UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

BÁRBARA PEREIRA

Produção de nanoceluloses integradas ao processo de obtenção de açúcares para etanol 2G a partir de bagaço de cana-de-açúcar

Lorena
2017

BÁRBARA PEREIRA

Produção de nanoceluloses integradas ao processo de obtenção de açúcares para etanol 2G a partir de bagaço de cana-de-açúcar

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Industrial na área de Conversão de Biomassa.

Orientador: Prof. Dr. Valdeir Arantes

Versão Original

Lorena-SP

2017

NÃO AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, SERÁ DISPONIBILIZADO AUTOMATICAMENTE APÓS 2 ANOS DA PUBLICAÇÃO

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

Pereira, Bárbara
Produção de nanoceluloses integradas ao processo de obtenção de açúcares para etanol 2G a partir de bagaço de cana-de-açúcar / Bárbara Pereira; orientador Valdeir Arantes - Versão Original. - Lorena, 2017.
98 p.

Dissertação (Mestrado 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. 2017
Orientador: Valdeir Arantes

1. Hidrólise enzimática. 2. Etanol 2g. 3. Celulose nanocristalina. 4. Celulose nanofibrilada. I. Título. II. Arantes, Valdeir , orient.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela grande oportunidade de chegar até aqui.

Aos meus pais Emilson e Fátima pelo amor, confiança e suporte incondicional.

Aos meus queridos irmãos Lucas e Dandara pelo incentivo.

Ao meu orientador Prof Dr. Valdeir Arantes pela paciência, dedicação, disponibilidade, incentivo, inspiração e incríveis oportunidades que me foram dadas, os meus mais sinceros agradecimentos.

Aos professores André Ferraz e Adriane Milagres por todo apoio e por manterem sempre as portas abertas.

A todos os professores do Departamento de Biotecnologia.

Aos meus amigos queridos Fabrício, Bernadete e Eleonora que me incentivaram durante essa caminhada.

Aos meus amigos técnicos do Departamento de Biotecnologia.

Ao Dr. Oscar Rosales pelas preciosas dicas e contribuição.

Aos colegas de Laboratório de Biocatálise e Bioprodutos - BBiopro (Braz, Bruna, Carlaile, Eduarda, Gabriela, Germano, Grazielle, Isabella Dias, Letícia, Lisa, Renan e Wilian).

Ao engenheiro Rodrigo Basso - ENDENIQ - Usina Vale.

Ao Engenheiro Edgar Arias - CTBE.

Aos profissionais do Laboratório de Polímeros - LabPol (Gizelda, Isabella, Erica e Guilherme).

Ao Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol- CTBE.

À CAPES e FAPESP pelo aporte financeiro.

"*If I have seen further it is by standing on the shoulders of Giants*."

Isaac Newton

RESUMO

PEREIRA, B. **Produção de nanoceluloses integradas ao processo de obtenção de açúcares para etanol 2G a partir de bagaço cana-de-açúcar**. 2017. 98 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2017.

As nonoceluloses são partículas com pelo menos uma dimensão menor que 100 nm. A produção delas a partir de materiais lignocelulósicos tem obtido grande destaque nos últimos anos. A celulose nanocristalina (CNC) é tradicionalmente produzida através da hidrólise ácida, utilizando alta concentração de ácido, grande volume de água e com baixo rendimento. A celulose nanofibrilada (CNF) é produzida pela desfibrilação mecânica de polpas celulósicas com alto consumo de energia. Por outro lado, embora a produção industrial de etanol 2G já tenha começado, com as primeiras plantas de produção em escala espalhadas pelo mundo, a hidrólise enzimática completa da celulose para este fim não é economicamente viável e gera um resíduo rico em celulose e altamente recalcitrante, que poderia ser utilizado para produzir nanoceluloses, que tem alto valor agregado. Neste contexto, este estudo investigou a viabilidade técnica da produção das nanoceluloses (CNC e CNF) integradas ao processo de produção de açúcares fermentescíveis para a produção de etanol 2G a partir do bagaço de cana-de-açúcar. Incialmente, em uma planta piloto de produção de etanol 2G, o bagaço foi pré-tratado por explosão a vapor, que gerou a celulignina que foi deslignificada com NaOH. A polpa celulósica gerada foi tratada com peróxido de hidrogênio em meio alcalino para realizar a remoção da lignina residual. Os materiais gerados pelo pré-tratamento e pelo processo de polpação em meio alcalino foram caracterizados quando sua composição química e hidrolisados com diferentes cargas de enzimas. Os resultados mostraram a eficiência dos pré-tratamentos aplicados ao bagaço de cana-de-açúcar causando o enriquecimento em celulose e a diminuição do teor lignina e de hemiceluloses, acarretando um maior acesso das enzimas a celulose. O estudo do efeito das cargas enzimáticas, do aumento da carga de sólidos e do sistema de agitação, resultou em conversões de celulose em torno de 80%, atingindo concentrações acima de 120 g/L. Utilizando o resíduo de hidrólise da polpa celulósica, foram obtidas as nanoceluloses. A CNC apresentou tamanho médio de partículas de 679 nm, índice de cristalinidade de 54%, diâmetros mais frequentes entre 55 e 65 nm e rendimento de aproximadamente 48%. A CNF apresentou tamanho médio de 722 nm e diâmetros com maior frequência em torno de 60 nm, e rendimento de aproximadamente 38%. As suspensões aquosas de CNC e CNF apresentaram baixa estabilidade, quando monitoradas através do potencial zeta.

Palavras-chave: Hidrólise enzimática. Etanol 2G. Celulose nanocristalina. Celulose nanofibrilada.

ABSTRACT

PEREIRA, B. **Production of nanocelluloses integrated into the process of obtaining sugars for 2G ethanol from sugarcane bagasse.** 2017. 98 p. Dissertation (Master in Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2017.

