor de $R_{G(S+L)}$ é otimizado com o aumento da concentração de ácido e do volume de água; sendo o efeito da primeira, mais pronunciado (e estatisticamente significativo) que o do último.

Figura 22 - Gráfico de superfície de resposta que relaciona $R_{G(S+L)}$ em função da concentração de ácido e volume de água empregados durante o fracionamento.

Fonte: Arquivo pessoal.

4.2.2.4. Elaboração do modelo empírico para predição da concentração conjunta de glicose e xilose, na fração líquida

Na Tabela 15, são apresentados os valores dos coeficientes de regressão mantidos no modelo que relaciona a variável dependente com as variáveis que a influenciam, bem como seus respectivos níveis de significância.

Tabela 15 - Valores dos coeficientes de regressão do modelo usado para a predição da concentração de açúcares no líquido após o fracionamento

Fator	Coefficiente	Erro-padrão	t_{calc}	p
Constante	1,05	0,052		
A	0,17	0,056	3,04	0,0039
B	-0,16	0,056	-2,92	0,0053

A= Concentração do ácido fosfórico; B= Temperatura.

De acordo com os dados apresentados, o modelo que relaciona o $C_{G+X(L)}$ com as variáveis independentes é fornecido pela Equação 26.

$$C_{G+X(L)} = 1,05 + 0,17 A - 0,16 B \quad (26)$$

Onde $C_{G + X(L)}$ é a concentração de glicose e xilose na fração líquida, obtida em função dos valores codificados de concentração de ácido (A) e temperatura (B).

A análise de variância do modelo (Tabela 16) mostra que o mesmo é significativo e não apresenta falta de ajuste.

Tabela 16 – Análise de variância do modelo proposto para a predição da concentração de açúcares no líquido após o fracionamento

CV	GL	SQ	MQ	F_{calc}	p
Modelo	2	2,44	1,22	8,88	0,0005
Resíduo	47	6,45	0,14		
Falta de ajuste	40	5,74	0,14	1,42	0,3328
Erro puro	7	0,71	0,10		
Total	49	8,88			

CV= causa de variação; GL= graus de liberdade; SQ= soma quadrática; MQ= média quadrática.

Conforme pode ser observado na Tabela 17, o valor do resíduo chegou a -0,95 g/L (experimento 29); o que significa que o valor de $C_{G + X(L)}$ obtido experimentalmente (0,10 g/L) foi 0,95 g/L menor que aquele determinado utilizando o modelo ajustado aos dados experimentais (1,05 g/L).

Tabela 17 - Comparação entre os valores obtidos experimentalmente (reais) e aqueles determinados utilizando o modelo ajustado aos dados experimentais (preditos), com as respectivas diferenças (resíduos), para a concentração de açúcares após o fracionamento

Exp.	Valor Real	Valor Predito	Resíduo	Exp.	Valor Real	Valor Predito	Resíduo
1	1,10	1,05	0,05	26	1,80	1,39	0,41
2	1,60	1,39	0,21	27	1,00	0,72	0,28
3	0,70	0,72	-0,02	28	1,40	1,06	0,34
4	1,10	1,06	0,04	29	0,10	1,05	-0,95
5	1,60	1,05	0,55	30	1,40	1,39	0,01
6	1,60	1,39	0,21	31	0,70	0,72	-0,02
7	0,60	0,72	-0,12	32	0,60	1,06	-0,46
8	0,30	1,06	-0,76	33	1,10	0,65	0,45
9	1,10	1,05	0,05	34	1,10	1,46	-0,36
10	1,70	1,39	0,31	35	0,80	1,45	-0,65
11	0,80	0,72	0,08	36	1,00	0,66	0,34
12	1,30	1,06	0,24	37	0,90	1,05	-0,15
13	1,00	1,05	-0,05	38	0,80	1,05	-0,25
14	1,60	1,39	0,21	39	1,50	1,05	0,45
15	0,50	0,72	-0,22	40	1,00	1,05	-0,05
16	1,90	1,06	0,84	41	1,40	1,05	0,35
17	1,50	1,05	0,45	42	1,00	1,05	-0,05
18	1,10	1,39	-0,29	43	1,00	1,05	-0,05
19	0,10	0,72	-0,62	44	1,40	1,05	0,35
20	0,60	1,06	-0,46	45	1,00	1,05	-0,05
21	1,10	1,05	0,05	46	1,10	1,05	0,05
22	1,60	1,39	0,21	47	1,00	1,05	-0,05
23	0,50	0,72	-0,22	48	0,90	1,05	-0,15
24	1,20	1,06	0,14	49	1,20	1,05	0,15
25	1,00	1,05	-0,05	50	0,30	1,05	-0,75

RSD = 34%

A superfície de resposta descrita pela Equação 26 é apresentada na Figura 23, mostrando que o valor de $C_{G+X(L)}$ é otimizado com o aumento da concentração de ácido e com a diminuição da temperatura.

Figura 23 - Gráfico de superfície de resposta que relaciona o valor de $C_{G+X(L)}$ em função da concentração de ácido e da temperatura empregadas durante o fracionamento.

Fonte: Arquivo pessoal.

4.2.3. Caracterização de amostras selecionadas por difração de raios-X

Amostras do bagaço utilizado no estudo, e também das frações sólidas obtidas após o fracionamento nas condições 1 (nível -1 para todas as variáveis independentes), 43 (nível 0 para todas as variáveis independentes) e 32 (nível +1 para todas as variáveis independentes), foram caracterizadas quanto aos perfis de difração de raios-X e aos índices de cristalinidade (Figura 24).

Figura 24 - Perfis de difração de raios-X determinados para o bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e para as frações sólidas obtidas após o fracionamento nas condições 1, 43 e 32 da matriz experimental (Tabela 3).

Fonte: Arquivo pessoal.

Conforme pode ser observado, o perfil de difração de raios-X do bagaço *in natura* diferiu daqueles exibidos pelos bagaços fracionados, com índices de cristalinidade variando entre 44 e 7,9%. A diminuição do índice de cristalinidade do material após o fracionamento COSLIF mostra que a tecnologia consegue ‘amorfizar’ a celulose, conforme demonstrado anteriormente por meio de diferentes técnicas; incluindo difração de raios-X, ressonância magnética nuclear e espectroscopia de infravermelho (SATHITSUKSANO et al., 2011).

4.2.4. Interpretação dos resultados

Apesar da elevada variabilidade obtida no planejamento experimental, os resultados foram condizentes com a literatura no que diz respeito a pré-tratamentos ácidos, em que maior recuperação de açúcares se dá com aumento da concentração ácida e diminuição de tempo e temperatura.

As variáveis independentes concentração de ácido fosfórico e temperatura influenciaram as variáveis dependentes de forma semelhante, no sentido de que a otimização se dá aumentando a concentração de ácido e diminuindo a temperatura.

Para o $R_G + X (S + L)$, o efeito da temperatura (-5,31) foi maior que o efeito da concentração de ácido (+3,89). No caso do $R_G (S + L)$, o volume de água também exerceu influência, porém significativa apenas a um nível de significância de 10%; e com a concentração de ácido exercendo um efeito mais expressivo (+3,86) que o volume de água (+2,40). Para a variável $R_X (S + L)$, o tempo, além da concentração de ácido e da

temperatura, influenciou a resposta; o efeito da temperatura foi marcante (-16,96), seguido pelo tempo (-8,00) e pela concentração de ácido (+3,94). Por fim, a concentração de ácido (+0,17) e a temperatura (-0,16) exerceram efeitos de magnitude semelhante, porém sentidos opostos, na otimização da concentração de açúcares na fase líquida ($C_G + X(L)$).