Nanocelluloses are particles with at least one dimension smaller than 100 nm. Their production from lignocellulosic materials has gained prominence in recent years. Cellulose nanocrystals (CNC) is traditionally produced through acid hydrolysis using high acid concentration, high water volume and results in low yield. Cellulose nanofibrils (CNF) is produced by mechanical defibrillation of cellulosic pulps with high energy consumption. On the other hand, despite the fact the production of 2G ethanol has already reached commercial production, with the first commercial facilities around the worldwide, complete enzymatic hydrolysis of cellulose for this purpose is not economically viable and generates a highly recalcitrant residue rich in cellulose and, which could be used to produce nanocelluloses, high-added value products. In this context, this study investigated the technical viability of obtaining nanocelluloses integrated into the production process of fermentable sugars to obtain 2G ethanol from sugarcane bagasse. Initially, at a pilot plant for production of2G ethanol, sugarcane bagasse was pre-treated by steam explosion, generating cellulignin, which was delignified with NaOH. The resulting cellulosic pulp was treated with hydrogen peroxide in an alkaline medium to remove residual lignin. The materials generated after the pre-treatment and the pulping process in alkaline medium were characterized regarding their chemical composition and then hydrolyzed with different loads of enzymes. The results showed that the pre-treatments applied to the bagasse caused the enrichment in cellulose and the decrease of lignin and hemicelluloses contents, leading to a greater access of the enzymes to cellulose. The enzymatic charges used in the experiments, which were evaluated in combination with the increase of the solids loading together with the change of the agitation system, resulted in a cellulose conversion of around 80%, reaching concentrations above 120 g/L. Using the hydrolysis residue of the cellulosic pulp, nanocelluloses were obtained. The CNC showed a mean particle size of 679 nm, crystallinity index of 54%, diameters between 55 and 65 nm and a yield of about 48%. The CNF displayed an average particle size of 722 nm and diameters with higher frequency around 60 nm. The aqueous suspensions of CNC and CNF showed low stability when monitored through the zeta potential.

Keywords: Enzymatic hydrolysis, 2G ethanol, Nanocrystalline cellulose, Nanofibrillated cellulose.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Produção global e biocombustíveis (HVO- óleo vegetal hidrogenado, biodiesel e etanol) 20

Figura 2- Estrutura química da celulose 22

Figura 3- Estrutura representativa da hemicelulose de cana-de-açúcar (glucuronoarabinoxilana) 24

Figura 4- Estrutura das unidades de fenilpropano 25

Figura 5- Estrutura hipotética da lignina G 25

Figura 6- Países com políticas de uso de energia de fontes renováveis 32

Figura 7- Custo relativo do galão de etanol 2G associado ao percentual de conversão de substrato. 36

Figura 8- Fluxograma esquemático da abordagem experimental em duas etapas utilizada neste estudo 51

Figura 9- Processamento do bagaço (a) bagaço in natura; (b) celulignina; (c) polpa celulósica; (d) PPB-B 63

Figura 10- Balanço de massas total da geração da PPB-B 66

Figura 11- Percentual de conversão de celulose em função da carga de enzimas em diferentes substratos 68

Figura 12- Comparação de resultados de conversão de substratos obtidos sob mesmas condições de pré-tramento hidrolisados com diferentes coquetéis enzimáticos 70

Figura 13- Correlação linear entre a carga enzimática e a conversão da celulose de celulignina, polpa celulósica e PPB-B com residual de lignina de 20,9 %,15,9 % e 9,9 % (m/m), respectivamente. 71

Figura 14- Influência da agitação na conversão de celulose a 10% sólido, Celulignina-s (agitação em shaker), Celulignina-h (agitação em hibridizador), PPB-B-s (agitação em shaker) e PPB-B-h (agitação em hibridizador). 72

Figura 15- Conversão de celulose da PPB-B em diferentes cargas de sólidos em função da carga de enzimas. 73

Figura 16- Distribuição do tamanho de partículas das suspensões produzidas a partir da PPPB-B (CNC-B) e PKEB (CNC-K) comparadas a CNC produzida por hidrólise ácida da PKB-E de acordo com a metodologia descrita por Bondeson, Mathew and Oksman, (2006) (CNC-HA). 76

Figura 17- (a) imagem de AFM da CNC-B, (b) distribuição de frequência do diâmetro da CNF-B, (c) imagem de AFM da CNC-K e (c) distribuição de frequência do diâmetro da CNF-K (d). 78

Figura 18- Distribuição do tamanho de partículas de CNF-B produzidas a partir do resíduo de isolamento da CNC-B. 81

Figura 19- Distribuição do tamanho de partículas da CNF-K 82

Figura 20- (a) imagem de AFM da CNF-B, (b) distribuição de frequência do diâmetro da CNF-B, (c), imagem de AFM da CNF-K e (c) distribuição de frequência do diâmetro da CNF-K (d) 83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Propriedades médias típicas da celulose a partir de bagaço de cana-de-açúcar, madeira dura e madeira macia. 23

Tabela 2- Plantas de produção de etanol 2G e pré-tratamento utilizado. 33

Tabela 3- Capacidade declarada de produção de CNC e CNF no ano de 2016.....39

Tabela 4- Capacidade declarada de produção de CNC e CNF no ano de 2016.....45

Tabela 5- Métodos de produção e propriedades das nanoceluloses de bagaço de cana-de-açúcar. 47

Tabela 6- Combinação de carga de sólidos com carga de proteínas na hidrólise da PPB-B. 57

Tabela 7- Composição química do bagaço de cana-de-açúcar in natura e processado.....64

Tabela 8- Comparação entre a composição química do bagaço tratado com a material referência na literatura. 65

Tabela 9- Balanço de massas total da geração da PPB-B 67

Tabela 10- Dosagem de proteínas totais e atividade enzimática de Celluclast 1.5L e Novozym 188 de acordo com Hu; Arantes e Saddler (2011). 70

Tabela 11- Concentração de glicose em função da carga de sólidos de PPB-B combinadas com diferentes cargas de enzimas.....74

Tabela 12- Índice de Cristalinidade (ICr) e tamanho do cristalito da CNC-B, CNC-K, PPB-B e PKB-E.....79

Tabela 13- Composição química da CNC.....80

Tabela 14- Potencial zeta das suspensões de CNC, CNF, PKB-E e PPB-B.....85

ABREVIATURAS

1G - primeira geração

2G - segunda geração

AFM - Microscopia de força atômica (*Atomic Force Microscopy)*

BC - Bagaço de cana-de açúcar

CB - Celulose bacteriana

CBH - celobiohidrolase

CLAE - cromatografia líquida de alta eficiência

CNC - Celulose nanocristalina

CNF - Celulose nanofibrilada

CNC-B - celulose nanocrsitalina de bagaço de cana-de-açúcar

CNC-K - celulose nanocristalina de polpa Kraft branqueada de Eucalipto

CNF-B - celulose nanofibrilada de bagaço de cana-de-açúcar

CNF-K - celulose nanofibrilada de polpa Kraft branqueada de Eucalipto

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento

CTBE - Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol

DP - Grau de polimerização (*Degree of polymerization*)

EC - *Enzyme commission*

g- grama

rpm - rotações por minuto

HÁ - hidrólise ácida

HE - hidrólise enzimática

HG - homegeneizador

HMF - hidroximetilfurfural

L - Litro

mL - militro

m/m - massa por massa

m/v - massa por volume

µg/g - micrograma por grama

µm - micrometro

NC - Nanocelulose

nm - nanometro

PKB-E - Polpa Kraft Branqueada de Eucalipto

PPB-B - Polpa Parcialmente Branqueada de bagaço de cana-de açúcar

SEM - Microscopia eletrônica de varredura (*Scanning electron microscopy*)

TEM - Microscopia eletrônica de transmissão (*Transmission electron microscopy*)

USAI - ultrassonicação de alta intensidade

v/v - volume por volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 19
2.1 Biomassa lignocelulósica potencial como matéria-prima 19
2.2 Cana-de-açúcar e a geração de bagaço 20
2.3 Composição da biomassa lignocelulósica 21
2.3.1 Celulose 21
2.3.2 Hemicelulose 23
2.3.3 Lignina 24
2.3 Pré-tratamentos da biomassa 26
2.3.1 Pré-tratamento alcalino 26
2.3.2 Deslignificação em meio alcalino 27
2.3.3 Branqueamento de polpa celulósica com peróxido de hidrogênio em alcalino 29
2.3.4 Pré-tratamentos por explosão a vapor 30
2.4 Etanol 2G 31
2.4.1 Hidrólise enzimática para produção de etanol 2G 33
2.5 Nanocelulose 37
2.5.1 Celulose bacteriana 40
2.5.2 Celulose Nanofibrilada 40
2.5.2.1 Homogeneização e microfluidização em alta pressão 41
2.5.2.2 Nanorefinamento 41
2.5.2.3 Ultrasonicação de alta intensidade 42
2.5.2.4 Pré-tratamentos 42
2.5.3 Celulose nanocristaliana 43
2.5.3.1 Métodos de extração de celulose nanocristalina 43
2.5.3.1.1 Hidrólise ácida 43
2.5.3.1.2 Hidrólise enzimática 44
2.6 Nanocelulose a partir de bagaço de cana-de-açúcar 46
3 OBJETIVOS 49
3.1 Objetivo Geral 49
3.2 Objetivos Específicos 49
4 MATERIAIS E MÉTODOS 50
4.1 Materiais 50

4.2 Métodos **50**
4.2.1 Moagem e classificação granulométrica do bagaço de cana-de açúcar in natura **52**
4.2.2 Pré-tratamento por explosão a vapor **52**
4.2.3 Deslignificação em meio alcalino **52**
4.2.4 Precipitação de lignina **53**
4.2.5 Branqueamento com peróxido de hidrogênio em meio alcalino **53**
4.2.6 Balanço de massas **53**
4.2.7 Caracterização química **54**
4.2.8 Composição química da fração líquidas obtidas após o pré-tramento por explosão a vapor **54**
4.2.9 Determinação da concentração de proteínas **55**
4.2.10 Efeito da carga de enzima na eficiência de hidrólise hidrolise enzimática **55**
4.2.11 Efeito da agitação e da carga de enzima na eficiência de hidrólise enzimática **56**
4.2.12 Efeito da carga de sólidos combinada com a carga de enzimas na eficiência de hidrólise enzimática **56**
4.2.13 Quantificação dos produtos de hidrólise e conversão em monossacarídeos **57**
4.2.14 Produção de celulose nanocelulose **58**
4.2.14.1 Produção de celulose nanocristalina (CNC) **58**
4.2.14.2 Produção de celulose nanofibrilada **59**
4.2.15 Caracterização das partículas de nanocelulose **60**
4.2.15.1 Tamanho das partículas **60**
4.2.15.2 Índice de cristalinidade e tamanho de cristal **60**
4.2.15.3 Microscopia de força atômica (AFM- Atomic Force Microscopy) **61**
4.2.15.4 Potencial zeta **61**
4.2.15.5 Rendimento de CNC **62**
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES **63**
5.1 Composição química **63**
5.2 Balanço de massas **66**
5.3 Avalição do efeito da carga de enzima na eficiência de hidrólise **68**
5.5 Influência da carga de sólidos na conversão da celulose e geração de glicose **72**
5.6 Separação de açúcares e isolamento das nanoceluloses **75**
5.6.1 Isolamento e tamanho das partículas de CNC **76**
5.6.2 Morfologia das partículas e diâmetro do cristal **77**

5.6.2 Índice de Cristalinidade e tamanho do cristalito 79
5.6.4 Composição química e rendimento de CNC 80
5.6.5 Produção e tamanho das partículas de CNF 81
5.6.6 Morfologia das partículas e diâmetro da CNF 83
5.6.2 Estabilidade da suspensão e potencial zeta 85
6 CONCLUSÃO 86
7 REFERÊNCIAS 87

1 INTRODUÇÃO

Recentemente tem-se observado o constante crescimento das pesquisas pela busca de materiais e combustíveis de fontes alternativas. A biomassa lignocelulósica é atualmente considerada uma potencial matéria-prima para produção de combustíveis, produtos químicos e materiais de fonte renovável.

O processamento de materiais lignocelulósicos é um conceito que vem se difundido como aproveitamento integral dessa biomassa, que através de instalações e processos tecnológicos são capazes de gerar produtos e intermediários de forma semelhante aos produtos oriundos do refino do petróleo. As principais vantagens de utilizar biomassa vegetal como matéria-prima para obter produtos com maior valor agregado é o fato de ser uma fonte renovável amplamente disponível mundialmente.

A fim de diminuir a dependência do petróleo, diminuir a emissão dos gases que causam o efeito estufa, melhorar a qualidade do ar, desde os anos de 1900 pesquisas se desenvolveram para a obtenção de um importante biocombustível, o etanol celulósico, que vem sendo exaustivamente estudado tendo em vista sua viabilidade técnica e econômica, possibilitando o desenvolvimento da biotecnologia alavancada pelas políticas governamentais em vários países para a obtenção de energia limpa.

A viabilidade técnica da obtenção do etanol celulósico (etanol de segunda geração-2G) já é comprovada, mas seu valor de mercado ainda é alto quando comparado ao etanol de primeira geração (1G). Neste sentido, uma das estratégias com melhor potencial econômico é a produção integrada de bioprodutos ao etanol de segunda geração (2G). Por serem de origem renovável, além desses bioprodutos potencialmente gerar menor impacto ambiental podem aumentar a lucratividade do processo de produção de etanol 2G pois, possuem um alto valor agregado quando comparados ao bioetanol.

Dentro do contexto de processos integrados as nanoceluloses (NC) ganham destaque com suas propriedades e característica excepcionais, que permitem sua aplicação em diversas áreas, dentro de setores considerados mais tradicionais como papel e celulose, cimentos, industrias de transportes, médica e até na indústria de inovações tecnologias.

Tradicionalmente, a partir de polpa celulósica de origem vegetal nanocristais de celulose são obtidos (CNC) pela hidrólise ácida controlada utilizando ácidos minerais fortes concentrados, principalmente o ácido sulfúrico, e as nanofibrilas de celulose pelo

desfibrilamento mecânico precedido por tratamentos químicos, enzimáticos ou mais comumente a combinação destes. Alternativamente, o uso do resíduo da hidrólise enzimática do etanol 2G é um resíduo celulósico também com potencial para ser utilizado para a produção desses materiais em escala nano.