Zhang et al. (2007) ajustaram a severidade do tratamento com ácido fosfórico concentrado às características da matéria-prima. Em Avicel e α -celulose, ácido fosfórico à 81,7%, temperatura ambiente e 30 min de reação foram suficientes para promover 100% de sacarificação da glucana em 3 h de hidrólise enzimática; em 'corn stover' e 'switchgrass', ácido fosfórico à 84%, temperatura de 50 °C e tempo de 45 min acarretaram em 94% de digestibilidade da glucana em 12 h. Por sua vez, utilizando ácido fosfórico à 85%, temperatura de 50 °C e tempo de 60 min, obtiveram eficiência de sacarificação de glucana de 94% em 12 h de hidrólise com 'hybrid poplar', e de 73% no mesmo tempo com 'Douglas fir'.

À parte das características da matéria-prima, e considerando os pré-tratamentos em meio ácido de uma maneira geral, a literatura suporta que o aumento da concentração ácida, associado à diminuição da temperatura e do tempo de reação, acarreta em aumento da recuperação de açúcares e em minimização da formação de inibidores.

No pré-tratamento do bagaço de cana com ácido sulfúrico diluído, por exemplo, embora o aumento da severidade tenha promovido maior eficiência de sacarificação da celulose em menor tempo de reação, também acarretou em aumento da formação de inibidores como furanos e ácidos orgânicos (ESTEVES, 2011).

Em estudo sobre o preparo de celulose amorfa com ácido fosfórico concentrado, por outro lado, Zhang et al. (2006) deixaram claro que o intumescimento e a dissolução da celulose são dois fenômenos completamente diferentes; e que é preciso dissolver (preparar uma solução límpida) antes de efetuar a precipitação, para garantir eficiência e rapidez na sacarificação, e reprodutibilidade nos resultados. Durante o preparo da "celulose regenerada" a partir de celulose microcristalina (FMC PH-105), a mistura reacional foi mantida em banho de gelo, para minimizar a hidrólise de ligações glicosídicas.

De acordo com Bensah e Mensah (2013), o pré-tratamento com ácido concentrado faz uso de ácido sulfúrico (65-86%), clorídrico (41%) ou fosfórico (85%) a baixas temperaturas (30-60 °C). O "slurry" obtido ao final do pré-tratamento é diluído para que a sacarificação ocorra em temperaturas entre 70 e 121 °C, ou, alternativamente, misturado

com solventes orgânicos (acetona, por exemplo) para interrupção da reação e extração da lignina, ao que se segue a sacarificação enzimática dos polissacarídeos (mantidos na fração sólida).

De acordo com Zhang et al. (2007), a precipitação do “slurry” após o pré-tratamento com ácido fosfórico concentrado, por meio da utilização de um solvente orgânico volátil, supera, de uma só vez, três obstáculos técnicos associados ao pré-tratamento com ácidos concentrados: separação entre açúcares e ácidos, recuperação de ácidos e reconcentração de ácidos.

Entretanto, a despeito dos méritos supramencionados, o fracionamento COSLIF requer a utilização de quantidades excessivas de solventes, além de acarretar em despolimerização e perda de açúcares em temperaturas elevadas (BENSAH; MENSAH, 2013). No que tange ao uso excessivo de solventes, é possível notar, na evolução dos trabalhos do grupo do Dr. Y. H. Percival Zhang (Tabela 2), substituição (etanol, ao invés de acetona) e redução (120 para 40 mL) no volume de solvente orgânico utilizado.

4.3. Análise da variabilidade experimental

Os experimentos do ponto central do planejamento, conduzidos em octuplicatas, assim como novos experimentos nas condições 2 (maior $R_{X(S+L)}$; 85,6%), 16 (maior $R_{G(S+L)}$; 85,5%) e 26 (maior $R_{G+X(S+L)}$; 73,7%), conduzidos em triplicatas, foram analisados com vistas à interpretação da variabilidade associada aos experimentos.

A Tabela 18 compila os valores das variáveis-resposta determinadas para os experimentos supramencionados.

Tabela 18 - Variáveis-resposta determinadas para os experimentos do ponto central e para as triplicatas dos experimentos 2, 16 e 26

Exp.	$R_{G+X(S+L)}$	$R_G(S+L)$	$R_X(S+L)$	$R_G(S)$	$R_G(L)$	$R_X(L)$	$R_X(S)$	$S_G(S)$	$S_X(L)$	$P_G(S)$	$P_X(L)$	$C_G(L)$	$C_X(L)$
<i>Pln_{PC} (43)</i>	50,7	52,0	48,2	47,7	4,2	41,6	6,6	91,8	86,2	53,5	37,0	0,2	0,8
<i>Pln_{PC} (44)</i>	52,1	54,0	48,5	43,0	11,0	48,5	0,0	79,7	100	43,7	45,1	0,4	1,0
<i>Pln_{PC} (45)</i>	53,0	55,4	48,3	51,6	3,8	48,3	0,0	93,2	100	53,2	40,6	0,1	0,9
<i>Pln_{PC} (46)</i>	40,0	34,7	50,0	31,6	3,2	50,0	0,0	90,8	100	31,7	41,0	0,1	1,0
<i>Pln_{PC} (47)</i>	55,8	61,1	45,8	58,4	2,7	45,8	0,0	95,6	100	52,7	44,9	0,1	0,9
<i>Pln_{PC} (48)</i>	50,1	56,3	38,4	53,2	3,1	38,4	0,0	94,6	100	53,7	37,8	0,1	0,8
<i>Pln_{PC} (49)</i>	58,1	59,6	55,1	56,2	3,4	55,1	0,0	94,2	100	51,5	43,1	0,1	1,1
<i>Pln_{PC} (50)</i>	41,1	53,1	18,3	53,1	0,0	18,3	0,0	100	100	52,2	31,8	0,0	0,3
M	50,1	53,3	44,1	49,4	3,9	43,3	0,8	92,5	98,3	49,0	40,2	0,1	0,8
DP	6,5	8,1	11,4	8,6	3,1	11,3	2,3	5,9	4,9	7,7	4,5	0,1	0,2
<i>Trp₂ (a)</i>	51,9	41,2	72,4	38,3	2,9	68,5	3,9	93,0	94,6	37,1	41,1	0,1	1,4
<i>Trp₂ (b)</i>	49,5	59,2	30,9	59,2	0,0	21,6	9,3	100,0	69,9	50,8	29,3	0	0,4
<i>Trp₂ (c)</i>	61,3	52,0	79,0	50,2	1,7	72,5	6,5	96,7	91,8	43,4	41,6	0,1	1,5
M	54,2	50,8	60,8	49,2	1,5	54,2	6,6	96,5	85,4	43,7	37,3	0,1	1,1
DP	6,2	9,1	26,1	10,5	1,5	28,3	2,7	3,5	13,6	6,8	6,9	0,1	0,6
<i>Trp₁₆ (a)</i>	38,8	50,3	16,9	38,6	11,8	16,9	0,0	76,7	100,0	42,3	16,4	0,4	0,3
<i>Trp₁₆ (b)</i>	28,9	39,8	8,3	35,0	4,8	8,3	0,0	88,0	100,0	33,6	11,6	0,2	0,2
<i>Trp₁₆ (c)</i>	47,2	49,4	43,1	40,5	8,9	43,1	0,0	81,9	100,0	38,8	34,4	0,3	0,9
M	38,3	46,5	22,8	38,0	8,5	22,8	0,0	82,2	100,0	38,2	20,8	0,3	0,5
DP	9,1	5,8	18,1	2,8	3,5	18,1	0,0	5,7	0	4,4	12,0	0,1	0,4
<i>Trp₂₆ (a)</i>	37,0	49,5	13,1	49,5	0,0	2,1	11,1	100,0	15,8	48,6	1,2	0	0
<i>Trp₂₆ (b)</i>	18,8	26,9	3,4	26,9	0,0	0	3,4	100,0	0	26,0	0	0	0
<i>Trp₂₆ (c)</i>	22,2	31,7	4,2	31,7	0,0	0	4,2	100,0	0	31,3	0	0	0
M	26,0	36,0	6,9	36,0	0,0	0,7	6,2	100,0	5,3	35,3	0,4	0	0
DP	9,6	11,9	5,4	11,9	0,0	1,2	4,2	0	9,1	11,8	0,7	0	0

* As siglas das variáveis resposta, bem como as unidades, estão explicitadas no item 3.2.3. Pln_{PC} = Ponto central do planejamento; Trp_n = Triplicata do experimento de número n; M = média; DP = desvio padrão.