Com a crescente demanda de mercado de nanocelulose para as próximas décadas, a enorme geração de resíduos agroindustriais, o aumento das políticas de incentivo ao uso de biocombustível, e o surgimento das primeiras fábricas, em escala comercial de etanol 2G, surge a oportunidade para geração de processos sustentáveis, capazes de gerar menores impactos ambientais e altamente lucrativos.

Neste contexto, este trabalho buscou avaliar a viabilidade técnica da integração do processo de produção de nanoceluloses com a produção de açúcares para o etanol 2G a partir do bagaço de cana-de-açúcar. A integração proposta é baseada na utilização do resíduo celulósico oriundo da etapa de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado para a obtenção de celulose naocristalina (CNC) e celulose nanofibrilada (CNF).

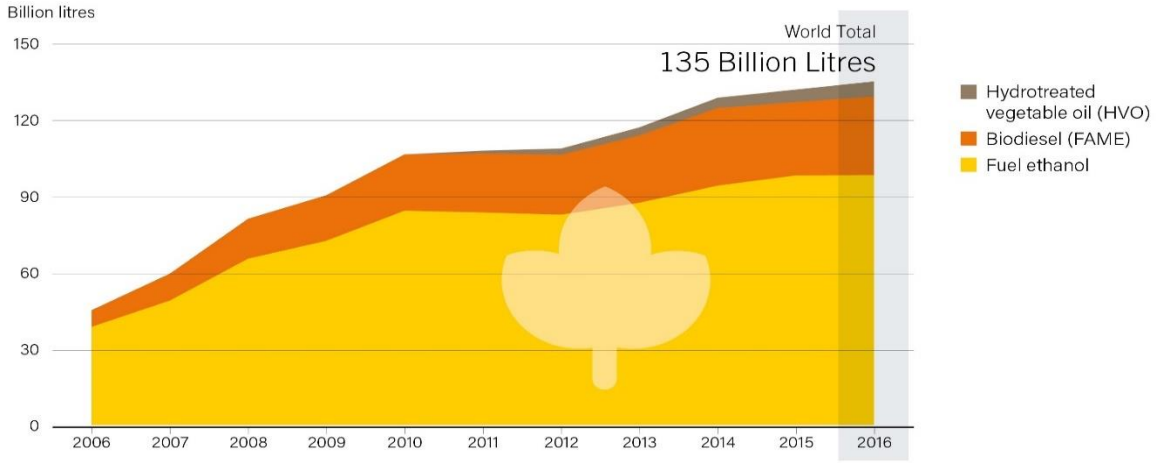
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biomassa lignocelulósica potencial como matéria-prima

A biomassa lignocelulósica é a mais abundante fonte renovável de carbono e matéria-prima para a produção de biocombustível e bioprodutos. Atualmente, muitos estudos têm considerado do ponto de vista técnico e econômico, o uso da biomassa lignocelulósica como uma potencial fonte de matéria-prima na obtenção de produtos que podem substituir os produzidos a base de fontes fósseis, como o petróleo. Dentre os diferentes materiais lignocelulósicos, os resíduos agroindustriais e florestais apresentam-se como os mais relevantes para a produção de bioprodutos pois estão presentes em todas as regiões do planeta e em várias quantidades (LEISTRITZ et al., 2006; FIELD; CAMPBELL; LOBELL, 2008; STRASSBERGER; TANASE; ROTHENBERG, 2014).

A produção de biocombustíveis a partir da biomassa continuou em ascensão no ano de 2016 alavancada pelo consumo de alguns países e por questões ambientais. Embora desafiada pelas baixas do petróleo e políticas de mercado, a produção de biocombustíveis aumentou em 2%, sendo que 74% dos biocombustíveis gerados foram etanol (Figura 1), atingindo 98,3 bilhões de litros. Os Estados Unidos e o Brasil continuam sendo os líderes globais na geração de biocombustíveis a partir de biomassa e são responsáveis por 70% do total produzido mundialmente (REN21, 2017).

Figura 1- Produção global e biocombustíveis (HVO- óleo vegetal hidrogenado, biodiesel e etanol)



Fonte: Adaptação de (REN21, 2017).

2.2 Cana-de-açúcar e a geração de bagaço

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, com produção estimada em torno de 646,4 milhões de tonelada e com uma área de cultivo de 8,7 milhões de hectares na safra 2017/18. Para a safra 2016/17, a estimativa é de uma redução de produção em torno de 1,7 %. Com isso, o crescente aumento da exportação e a abertura do mercado europeu para o etanol brasileiro a partir de fontes renováveis tornam o Brasil um grande exportador desse produto (CONAB, 2017).

Considerando que cada tonelada de cana-de-açúcar é capaz de gerar aproximadamente cerca de 125 kg de bagaço seco (NOGUEIRA et al., 2008), e com a previsão de produção da safra 2017/18 de 646,4 milhões de toneladas, estima-se que serão gerados aproximadamente 81 milhões toneladas de bagaço de cana-de-açúcar. O principal destino desse material tem sido a geração de energia elétrica, garantindo a autossuficiência energética do setor sucroalcooleiro (BEZERRA; RAGAUSKAS, 2016). Entretanto, há a possibilidade de aproveitamento do restante desse do bagaço para a geração de bioprodutos dentro de um conceito de biorrefinaria, produzindo combustíveis, biomateriais e produtos químicos intermediários, além da energia gerada.

Embora a geração de energia elétrica a partir de bagaço de cana-de-açúcar seja um processo que garante a eficiência energética do setor sucroalcooleiro, a cogeração de etanol b2G é um processo rentável, mas ainda é dependente da evolução do processo de

conversão da biomassa (PETERSEN; ANEKE; GÖRGENS, 2014; CAVALETT et al., 2017).