No que concerne aos principais valores de rendimento ($R_{G+X(S+L)}$, $R_{G(S+L)}$ e $R_{X(S+L)}$), a Figura 25 apresenta os dados obtidos no ponto central do planejamento fatorial.

Figura 25 - Valores de $R_{G+X(S+L)}$, $R_{G(S+L)}$ e $R_{X(S+L)}$ determinados para os experimentos do ponto central do planejamento.

Fonte: Arquivo pessoal.

Utilizando ácido fosfórico a 83%, temperatura de 50 °C, tempo de 75 min, volume de acetona de 100 mL e volume de água de 140 mL, o valor de $R_{G+X(S+L)}$ variou entre 58,1% (experimento 49) e 40% (experimento 46), com média de 50,1% e desvio-padrão de 6,5%. Por sua vez, o valor de $R_{G(S+L)}$ variou de 61,1% (experimento 47) a 34,7% (experimento 46), com média de 53,3% e desvio-padrão de 8,1%. Por fim, o valor de $R_{X(S+L)}$ variou entre 55,1% (experimento 49) e 18,3% (experimento 50), apresentando média de 44,1% e desvio-padrão de 11,4%.

Dos três parâmetros considerados, o rendimento de xilana nas frações líquida e sólida apresentou a maior amplitude; o menor valor (18,3%), coincidente com o valor do rendimento de xilana na fração líquida ($R_{X(L)}$), foi observado no experimento 50. Neste experimento, detectou-se a presença de xilose (0,35 g/L), lignina (0,26 g/L), hidróxi-metil-furfural (0,09 g/L) e cinzas (0,43 g/L) no extrato aquoso, totalizando 1,13 g/L. A análise paralela do teor de sólidos solúveis totais, por gravimetria, levou a um valor de 0,97 g/L; em concordância com a ocorrência de reações de decomposição, promovidas pela secagem do material a 105 °C (HAMES et al., 2008). O maior valor de $R_{X(S+L)}$, 55,1%, também coincidente com o valor de $R_{X(L)}$, foi observado no experimento 49. Neste experimento, as concentrações de xilose, lignina, hidróxi-metil-furfural e cinzas determinadas no extrato aquoso foram iguais a 1,06 g/L, 0,61 g/L, 0,26 g/L e 0,80 g/L (respectivamente), tendo sido observada também a presença de glicose (0,12 g/L). Os

teores de componentes mensurados totalizaram 2,85 g/L; aqueles de sólidos solúveis totais, determinados por gravimetria, 2,17 g/L.

Com relação ao rendimento de glucana nas frações sólida e líquida, o menor valor (34,7%) foi observado no experimento 46; o maior (61,1%), no experimento 47. No experimento 46, a fração sólida foi composta por 31,7% de glucana, 20,4% de lignina e 3,6% de cinzas; totalizando 55,7%. No experimento 47, por 52,7% de glucana, 21,1% de lignina e 3,6% de cinzas; totalizando 77,4%.

O menor valor de $(R_G + X_{(S+L)})$, 40,0%, foi observado no experimento 46; em que as concentrações de glicose, xilose, lignina, hidróxi-metil-furfural e cinzas determinadas no extrato aquoso foram iguais a 0,12 g/L, 0,98 g/L, 0,57 g/L, 0,26 g/L e 0,83 g/L, respectivamente. O maior valor para este parâmetro, 58,1%, foi observado no experimento 49; em que os teores de glucana, lignina e cinzas determinados na fração sólida foram iguais a 51,5%, 19,7% e 3,6%, respectivamente.

Os teores de cinzas nas frações obtidas após os fracionamentos, relativamente elevados, podem ser justificados com base na ocorrência de reações de esterificação entre o ácido fosfórico e os grupos hidroxila da celulose e da hemicelulose. Em presença de água, entretanto, o fosfato de celulose se decompõe em ácido fosfórico e celulose (ZHANG et al., 2006).

Outro aspecto demonstrado pela análise da Figura 25 consiste no comportamento relativo entre os valores de $R_G + X_{(S+L)}$, $R_G_{(S+L)}$ e $R_X_{(S+L)}$ observados nos experimentos; diferentes, mas conduzidos nas mesmas condições e analisados com os mesmos métodos. Houve consistência nos valores de rendimento determinados para os experimentos 43 a 45; e, aparentemente, também para os experimentos 47 e 48. Enquanto o experimento 46 apresentou perfil de rendimentos destoante dos demais, o experimento 50 apresentou valor de $R_X_{(S+L)}$ inferior aos demais.

Conforme já mencionado, e considerando os resultados da análise estatística, os experimentos conduzidos nas condições 2, 16 e 26 foram repetidos; em triplicatas.

Como pode ser observado na Tabela 8, um valor de 73,68% foi determinado para o rendimento global na condição 26 do planejamento, em comparação a um valor de 62,95% predito pelo modelo ajustado aos dados experimentais (Equação 23). O experimento foi conduzido com concentração de ácido fosfórico (83,8%) relativamente alta e temperatura relativamente baixa (45,8 °C), em concordância com o previsto pela superfície de resposta apresentada na Figura 20. Entretanto, contrariamente ao esperado, os valores de $R_G + X_{(S+L)}$ obtidos nas triplicatas, conduzidas nas mesmas

condições e analisadas da mesma forma, foram muito menores: 18,8%, 22,2% e 37,0% (Figura 26).

Figura 26 - Valores de $R_{G+X(S+L)}$ obtidos na condição 26 do planejamento. Trp = triplicata; Prd = predito; Pln = planejamento.

Fonte: Arquivo pessoal.

Para a condição 2 do planejamento, foi obtido um valor de 85,64% para o $R_{X(S+L)}$ (Tabela 11), comparado com o valor de 74,05% predito pelo modelo ajustado aos dados experimentais (Equação 24). O experimento replicado foi realizado com concentração de ácido relativamente alta (83,8%), temperatura relativamente baixa (45,8 °C) e tempo relativamente pequeno (56,1 min), em concordância com o previsto pela superfície de resposta apresentada na Figura 21. Entretanto, embora, em duas das replicatas, tenham sido obtidos valores próximos do esperado (72,4% e 79%), em uma das replicatas o valor de $R_{X(S+L)}$ foi muito baixo (30,9%); Figura 27.

Figura 27 – Valores de $R_{X(S+L)}$ obtidos na condição 2 do planejamento. Trp = triplicata; Prd = predito; Pln = planejamento.

Fonte: Arquivo pessoal.

De acordo com a Tabela 14, foi obtido um valor de 85,46% para o $R_G (S + L)$ na condição 16 do planejamento, comparado com um valor de 59,73% predito pelo modelo ajustado aos dados experimentais (Equação 25). Conforme o planejamento experimental, o experimento 16 foi conduzido com concentração de ácido relativamente alta (83,8%), empregando um volume de água relativamente baixo 131,6 mL. Embora menores que o rendimento predito pelo modelo, os rendimentos de recuperação de glucana obtidos nos experimentos replicados (50,3%; 39,8% e 49,4%) aproximaram-se mais do valor esperado que aquele obtido no experimento do próprio planejamento (Figura 28).

Figura 28– Valores de $R_G (S + L)$ obtidos nos experimentos de reprodutibilidade em comparação com o planejamento fatorial. Trp = triplicata; Prd = predito; Pln = planejamento.

Fonte: Arquivo pessoal.

Os dados supradescritos, por si só, evidenciam variabilidade excessiva nas composições das frações líquida e sólida, e incompatibilidade entre os valores esperados e efetivamente determinados; as quais podem ser atribuídas tanto a fatores relacionados com o modo de condução do experimento quanto a fatores relacionados ao modo de análise das frações obtidas.

Em termos de morfologia macroscópica, comparando as condições de fracionamento 2 e 16, que levaram, respectivamente, ao maior rendimento de xilana e ao maior rendimento de glucana, foi possível observar diferenças tanto no material úmido como no material seco a temperatura ambiente, conforme ilustrado na Figura 29.

Figura 29 - Amostras úmidas (A) e secas (B) das frações sólidas obtidas ao final dos fracionamentos conduzidos nas condições 2 e 16 do planejamento, respectivamente.

Fonte: Arquivo pessoal.

A fração sólida obtida na condição 2 apresentou aspecto mais grosseiro, tanto no material úmido quanto no material seco. Já a fração sólida obtida na condição 16 mostrou-se mais pulverizada (material seco), com gelificação evidente no material úmido. Tais diferenças podem ser explicadas pela severidade do pré-tratamento. Na condição 2, em que, aparentemente, foi observada menor solubilização do material durante o fracionamento, a concentração de ácido fosfórico foi mantida no nível +1 enquanto as demais variáveis foram mantidas no nível -1. Na condição 16, por outro lado, em que, aparentemente, observou-se uma maior solubilização do material durante o fracionamento, além de gelificação da fração sólida, somente o volume de água foi mantido no nível -1; todas as demais variáveis foram mantidas no nível +1, indicando uma maior severidade do pré-tratamento.

4.4. Fracionamento do bagaço de cana-de-açúcar em escala ampliada

A Figura 30 apresenta imagens representativas do fracionamento em escala ampliada, conduzido sob as condições definidas previamente.

Figura 30 – Fluxograma ilustrando as principais etapas do fracionamento em escala ampliada.

Fonte: Arquivo pessoal.

Conforme pode ser observado, houve dissolução do material durante o pré-tratamento com ácido fosfórico concentrado. Com o decorrer das extrações com acetona

e, posteriormente, com água, houve diminuição da concentração de componentes solúveis.

4.4.1. Composição das frações

O bagaço *'in natura'* seco apresentou a seguinte composição: 45,1% de glucana, 23,7% de xilana, 2,1% de arabinana, 20,7% de lignina, 3,9% de acetil e 2,5% de cinzas. Depois do pré-tratamento COSLIF: 55,6% de glucana, 7,9% de xilana, 0,2% de arabinana, 21,4% de lignina, 0,7% de acetil e 3,4% de cinzas (Figura 31).

Figura 31– Composição química do bagaço de cana-de-açúcar *'in natura'* e da fração sólida obtida após o fracionamento. As barras verticais representam o desvio padrão, calculado a partir de duplicatas.

Fonte: Arquivo pessoal.

Conforme pode ser observado na Figura 32, o fracionamento solubilizou grande parte da hemicelulose, mantendo principalmente celulose e lignina no sólido final. Além de xilana (80%), é possível observar também a remoção de arabinana (98%) e acetil (89%) após o fracionamento. A porcentagem de remoção de lignina chegou a 28%.

Figura 32– Remoção de componentes do bagaço de cana-de-açúcar após o fracionamento. As barras verticais representam o desvio padrão, calculado a partir de duplicatas.

Fonte: Arquivo pessoal.

A composição das frações líquidas, obtidas após a precipitação e extração com acetona e água, são apresentadas na Figura 33. A concentração de lignina solúvel chegou a 5 g/L na precipitação; na extração com acetona, a 3,34 g/L. Conforme esperado, a fração líquida III (extração com água) apresentou concentração de xilooligossacarídeos relativamente elevada (1,33 g/L).

Figura 33- Composição química das frações líquidas obtidas após as etapas de precipitação, extração com acetona e extração com água. As barras verticais representam o desvio padrão, calculado a partir de duplicatas.

Fonte: Arquivo pessoal.

As concentrações de sólidos solúveis e cinzas (Figura 34), determinadas por gravimetria, foram excessivas nos extratos orgânicos (fração líquida I e II). O extrato aquoso (fração líquida III), entretanto, apresentou concentrações muito menores de sólidos solúveis (4,55 g/L) e cinzas (2,62 g/L).

Figura 34- Concentrações de sólidos solúveis e cinzas determinadas nas frações líquidas obtidas após as etapas de precipitação, extração com acetona e extração com água. As barras verticais representam o desvio padrão, calculado a partir de duplicatas.

Fonte: Arquivo pessoal.

4.4.2. Parâmetros do fracionamento

Em geral, foram obtidos valores altos de rendimento e seletividade de recuperação dos principais açúcares contidos no bagaço de cana. A Tabela 19 compila os valores das variáveis-resposta determinados para os experimentos (duplicatas).

Tabela 19 – Compilação dos valores das variáveis-resposta determinadas para os experimentos de ampliação de escala

	Fracionamento 1	Fracionamento 2	Média	Desvio
$R_{G+X(S+L)}$	94,0	80,1	87,1	9,8
$P_{G+X(S+L)}$	56,0	37,8	46,9	12,9
$R_{G(S)}$	90,5	78,6	84,6	8,4
$S_{G(S)}$	94,3	96,2	95,3	1,3
$P_{G(S)}$	57,3	53,9	55,6	2,4
$R_{X(L)}$	67,5	54,4	61,0	9,3
$S_{X(L)}$	74,7	70,6	72,7	2,9
$P_{X(L)}$	36,1	16,1	26,1	14,1
$C_{G(L)}$	0,2	0,1	0,2	0,1
$C_{X(L)}$	1,3	1,1	1,2	0,1
$C_{G+X(L)}$	1,5	1,2	1,4	0,2

O valor obtido para o rendimento global ($R_{G + X (S + L)}$) do fracionamento em escala ampliada foi de 87,1%. Pode-se destacar ainda que as purezas, tanto de glucana na fração sólida quanto de xilana na fração líquida, não foram tão elevadas (55,6% e 26,1%, respectivamente).

Em relação ao particionamento de glucana e xilana após o pré-tratamento (Figura 35), fica evidenciado que a tecnologia COSLIF consegue separar a glucana no sólido e solubilizar a xilana no extrato aquoso.

Figura 35- Particionamento de glucana e xilana entre frações sólida e líquida, após o fracionamento COSLIF. As barras verticais representam o desvio padrão, calculado a partir de duplicatas.

Fonte: Arquivo pessoal.

Observa-se que, do total de glucana contida no bagaço inicial, mais de 83% permaneceu na fração sólida; apenas 4% foi solubilizada na fração líquida. E que, do total de xilana contida no bagaço integral, 23% ficou na fração sólida; enquanto que, na fração líquida, foi recuperado 66% de xilana.

4.4.3. Caracterização ultraestrutural

O bagaço foi caracterizado ultraestruturalmente, antes (seco) e após o fracionamento (úmido, e seco a temperatura ambiente), por meio da técnica de termoporometria (Figura 36).

Figura 36- Porosidade do bagaço de cana-de-açúcar, antes e após o fracionamento. As barras verticais representam o desvio padrão, calculado a partir de duplicatas.