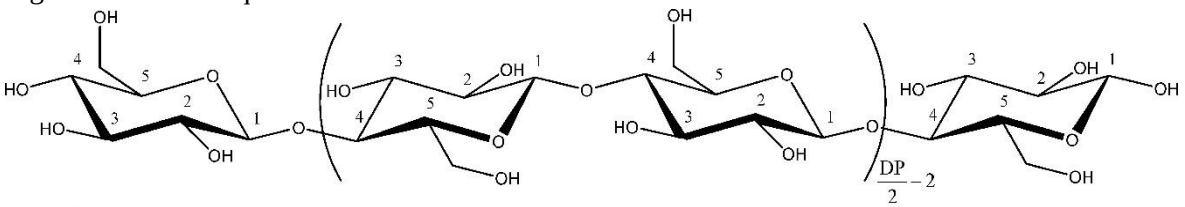
2.3 Composição da biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica é composta majoritariamente por celulose, hemiceluloses, lignina, e pequenas quantidades de cinzas e extrativos (FREIRE et al., 2011; GUPTA et al., 2016). As quantidades de cada um dos componentes variam geralmente de acordo com a espécie vegetal de origem, tendo de modo geral cerca de 50% de celulose, de 20 a 25% de hemicelulose e 20 a 30% de lignina (FENGEL; WEGENER, 1989). No caso particular do bagaço de cana-de-açúcar, em um estudo recente (ROCHA et al., 2015) realizaram uma caracterização detalhada da composição química de 60 amostras de bagaço de cana-de-açúcar de diferentes variedades, locais cultivados, solos, época de colheita e clima. Em média, a composição química do bagaço de cana-de- açúcar variou de 39,5-45,7% para celulose, 25,6-29,6% para hemicelulose, 18,9-26,1% para lignina, 2,3-10,5% para extrativos e 1,1-6,0% para cinzas.

2.3.1 Celulose

A celulose é um biopolímero linear de unidades de anidroglicose unidas por meio de ligações (β-1,4) (Figura 2). A conformação linear das cadeias de celulose se dá pela rotação de 180º dos resíduos de glicose em torno na ligação glicosídica. O número de anidroglicoses que constituem a cadeia é chamado grau de polimerização (DP), que pode variar entre 7.000 e 15.000 resíduos, dependendo da fonte da celulose (FENGEL; WEGENER, 1989; SJÖSTRÖM, 1993).

Figura 2- Estrutura química da celulose



Fonte: Adaptação de Habibi; Lucia; Rojas (2010).

Os resíduos de anidroglicose que compõe a cadeia de celulose possuem grupos hidroxilas livres nos carbonos C2, C3 e C6, que são capazes de promover interações inter e intramoleculares, através de ligações de hidrogênio. Além das ligações de hidrogênio as cadeias de celulose também sofrem a ação das ligações de Van der Waals. Esses dois tipos de ligação juntas promovem a formação de aglomerados longitudinais de cadeias de celulose, chamados de fibrilas.

Acreditava-se que as fibrilas eram formadas por 36 cadeias de celulose (FENGEL; WEGENER, 1989; DELMER; AMOR, 1995; GELLERSTEDT; EK; HENRIKSSON, 2009) com aproximadamente 3 nm de diâmetro (COSGROVE, 2014), mas estudos recentes apontam que as fibrilas são formadas por um número de 18 a 24 cadeias (FERNANDES et al., 2011; THOMAS et al., 2013), com tendência a 24 cadeias devido a geometria observada no corte transversal das fibrilas (COSGROVE, 2014). Além disso, as fibrilas se aglomeram também de forma longitudinal para formar as microfibrilas, que por sua vez, são vinculadas pela hemicelulose que se une à lignina para formar a fibra de celulose na parede celular vegetal (DEL RÍO et al., 2015).

As fibras de celulose dispõem de regiões de maior e menor organização, tais regiões são conhecidas como regiões cristalinas e amorfas, respectivamente (FENGEL; WEGENER, 1989). Esta estrutura é corroborada pela ação de ácidos fortes durante a hidrólise, que produz cristais de celulose com grau de polimerização em torno de 200 (GELLERSTEDT; EK; HENRIKSSON, 2009).

Enquanto a celulose de diferentes fontes compartilha muitas semelhanças estruturais, os tamanhos de fibras podem variar de acordo com a fonte a partir da qual é extraída. Verificou-se que a celulose do bagaço de cana-de-açúcar tem um peso molecular médio de cerca de 157800-16800 $g.mol^{-1}$, tamanho da fibra na faixa de 1,0 -1,5 mm, grau médio de polimerização (DP) de cerca de 974-1.039 e índice cristalinidade de cerca de 57%. Em comparação com as fibras de madeira dura e de madeira macia, as fontes de celulose mais comuns e industrialmente relevantes, as fibras celulósicas da cana-de-açúcar

são menores do que as fibras de madeira macia e de tamanho similar às fibras de madeira dura (Tabela 1). Os valores são baseados em (BEZERRA; RAGAUSKAS, 2016) e (HURTER, 2001) para celulose de bagaço de cana-de-açúcar e (HALLAC; RAGAUSKAS, 2011), (HURTER, 2001) e (NEWMAN; HEMMINGSON, 1990) para madeira dura e celulose de madeira macia.

Tabela 1- Propriedades médias típicas da celulose a partir de bagaço de cana-de-açúcar, madeira dura e madeira macia.

Fonte de celulose	PM ($g.mol^{-1}$)	Tamanho da fibra (mm)	DP	Diâmetro (µm)	ICr (%)
Bagaço de cana-de açúcar	157.800-16.800	1,0 -1,5	974-1.039	20	56,7
Madeira dura	648.000-891.000	1,25	4000-5500	25	54,0
Madeira macia	648.000-891.000	3,0	4.000-5500	30	57,0

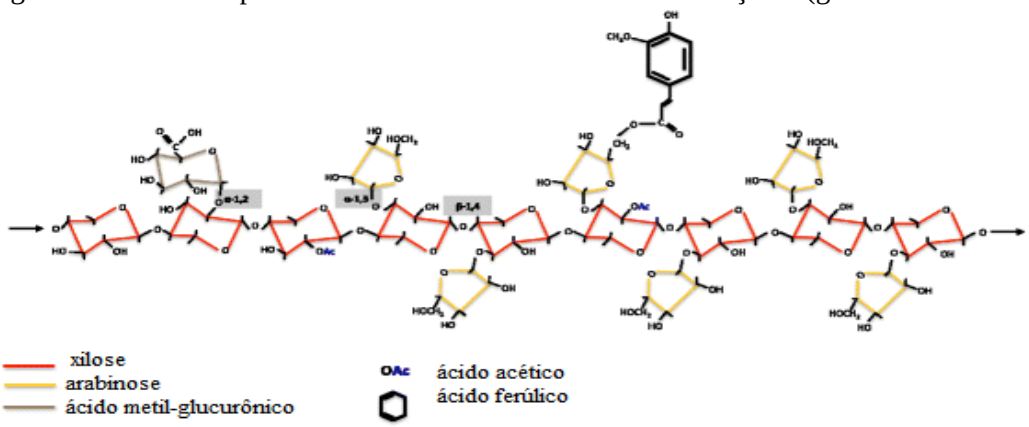
PM: peso molecular; DP: grau polimerização; CrI: índice de cristalinidade
Fonte: Arquivo pessoal

2.3.2 Hemicelulose

As hemiceluloses apresentam-se como um heteropolímero ramificado, pode ser composta por pentoses, como D-xilose e L-arabinose e hexoses, como D-glicose, D-galactose e D-manose. Além disso, contém pequenas quantidades desoxi-hexoses, ácidos ucurônicos, como o 4-O-metil-D-glucurônico, galacturônico e D-glucurônico e grupos acetila (GELLERSTEDT; EK; HENRIKSSON, 2009).