Verificou-se que, após o fracionamento, houve um grande aumento da área superficial cumulativa para moléculas de até 10 nm (ASA_{10nm}), tanto do bagaço úmido quanto do bagaço seco, em relação ao bagaço *'in natura'*. A secagem das amostras à temperatura ambiente acarretou em uma pequena diminuição da área acessível, em relação ao bagaço úmido fracionado. Para o bagaço fracionado não seco, o valor de ASA_{10nm} foi de 166 m²/g; enquanto que, para o bagaço integral, de 43 m²/g. O valor de ASA_{10nm} para o bagaço fracionado seco foi de 160 m²/g.

As amostras também foram submetidas à análise de difração de raios-X, para inferência do grau de cristalinidade dos materiais (Figura 37).

Figura 37- Perfis de difração de raios-X determinados para o bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e para as frações sólidas obtidas após o fracionamento, antes e após secagem ao ar. As barras verticais representam o desvio padrão, calculado a partir de duplicatas.

Fonte: Arquivo pessoal.

O bagaço *'in natura'* apresentou índice de cristalinidade de 44%; no bagaço fracionado não seco, este índice caiu para 0. O bagaço que foi seco, depois de fracionado, entretanto, apresentou um índice de cristalinidade de 18%.

4.4.4. Sacarificação enzimática

São apresentadas a seguir (Figura 38) as concentrações de açúcares e as eficiências de sacarificação da glucana e da xilana contidas na fração sólida III (duplicatas).

Figura 38– Perfis das concentrações de glicose e xilose e das eficiências de sacarificação da glucana e da xilana contidas na fração sólida III. As barras verticais representam o desvio padrão, calculado a partir de duplicatas.

Fonte: Arquivo pessoal.

A digestibilidade da glucana alcançou 93% em 24 h; com 5 h de sacarificação enzimática, a conversão chegou a 80%. Em relação à digestibilidade da xilana, a conversão chegou a 70% em 24 horas; com 5 h de hidrólise enzimática, a 50%.

O bagaço de cana-de-açúcar '*in natura*' também foi submetido à hidrólise enzimática, para comparação (Figura 39).

Figura 39– Perfis das concentrações de glicose e xilose e das eficiências de sacarificação da glucana e da xilana contidas no bagaço '*in natura*'.

Fonte: Arquivo pessoal.

Conforme pode ser observado, a sacarificação do bagaço '*in natura*' propiciou uma eficiência de sacarificação da glucana igual a 18% após 24 horas de conversão; no que tange a eficiência de sacarificação da xilana, o valor chegou a 7%.

4.4.5. Interpretação dos resultados

Pela análise global dos dados do fracionamento em escala ampliada, pode-se depreender que o fracionamento COSLIF foi eficaz na recuperação e separação dos constituintes estruturais do bagaço de cana-de-açúcar. Mantendo a celulose na fração sólida e extraíndo a hemicelulose na fração líquida.

O valor obtido para o rendimento global ($R_G + X(S + L)$) em escala ampliada foi de 87,1%, valor próximo ao encontrado por Zhang e colaboradores (2007) de 94,3%, fracionando palha de milho com ácido fosfórico a 84%, temperatura de 50 °C, 45 min de tempo de reação, 120 mL de acetona e 120 mL de água. Do mesmo modo, Sathitsuksanoh et al. (2012a), fracionando uma mistura de 'miscanthus' e álamo com ácido fosfórico a 84,5%, temperatura de 50 °C, 60 min de tempo de reação, 40 mL de etanol e 80 mL de água, obtiveram um rendimento de 95,5%. Moxley et al. (2008) aplicaram o fracionamento COSLIF em fibras de cânhamo, com ácido fosfórico a 84%, 50°C por 60 min, e obtiveram 92,9% de $R_G + X(S + L)$. E Sathitsuksanoh et al. (2009) estudaram o fracionamento em junco, e obtiveram 94,7% de rendimento global.

A seletividade para a recuperação de glucana no sólido ($S_{G(S)}$), de 95,3%, foi muito próxima à obtida por Zhang e colaboradores (2007), de 95,1%; e daquela obtida por Sathitsuksanoh et al. (2009), de 96,1%. Para a seletividade de recuperação de xilana no líquido ($S_{X(L)}$), no presente estudo foi obtido 72,7%; Zhang et al., 2007 obtiveram $S_{X(L)}$ de 80,20%; Moxley et al. (2008), de 49,5%; e Sathitsuksanoh et al. (2010), de 69,1%.

Para o teor de cinzas e sólidos solúveis totais, assim como para o de lignina, ocorreu o problema de se encontrar mais ao final do fracionamento do que havia no bagaço de partida. No que diz respeito aos teores de cinzas e sólidos solúveis totais, devido ao fato de que o ácido fosfórico utilizado na primeira etapa do fracionamento gera ésteres reversíveis de celulose (Zhang et al., 2006); no que diz respeito ao teor de lignina, devido à ocorrência de reações de degradação durante o fracionamento e/ou sacarificação quantitativa (Moxley et al., 2007).

O bagaço fracionado foi hidrolisado rapidamente, com carga de enzimas igual a 10 FPU por grama de bagaço; muito provavelmente, porque o solvente de celulose (ácido fosfórico concentrado) foi capaz de romper a estrutura de compósito formada por celulose, hemicelulose e lignina, e também as fibrilas de celulose altamente ordenadas (ZHANG et al., 2007). Embora o teor de lignina no sólido fracionado tenha sido consideravelmente elevado (21%), isto não prejudicou a sacarificação; comprovando que, para a hidrólise enzimática do material fracionado por COSLIF, o aumento da área superficial acessível às enzimas é mais importante que a diminuição do teor de lignina (Rollin et al., 2011).

Sathitsuksanoh et al. (2010), aplicando o fracionamento COSLIF em bambu, alcançaram digestibilidade da glucana de 94,9% em 72 horas, com carga enzimática de 15 FPU/g; com a redução da carga enzimática em 15 vezes, alcançaram 88,2% de digestibilidade em 72 horas. Semelhantemente, Sathitsuksanoh et al. (2011), sacarificando 'switchgrass' com carga enzimática de 1 FPU/g, obtiveram 89% de conversão de glucana em glicose em 36 horas. Sathitsuksanoh (2012b), trabalhando com palha de milho, obtiveram digestibilidade de glucana de 83% em 24 horas, com carga enzimática de 5 FPU/g.

De fato, as características composicionais e estruturais das frações obtidas após o fracionamento permitem afirmar que, durante o pré-tratamento com ácido fosfórico concentrado, houve efetiva solubilização da celulose; em concordância com o exposto por Sathitsuksanoh et al. (2011). Ademais, a precipitação e a extração com acetona, além de promover a remoção de lignina, conforme denominação atribuída por Chundawat et al. (2011), também promoveu o aumento da área superficial de celulose reativa às enzimas, em concordância com o exposto por Liu et al. (2011).

4.4.6. Fermentação alcoólica

Para avaliar a fermentabilidade do hidrolisado celulósico obtido a partir do fracionamento do bagaço de cana pela técnica COSLIF, foram realizadas fermentações com a levedura *Scheffersomyces stipitis*.

As concentrações de glicose e etanol determinadas durante a fermentação do hidrolisado enzimático são apresentadas na Figura 40.

Figura 40 – Concentrações de substrato (glicose) e produto (etanol) determinadas durante a fermentação alcoólica. As barras verticais representam o desvio padrão, calculado a partir de duplicatas.

Fonte: Arquivo pessoal.

Observa-se que, durante as 48 horas de fermentação, houve consumo completo da glicose, e que a concentração de etanol alcançou 10,5 g/L. A partir das concentrações de glicose e de etanol, foram calculados os parâmetros de rendimento de conversão de glicose em etanol ($Y_{P/S}$) e produtividade volumétrica (Q_P); iguais a 0,36 g/g e 0,22 g/L h; respectivamente.