A composição da hemicelulose está diretamente ligada à fonte da biomassa. Por exemplo, em madeiras moles e gramíneas a cadeia principal da hemicelulose é a xilana, ao passo que nas madeiras duras a cadeia principal e a glucomanana (FENGEL; WEGENER, 1989). Além disso, a hemicelulose se liga a lignina através dos ácidos ferúlico e cumárico (hidroxicinâmicos) por meio de ligação éster no carbono 5 da L-arabinose e a carboxila do ácido ferúlico. No caso particular do bagaço de cana-de-açúcar o ácido cumárico é o principal grupo ligante (DEL RÍO et al., 2015) (Figura 3).

Figura 3- Estrutura representativa da hemicelulose de cana-de-açúcar (glucuronoarabinoxilana)



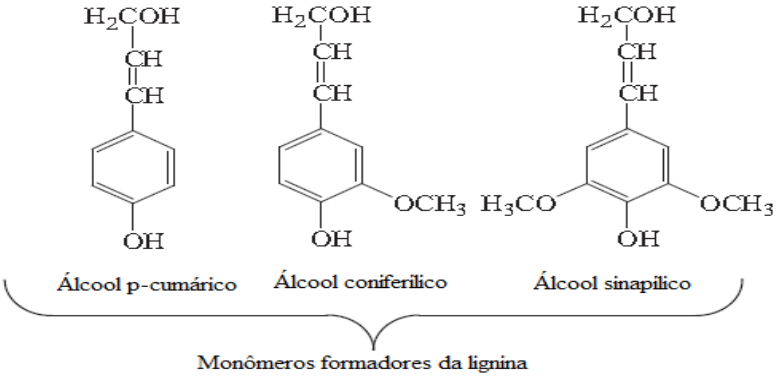
Fonte: Adaptado de Buckerige; de Souza (2014)

Quando comparada a celulose, as hemiceluloses possuem baixo grau de polimerização, variando de 100 e 200 resíduos de monossacarídeos. Além disso, também possuem menor estabilidade química e térmica, possibilitando que as hemiceluloses possam ser mais facilmente hidrolisadas através de tratamentos hidrotérmicos (GELLERSTEDT; EK; HENRIKSSON, 2009).

2.3.3 Lignina

A lignina, uma macromolécula hidrofóbica formada a partir de unidades de fenilpropano (Figura 3), é um importante componente estrutural dos vegetais, conferindo rigidez e coesão para os componentes da parede celular. Na estrutura da lignina encontram-se as ligações β-O-4 como as mais comuns, algumas ligações α-O-4 e éter entre grupos aromáticos (FENGEL; WEGENER, 1989; GELLERSTEDT; EK; HENRIKSSON, 2009).

Figura 4- Estrutura das unidades de fenilpropano

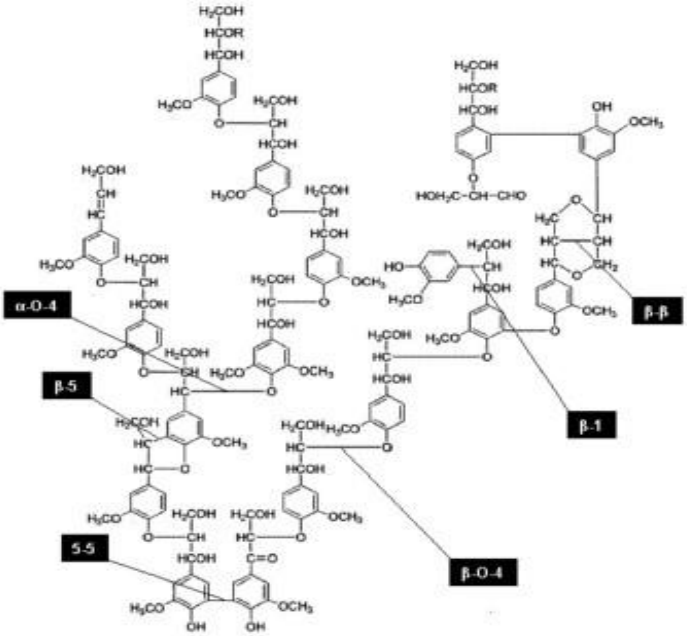


Fonte: Adaptado de Gellestedt; Ed; Henriksson, (2009).

A formação da lignina se dá pela polimerização dos monolignóis, álcool p-cumárico, coniferílico e sinapílico. A complexidade da lignina faz com que sua estrutura química ainda não seja completamente conhecida (Figura 6).

De acordo com a espécie vegetal as proporções dos monolignóis variam, dando origem aos tipos de lignina G, S e H, guaiacil, siringil e hidroxifenil, respectivamente. Nas madeiras duras (coníferas) estão presentes em maior proporção os grupos guaicil e siringil, (lignina GS), nas madeiras moles (folhosas) os grupos guaicil, (lignina G), e nas gramíneas como bagaço de cana-de-açúcar estão presentes as três unidades de fenilpropano classificando a lignina como GSH (guaiacil-siringil-hidrofenil).

Figura 5- Estrutura hipotética da lignina G



Fonte: Adaptado de Carvalho et al. (2009).

2.3 Pré-tratamentos da biomassa

Para utilizar as diferentes frações dos materiais lignocelulósicos faz-se necessário uma separação, pelo menos parcial, de cada um de seus componentes, de modo que possam ser empregadas em processos de conversão posteriores. Os processos utilizados para a desconstrução da biomassa são conhecidos como pré-tratamentos. Os pré-tratamentos são etapas de extrema importância nos processos de conversão da biomassa pois, além de separar em frações a biomassa, essas etapas aumentam a acessibilidade à celulose (MOSIER et al., 2005; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

De acordo com seu mecanismo de ação, os pré-tratamentos podem ser classificados como: físicos, químicos e biológicos, sendo possível a combinação entre eles. Os pré-tratamentos físicos realizam a redução de tamanho e como consequência aumentam a área superficial e a acessibilidade da biomassa; os pré-tratamentos químicos utilizam-se de reagentes químicos para modificar ou remover componentes da biomassa e os pré-tratamentos biológicos comumente utilizam fungos capazes de produzir enzimas que degradam de forma seletiva a lignina (ZHU; PAN, 2010; AGBOR et al., 2011; CHATURVEDI; VERMA, 2013). Vários tipos de pré-tratamentos podem ser aplicados à biomassa para diminuir sua recalcitrância para a produção de etanol 2G, dentre eles, os mais utilizados são os pré-tratamentos químicos em meio alcalino e em meio ácido, que são considerados mais atrativos industrialmente (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

2.3.1 Pré-tratamento alcalino

Os pré-tratamentos alcalinos são capazes de remover grandes quantidades da lignina e parte da hemicelulose presente na biomassa, aumentando a reatividade da celulose no material pré-tratado, com vantagens como o uso de baixas temperaturas e baixas pressões, reatores simples e a possibilidade de reuso do álcali residual. Entretanto, algumas desvantagens podem ser destacadas como custo, a segurança do processo e a dificuldade de recuperação do álcali (HU; RAGAUSKAS, 2012).

Dentre os reagentes mais utilizados destaca-se o hidróxido de sódio (NaOH) (HU; RAGAUSKAS, 2012). Uma importante vantagem do pré-tratamento alcalino com NaOH

além da despolimerização da lignina, é a capacidade de aumentar a área superficial da celulose, provocada pelo inchamento da sua estrutura ocasionada pela repulsão das cargas entre as fibrilas (ALVIRA et al., 2010).

2.3.2 Deslignificação em meio alcalino

Os pré-tratamentos em meio alcalino utilizam na sua maioria, reagentes como hidróxido de cálcio ($Ca(OH)_2$), amônia (NH_3) e principalmente o hidróxido de sódio (NaOH), e tem como principal objetivo clivar as ligações éter presentes na lignina (MOSIER et al., 2005; ALVIRA et al., 2010; BEZERRA; RAGAUSKAS, 2016).

A deslignificação é um tratamento capaz de maximizar a conversão da celulose dentro do processo de obtenção do etanol 2G. Estudos demostram que a conversão da celulose é mais efetiva quando a biomassa pré-tratada em meio ácido é submetida a um processo posterior de deslignificação (ZHU; PAN, 2010; KUMAR; CHANDRA; SADDLER, 2011; CARVALHO; QUEIROZ; COLODETTE, 2016).

Por outro lado, um problema associado a este pré-tratamento são as reações de *peeling*, que ocorrem em temperaturas acima de 100 °C, causando perda de rendimento de carboidratos e a redução da concentração do álcali (FENGEL; WEGENER, 1989; BERGGREN et al., 2002; GELLERSTEDT; EK; HENRIKSSON, 2009), que podem ser minimizadas pela adição da antraquinona no meio reacional (GELLERSTEDT; EK; HENRIKSSON, 2009; SCHILD; SIXTA; TESTOVA, 2010; NASCIMENTO et al., 2016)

A combinação entre o pré-tramento hidrotérmico e o pré-tramento em meio alcalino já foi abordada em diversos estudos aplicados a diferentes biomassas ligocelulósicas (LI; GELLERSTEDT; TOVEN, 2009; KUMAR; CHANDRA; SADDLER, 2011; ROCHA et al., 2014; TIAN et al., 2017). Foi mostrado que a redistribuição da lignina ocasionada pelas reações de despolimerização e repolimerização (LI; HENRIKSSON; GELLERSTEDT, 2007; WANG et al., 2017) associadas à temperatura do pré-tratamento, interferem na remoção da lignina residual pelo subsequente tratamento em meio alcalino (WANG et al., 2017).

O estudo realizado por Tian et al. (2017) também avaliaram a ação de processos de deslignificação após pré-tratamento por explosão a vapor, líquido iônico, organosolv, solvente eutético e soda/antraquinona, e concluíram que, embora a remoção da lignina

utilizando líquidos iônicos seja mais seletiva que o tratamento organosolv, a utilização de solvente eutéico gera uma polpa celulósica com maior grau de polimerização da celulose. Entretanto, a maior acessibilidade enzimática da celulose foi atingida com os tratamentos organosolv e soda/antraquinona que obtiveram 66,3 e 72,5% de rendimento de sólidos, respectivamente.

Estudos evidenciam que o processo de deslignificação alcalina causa alto impacto ambiental (DIAS et al., 2012; HU; RAGAUSKAS, 2012), no entanto, o estudo realizado por (ROCHA et al., 2014) mostra que o reciclo do NaOH utilizado na deslignificação diminui o impacto ambiental desta etapa na obtenção de etanol 2G. Além da despolimerização da lignina, o tratamento da biomassa com NaOH promove o inchamento das fibras de celulose pela repulsão das cargas entre as fibrilas, aumentando a área superficial e auxiliando na remoção da hemicelulose (KUMAR et al., 2009; ALVIRA et al., 2010).

Kumar et al. (2012) e Tian et al. (2017) realizaram estudos que mostram que conteúdos de lignina superiores a 30% limitam a conversão enzimática da celulose em glicose. Desse modo, os processos de remoção de lignina tornam-se vantajosos para a conversão em açúcares monoméricos, pois elevam a taxa conversão da biomassa para a produção de etanol 2G, sendo capazes de remover mais de 90% da lignina do material (DIAS et al., 2012). Além disso, a deslignificação em meio alcalino tem o benefício da remoção de inibidores no processo de fermentação gerados durante o pré-tratamento de explosão a vapor (ROCHA et al., 2012a),

Outros métodos já foram utilizados para remoção da lignina em biomassa pré-tratadas por explosão a vapor. Por exemplo, Kumar, Chandra e Saddler (2011) analisaram os resultados de deslignificação em relação à severidade do pré-tratamento e ao método de deslignificação utilizado (peróxido de hidrogênio em alcalino, sulfonação em meio neutro e clorito em meio ácido) e concluíram que pré-tratamentos com média severidade permitem melhor recuperação dos açúcares da hemicelulose e a deslignificação melhora a hidrólise enzimática da celulose. Outro método de deslignificação eficiente é o organosolv, que além de remover a lignina é capaz de remover a hemicelulose aumentando o acesso das enzimas à celulose, mas possui as desvantagens do alto custo do processo devido a utilização e a recuperação dos solventes orgânicos (KUMAR et al., 2009).

2.3.3 Branqueamento de polpa celulósica com peróxido de hidrogênio em alcalino

De acordo com o estudo realizado por Kumar; Chandra; Saddler, (2011), a deslignificação em meio alcalino, utilizando NaOH diminuiu o conteúdo de lignina do material pré-tratado por explosão a vapor, no entanto o estudo também comparou outros processos de deslignificação e concluiu que mesmo variando as condições do pré-tramento (severidade), os melhores resultados de remoção de lignina foram obtidos com a deslignificação com peróxido de hidrogênio em meio alcalino.

Durante o branqueamento, com o aumento da temperatura e a elevação do pH, o H_2O_2 se decompõe e ocorre a formação do íon hidroperóxido (-OOH), uma espécie nucleofílica forte, capaz de atacar de forma não reversível, os compostos cromóforos e a lignina residual presentes na polpa de celulose. Na presença de metais de transição, o H_2O_2 sofre uma rápida decomposição homolítica, que pode ser retardada pela presença de íons metálicos como magnésio, formando os íons superóxidos e inibindo a formação dos radicais hidroxil que atacam os carboidratos (ZERONIAN; INGLESBY, 1995; LI et al., 2011).