A Tabela 20, extraída de Canilha et al. (2010), mostra que valores de $Y_{P/S}$ e de Q_P variando entre 0,19 e 0,49 g/g, e entre 0,02 e 0,46 g/L h, respectivamente, já foram reportados para diferentes estirpes de *Scheffersomyces stipitis*, cultivadas em hidrolisados preparados a partir de diferentes materiais lignocelulósicos. Em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, os autores obtiveram produção de etanol igual a 7,5 g/L após 48 h de fermentação, com $Y_{P/S}$ de 0,30 g/g e Q_P de 0,16 g/L h; após destoxificação com resinas de troca iônica.

Tabela 20- Parâmetros da conversão de açúcares em etanol por diferentes estirpes de *Scheffersomyces stipitis* em hidrolisados preparados a partir de diferentes matérias-primas, extraídos da literatura

Estirpe	Matéria-prima	$Y_{P/S}$ (g/g)	Q_P (g/L h)
NRRL Y-7124	<i>Corn cob</i>	0,34	0,11
NCIM 3498	<i>Wood</i>	0,39	0,30
FPL Y-606	<i>mixed wood</i>	0,49	0,26
CBS 5773	<i>paper sludge</i>	0,25	0,33
NRRL Y-7124	<i>rice straw</i>	0,32	0,24
CBS 5773	<i>sugarcane bagasse</i>	0,38	0,46
NRRL Y-7124	<i>sunflower seed hull</i>	0,32	0,07
NRRL Y-7124	<i>water hyacinth</i>	0,19	0,02
NRRL Y-7124	<i>wheat straw</i>	0,36	0,30

Fonte: Canilha et al., 2010.

Conforme apresentado na Figura 32, durante o fracionamento COSLIF, a extração com água promoveu a remoção de oligômeros de xilose; principalmente. Como um volume muito grande de solvente foi utilizado durante a extração, a concentração no extrato foi muito pequena. Neste contexto, a supressão da última etapa de extração, com água, se apresenta como uma alternativa a ser avaliada; para aumentar a concentração de açúcares no hidrolisado enzimático, e a concentração de etanol no meio fermentado.

Li et al. (2009) avaliaram a produção de etanol a partir de '*bermudagrass*', '*reed*' e '*rapeseed*'. As melhores eficiências de sacarificação (98-99%; concentração inicial de sólidos igual a 2%) foram obtidas quando o primeiro estágio de pré-tratamento foi

conduzido com H_3PO_4 a 85%, por um período de 60 min a 50 °C. A condução da sacarificação no modo de batelada alimentada permitiu aumentar a concentração de glicose nos hidrolisados celulósicos (58-124 g/L), porém em detrimento da eficiência de sacarificação (68-73%; concentração de sólidos de até 36%). Quando a sacarificação (Celluclast 1.5 L) e a fermentação (*Saccharomyces cerevisiae*) foram conduzidas separadamente, a temperaturas de 50 e 30 °C, a concentração final de etanol chegou a 69,3 g/L; quando conduzidas simultaneamente, a temperatura de 38 °C, a 50,5 g/L. Concluiu-se que, durante o fracionamento, o aumento da concentração de H_3PO_4 e da proporção entre volume de ácido e massa de sólidos favorece a transição de fases (dissolução) da celulose; durante a sacarificação, a conversão no modo de batelada alimentada permite minimizar os problemas de homogeneização e maximizar a concentração de açúcares recuperados no hidrolisado; e que a sacarificação e a fermentação, quando conduzidas separadamente, resultam em maior eficiência de produção de etanol, devido ao favorecimento da sacarificação na temperatura de 50 °C, e da fermentação na temperatura de 30 °C.

5. CONCLUSÕES

Os experimentos de fracionamento COSLIF do bagaço fracionado por tamização estiveram associados a uma grande variabilidade experimental, atribuída a fatores não identificados, relacionados com os modos de condução do experimento e de análise das frações obtidas. Apesar disso, foi possível identificar, por meio da análise estatística, as variáveis independentes que influenciam o rendimento de recuperação de açúcares e a concentração destes no extrato aquoso.

Para o $R_{G+X(S+L)}$, as variáveis independentes que exerceram influência significativa foram a concentração de H_3PO_4 e a temperatura. Em termos quantitativos, a variável com maior poder de influência foi a temperatura (-5,31), seguida pela concentração de ácido fosfórico (+3,89).

Para o $R_{X(S+L)}$ as variáveis independentes que exerceram influência significativa foram a concentração de ácido fosfórico, a temperatura e o tempo de reação. Em termos quantitativos, a variável com maior poder de influência foi a temperatura (-16,96), seguida pelo tempo de reação (-8,00) e pela concentração de ácido fosfórico (+3,94).

Para a $C_{G+X(L)}$, as variáveis independentes que exerceram influência significativa foram a concentração de ácido fosfórico e a temperatura. Em termos quantitativos, a variável com maior poder de influência foi a concentração de ácido fosfórico (+0,17), seguida pela temperatura (-0,16).

A condição do planejamento fatorial adequada para o fracionamento foi a condição 2 (maior concentração do ácido fosfórico; menor temperatura; menor tempo; menor volume de acetona e menor volume de água).

Em escala ampliada, o rendimento de recuperação global ($R_{G+X(S+L)}$) foi de 87,1%; o rendimento de recuperação de glucana na fração sólida ($R_{G(S)}$) foi de 84,6%; e o rendimento de recuperação de xilana na fração líquida ($R_{X(L)}$) foi de 61,0%. A seletividade de recuperação de glucana na fração sólida ($S_{G(S)}$) foi de 95,3%; e a seletividade de recuperação de xilana na fração líquida ($S_{X(L)}$) foi de 72,7%.

A eficiência de sacarificação da glucana alcançou 93% em 24 horas de hidrólise, devido ao aumento da área superficial e à amorfização da celulose provocados pelo fracionamento.

A fermentação alcoólica do hidrolisado enzimático levou à produção de 10,5 g/L de etanol, com $Y_{P/S}$ de 0,36 g/g e Q_P de 0,22 g/L/h.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, R.R. **Modelagem cinética do processo de produção de etanol a partir de hidrolisado enzimático de bagaço de cana-de-açúcar concentrado com melaço considerando reciclo de células**. 2012. 284 p. Tese (Doutorado). Faculdade de Engenharia Química – UNICAMP, 2012.

BENSAH, E.C.; MENSAH, M. Chemical pretreatment methods for the production of cellulosic ethanol: technologies and innovations (Review). **International Journal of Chemical Engineering**, v. 21, p. 1-21, 2013.

BISARIA, V.S.; GHOSE, T.K. Biodegradation of cellulosic materials: substrates, microorganisms, enzymes and products. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 3, p. 90-103, 1981.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; FELIPE, M.G.A.; ALMEIDA E SILVA, J.B.; GIULIETTI, M. Ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate using *Pichia stipitis*. **Appl Biochem Biotechnol.**, v. 161, p. 84–92, 2010.

CANILHA, L.; SANTOS, V.T.O.; ESTEVES, P.J.; SANTI JR.C.; MILAGRES, A.M.F.; CARVALHO, W. Compositional analysis of sugarcane bagasse: do we need a standard protocol? In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS (SINAFERM), 18. 2011. Caxias do Sul/RS.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A.M.F. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Química Nova**, v. 32, p. 2191-2195, 2009.

CHUNDAWAT, S.P.S.; BECKHAM, G.T.; HIMMEL, M.E.; DALE, B.E. Deconstruction of Lignocellulosic Biomass to Fuels and Chemicals. **Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.**, v. 2, p. 6.1–6.25, 2011.

CONAB- Companhia Nacional de Abastecimento . Avaliação da Safra Agrícola de Cana-de-açúcar – 1ª Estimativa - 2014/2015, 2014.

DAVIES, L.M; HARRIS, P.J. Atomic microscopy of microfibrils in primary cell walls. **Planta**, v. 217, p. 283–289, 2003.

D' ALMEIDA, M.L.O. Composição química dos materiais lignocelulósicos. In: **CELULOSE E PAPEL: Tecnologia de fabricação da pasta celulósica**, 2ª ed., v. 1. São Paulo: Instituto de Pesquisas do Estado de São Paulo, 1988.

DING, S.Y.; HIMMEL, M.E. The maize primary cell wall microfibril: A new model derived from direct visualization. **J. Agric. Food Chem.**, v. 54, n. 3, p. 597-606, 2006.

DRIEMEIER, C.; MENDES, F.M.; OLIVEIRA, M.M. Dynamic vapor sorption and thermoporometry to probe water in celluloses. **Cellulose**, v. 19, p. 1051-1063, 2012.

DRIEMEIER, C.; OLIVEIRA, M.M.; MENDES, F.M.; GÓMEZ, E.O. Characterization of sugarcane bagasse powders. **Powder Technology**, v. 214, p. 111-116, 2011.

EK, M.; GELLERSTEDT, G.; HENRIKSSON, G. **Pulp and paper chemistry and technology**, v. 1. Berlin: Walter de Gruyter, 308p., 2009.

ESTEGHLALIAN, A.R.; MANSFIELD, S.D.; SADDLER, J.N. Cellulases: agents for fiber modification or bioconversion? The effect of substrate accessibility on cellulose enzymatic hydrolyzability. **Biotechnology in the Pulp and Paper Industry**, v. 21, p. 21-36, 2002.

ESTEVEZ, P.J. **Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com H₂SO₄ diluído em reator piloto aquecido por vapor direto**. 2011. 93 p. Dissertação (Mestrado) Departamento de Biotecnologia, Escola de Engenharia de Lorena, Lorena, 2011.

FAN, L.T.; GHARPURAY, M.M.; LEE, Y.H. **Cellulose hydrolysis**. New York: Springer-Verlag, 1987.

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

GLASSER, W.G.; LORA, J.H. Recent industrial applications of lignin: a sustainable alternative to nonrenewable materials. **Journal of Polymers and the Environment**, v.10, n.1-2, p. 39-48, 2002.

HAMES, B; RUIZ, R; SCARLATA, C; SLUITER, A; SLUITER, J; TEMPLETON, D. **Preparation of samples for compositional analysis**. NREL, Laboratory Analytic Procedure (LAP). Technical Report NREL/TP-510-42620., Golden, CO, 2008.

HAMES, B.R.; THOMAS, S.R.; SLUITER, A.D.; ROTH, C.J.; TEMPLETON, D.W. Rapid Biomass Analysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 105 - 108, p. 5 - 16, 2003.

HOLLADAY, J.E.; BOZELL, J.J.; WHITE, J.F. JOHNSON, D. **Top value-added chemicals from biomass, V. 2**. Springfield: United States Department of Energy., 2007.

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

JOSELEAU, J.P.; COMTAT, J.; RUEL, K. Chemical structure of xylan and their interaction in plant cell walls. **Xylans and Xylanases**, p. 1-15, 1992.

KIM, S.H.; HOLTZAPPLE, M.T. Effect of structural features on enzyme digestibility of corn stover. **Bioresour. Technol.**, v. 97, p. 583–591, 2006.

KIM, T.H.; LEE, Y.Y. Pretreatment of corn stover by soaking in aqueous ammonia. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 121, n. 124, p. 1119–1132, 2005.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, A. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v.23, p. 411-456, 1999.

LAUREANO-PEREZ, L.; TEYMOURI, F.; ALIZADEH, H.; DALE, B. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. **Appl Biochem Biotechnol.**, v. 124, n. 1, p. 1081–1099, 2005.

LI, H.; KIM, N-J.; JIANG, M.; KANG, J.W.; CHANG, H.N. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic residues pretreated with phosphoric acid–acetone for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 3245–3251, 2009.

LIU, Y-S.; BAKER, J.O.; ZENG, Y.; HIMMEL, M.E.; HAAS, T.; DING, S-Y. Cellobiohydrolase hydrolyzes crystalline cellulose on hydrophobic faces. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 13, p. 11195–11201, 2011.

LYND, L.R.; WEIMER, P.J.; VAN ZYL, W.H.; PRETORIUS, I.S. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 66, p. 506–577, 2002.

MAZIERO, P.; JONG, J.; MENDES, F.M.; GONÇALVES, A.R.; EDER, M.; DRIEMEIER, C. Tissue-specific cell wall hydration in sugarcane stalks. **J. Agric. Food Chem.**, v. 61, p. 5841–5847, 2013.

McMILLAN, J.D. *In: ENZYMATIC CONVERSION OF BIOMASS FOR FUELS PRODUCTION*, HIMMEL, M.E.; BAKER, J.O.; OVEREND, R.P., (eds.), Washington, DC: American Chemical Society, **ACS Symposium Series**, 566, p. 292–324, 1994.

MENDES, F.M.; SIQUEIRA, G.; CARVALHO, W.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A.M.F. Enzymatic hydrolysis of chemithermomechanically pretreated sugarcane bagasse and two experimental samples with reduced initial lignin. **Biotechnology Progress**, v. 27, p. 395–401, 2011.

MILNE, T.A.; CHUM, H.L.; FOSTER, A.; JOHNSON, D.K. Standardized analytical methods. **Biomass and Bioenergy**, v. 2, n. 1-6, p. 341-366, 1992.

MOXLEY, G.M.; ZHANG, Y-HP. More accurate determination of acid-labile carbohydrate composition in lignocellulose by modified quantitative saccharification. **Energy Fuels**, v. 21:3684-3688, 2007.

MOXLEY, G.M.; ZHU, Z.; ZHANG, Y-H.P. Efficient sugar release by the cellulose solvent based lignocellulose fractionation technology and enzymatic cellulose hydrolysis. **J. Agric Food Chem**, v. 56, n. 17, p.7885–7890, 2008.

MUSSATTO, S.I.; ROBERTO, I.C. Establishment of the optimum initial xylose concentration and nutritional supplementation of brewer's spent grain hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 540–546, 2008.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.T. Biotechnological potential of agroindustrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 69-80, 2000.

PITARELO, A. P. **Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha de cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática**. 2007 Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Paraná, 2007.

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

ROLLIN, J.A.; ZHU, Z.; SATHITSUKSANO, N.; ZHANG, Y.-H.P. Increasing cellulose accessibility is more important than removing lignin: A comparison of Cellulose solvent-based lignocelluloses fractionation and soaking in aqueous ammonia. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, n. 1, p. 22-30, 2011.

SAMIR, M.A.S.A.; ALLOIN, F.; DUFRESNE, A. Review of recent research into cellulosic whiskers, their properties and their application in nanocomposite field. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 612-626, 2005.

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

SANTOS, V.T.O. **Composição e digestibilidade enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido sulfúrico diluído em reator estático**. 2010. 103 p. Dissertação (Mestrado) Departamento de Biotecnologia, Escola de Engenharia de Lorena, Lorena, 2010.

SATHITSUKSANO, N.; GEORGE, A.; ZHANG, Y.-H.P. New lignocellulose pretreatments by using cellulose solvents: a review. **J Chem Eng Biotechnol**, v. 88, p. 169–180, 2013.

SATHITSUKSANO, N.; ZHU, Z.; HO, T.; BAI, M.; ZHANG, Y.-H.P. Bamboo saccharification through cellulose solvent-based biomass pretreatment followed by enzymatic hydrolysis at ultra-low cellulase loadings. **Bioresources Technology**, v. 101, p. 4926–4929, 2010.

SATHITSUKSANO, N.; ZHU, Z.; TEMPLETON, N.; ROLLIN, J.; HARVEY, S.; ZHANG, Y.-H.P. Saccharification of a potential bioenergy crop, *Phragmites australis* (common reed), by lignocellulose fractionation followed by enzymatic hydrolysis at decreased cellulase loadings. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 48, p. 6441–6447, 2009.

SATHITSUKSANO, N.; ZHU, Z.; WU, S.; ZHANG, Y.-H.P. Cellulose solvent based biomass pretreatment breaks highly ordered hydrogen bonds in cellulose fibers of switchgrass. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 108, n. 3, p. 521–529, 2011.

SATHITSUKSANO, N.; ZHU, Z.; ZHANG, Y.-H.P. Cellulose solvent- and organic solvent-based lignocellulose fractionation enabled efficient sugar release from a variety of lignocellulosic feedstocks. **Bioresources Technology**, v. 117, p. 228–233, 2012a.

SATHITSUKSANO, N.; ZHU, Z.; ZHANG, Y.-H.P. Cellulose solvent-based pretreatment for corn stover and avicel: concentrated phosphoric acid versus ionic liquid [BMIM]Cl. **Cellulose**, v. 19, p. 1161–1172, 2012b.

SEABRA, J.E.A.; TAO, L.; CHUM, H.L.; MACEDO, I.C. A techno-economic evaluation of the effects of centralized cellulosic ethanol and co-products refinery options with sugarcane mill clustering. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, p. 1065–1078, 2010.

SEGAL, L.; CREELY, J.J.; MARTIN, A.E.; CONRAD, C.M. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. **Textile Research Journal**, v. 29, n. 10, p. 786–794, 1959.

SCHUCHARDT, U.; RIBEIRO, M.L.; GONÇALVES, A.R. A indústria petroquímica no próximo século: como substituir o petróleo como matéria-prima? **Quim. Nova**, v. 24, n. 2, p. 247–251, 2001.

SILVA, R.; HARAGUCHI, S.K.; MUNIZ, E.C.; RUBIA, A.F. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 661–671, 2009.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. **Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples**. Golden, CO: NREL, Laboratory Analytic Procedure (LAP), 2006.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D. **Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass**. Golden, CO: NREL, Laboratory Analytic Procedure (LAP), 2008.

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

SUGIYAMA, J.; VUONG, R.; CHANZY, H. Electron diffraction study on the two crystalline phases occurring in native cellulose from an algal cell wall. **Macromolecules**, v. 24, n. 14, 1991.

TEMPLETON, D.W.; SCARLATA, C.J.; SLUITER, J.B.; WOLFRUM, E.J. Compositional analysis of lignocellulosic feedstocks. 2. Method Uncertainties. **J. Agric. Food Chem.**, v. 58, n. 16, 2010.

VILLEGAS, J.D.; GNANSOUNOU, E. Techno-economic and environmental evaluation of lignocellulosic biochemical refineries: need for a modular platform for integrated assessment (MPIA). **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 67, p. 927-940, 2008.

WERPY, T.; PETERSEN, G. **Top value-added chemicals from biomass**, v. 1. United States Department of Energy. Springfield, 2004.

YOO, C.G.; LEE, C-W.; KIM, T.H. Two-stage fractionation of corn stover using aqueous ammonia and hot water. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 164, p. 729–740, 2011.

ZHANG, Y.-H.P. **Cellulose solvent-based lignocellulose fractionation with modest reaction conditions and reagent cycling**. US Patent Application Publication, 2010.

ZHANG, Y.-H.P. **Method and apparatus for lignocellulose pretreatment using a super cellulose solvent and highly volatile solvents**. US Patent Application Publication, 2009.

ZHANG, Y.-H.P. Reviving the carbohydrate economy via multi-product biorefineries. **J Ind Microbiol Biotechnol.**, v. 35, n. 5, p. 367–375, 2008.

ZHANG, Y.-H.P.; CUI, J.; LYND, L.R.; KUANG, L.R. A transition from cellulose swelling to cellulose dissolution by o-phosphoric acid: Evidence from enzymatic hydrolysis and supramolecular structure. **Biomacromolecules**, v. 7, p. 644-648, 2006.

ZHANG, Y.-H.P.; DING, S.-Y.; MIELENZ, J.R.; ELANDER, R.; LASER, M.; HIMMEL, M.; MCMILLAN, J.D.; LYND, L.R. Fractionating recalcitrant lignocellulose at modest reaction conditions. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 97, n. 2, p. 214–223, 2007.

ZHANG, Y.-H.P.; LYND, L.R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulose systems. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 88, p. 797–824, 2004.

ZHAO, H.; BAKER, G.; COWINS, J. Fast enzymatic saccharification of switchgrass after pretreatment with ionic liquids. **Biotechnol Prog.**, v. 26, p. 127–133, 2009.

ZHU, Z.; SATHITSUKSANO, N.; VINZANT, T.; SCHELL, D.J.; MCMILLAN, J.D.; ZHANG, Y.-H.P. Comparative study of corn stover pretreated by dilute acid and cellulose solvent-based lignocellulose fractionation: Enzymatic hydrolysis, supramolecular structure, and substrate accessibility. **Biotechnol and Bioeng.**, v. 103, p. 715-724, 2009.

APÊNDICE A- Considerações sobre a reciclagem dos solventes utilizados no fracionamento COSLIF

A Figura A1 apresenta o procedimento inicialmente proposto para a recuperação dos solventes utilizados durante o fracionamento COSLIF.

Figura A1- Fluxograma do procedimento inicialmente proposto para a recuperação dos solventes utilizados durante o fracionamento COSLIF.

Conforme pode ser observado, a reciclagem da acetona é feita por meio de destilação; a de ácido fosfórico, por precipitação (equação 1) seguida de recuperação (equação 2).

No presente estudo, foi feita uma avaliação preliminar da reciclagem da acetona contida nas frações líquidas I e II. Verificou-se que 1,76 L de acetona (de 2,43 L efetivamente utilizados) foram recuperados após a evaporação seguida de condensação; realizadas em rotoevaporador de bancada. Com relação à reciclagem do ácido fosfórico, em avaliação também preliminar, e não quantitativa, obteve-se uma solução de H_3PO_4 com 47,8% (m/m).

Mais recentemente, o Dr. Percival Zhang solicitou patenteamento para a utilização de misturas de ácido polifosfórico e/ou pentóxido de fósforo, em lugar de ácido fosfórico, durante o fracionamento COSLIF. De acordo com as solicitações (ZHANG, 2009;

ZHANG, 2010), a queima das frações orgânicas, após a recuperação da acetona, é um procedimento que permite a conversão do H_3PO_4 em $\text{H}_{n+2}\text{P}_n\text{O}_{3n+1}$ e P_2O_5 (com alto rendimento e pureza); que podem ser utilizados na primeira etapa do fracionamento, dissolução da celulose. Nesta configuração de processo, entretanto, a lignina é utilizada como fonte de energia; enquanto, na configuração convencional, a lignina solúvel obtida após a extração do $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ representa uma fonte de compostos aromáticos. A lignina insolúvel, obtida após a sacarificação enzimática, representa uma fonte de macromoléculas.

Conforme apresentado (ZHANG, 2010), outra vantagem relacionada à conversão do ácido fosfórico em ácido polifosfórico e pentóxido de fósforo inclui a possibilidade de ajuste da massa molecular e da concentração do catalisador, através do controle da quantidade de água adicionada à mistura reacional. No caso de trabalho em fase gasosa, a maior difusividade dos produtos gerados durante a queima das frações orgânicas, $\text{P}_2\text{O}_5_{(g)} + \text{H}_2\text{O}_{(g)}$, também é apontada como vantagem. Menciona-se, inclusive, a possibilidade de utilização do dióxido de carbono para maximizar a recuperação da hemicelulose na última etapa do fracionamento, simultaneamente à sacarificação.