Estudos realizados por Pang et al., (2012) e Xie et al., (2013) sugerem que a utilização de agentes oxidantes em meio alcalino, como o oxigênio (O_2), é capaz de favorecer a conversão enzimática da biomassa lignocelulósica, e o estudo realizado por Rabelo et al., (2014) mostrou que o uso do H_2O_2 em meio alcalino aumentou a digestibilidade do bagaço de cana-de-açúcar chegando a atingir 92,6% de conversão da celulose.

Em escala industrial, os processos alcalinos mais utilizados para o isolamento da celulose são os processos Kraft e sulfito. No primeiro, a lignina é solubilizada quimicamente e parte da hemicelulose é dissolvida, gerando uma polpa com cerca de 65-80% de celulose. O segundo processo usando agentes de branqueamento remove a lignina residual, aumentando o teor de celulose da polpa. A polpa Kraft é responsável por cerca de 75% do mercado global de celulose celulósica. O processo sulfito produz uma polpa celulósica com elevado teor de pureza (> 90% de celulose) (SIXTA, 2006), mas representa apenas um pequeno segmento do mercado global de celulose celulósica. Em comparação com a polpa de sulfito, a polpa Kraft tem as vantagens de produzir fibras mais fortes e a capacidade de aceitar uma maior variedade de matérias-primas (SIXTA, 2006; YOUNG, 1994).

Atualmente, a remoção de lignina residual com peróxido de hidrogênio em meio alcalino é um processo utilizado principalmente na indústria de papel e celulose, como uma das etapas finais de branqueamento. Industrialmente, o processo ocorre com temperaturas que variam de 80 a 110 °C, com carga de peróxido de hidrogênio variando entre 0,5- 4% (m/m), e o hidróxido de sódio com cargas entre 2-3% (m/m) (GELLERSTEDT; EK; HENRIKSSON, 2009).

2.3.4 Pré-tratamentos por explosão a vapor

O pré-tratamento por explosão a vapor, que pode ser conduzido com ou sem a adição de catalisador, é o pré-tratamento mais utilizado industrialmente (MOSIER et al., 2005; TAHERZADEH; KARIMI, 2008). O processo consiste no tratamento da biomassa com vapor saturado sob alta pressão por um curto período de tempo (entre 30s e 20min) (TAHERZADEH; KARIMI, 2008), promovendo uma expansão térmica da biomassa, seguido por uma rápida descompressão, capaz de ocasionar a redução do tamanho das partículas e aumentar o tamanho dos poros da biomassa (MOSIER et al., 2005; ALVIRA et al., 2010).

A explosão a vapor não catalisada é considerada um pré-tratamento em meio ácido e tem como principal objetivo a remoção de hemicelulose. As vantagens desse processo são: a não utilização de produtos químicos para a catálise da hemicelulose, a baixa diluição dos açúcares solubilizados e consumo reduzido de energia (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009; AGBOR et al., 2011).

Durante o pré-tratamento por explosão a vapor, os grupos acetila presentes na hemicelulose são liberados inicialmente pela ação de uma pequena quantidade de íons que se formam durante a ionização da água sob altas pressões e temperatura formando o ácido acético (ALVIRA et al., 2010). O ácido acético e outros ácidos orgânicos liberados pela biomassa, catalisam a hidrólise da hemicelulose no processo denominando de autohidrólise (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009; AGBOR et al., 2011).

Por outro lado, assim como ocorre com outros pré-tratamentos em meio ácido, o pré-tratamento por explosão a vapor gera inibidores de fermentação como furfural e hidroximetilfurfural. Dependendo da concentração destes inibidores, uma etapa de condicionamento/detoxificação é necessária antes da fermentação. Além disso, o pré-

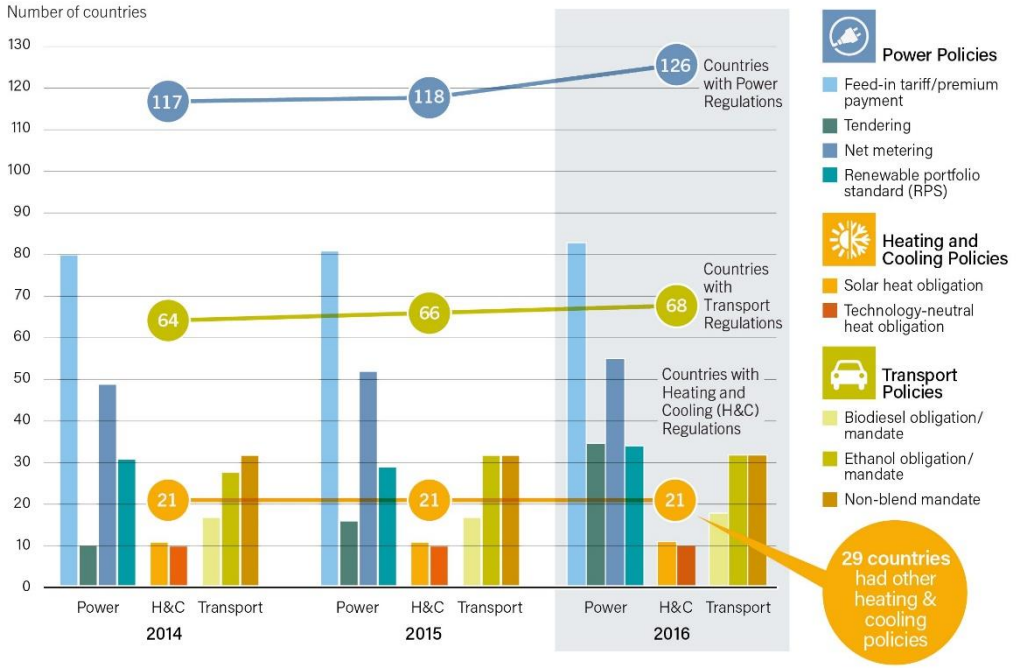
tratamento por explosão a vapor não é capaz de romper totalmente o complexo lignina-carboidrato e promove reações de condensação da lignina dificultando a sua extração (LI; HENRIKSSON; GELLERSTEDT, 2007; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009; AGBOR et al., 2011).

2.4 Etanol 2G

A demanda por energia e produtos de fontes renováveis tem aumentado o interesse pela biomassa lignocelulósica, de modo particular para os resíduos agroindustriais e florestais. Dentre as potencias fontes de energia **ren**ovável a biomassa lignocelulósica é considerada uma importante matéria-prima na obtenção de biocombustíveis e bioprodutos (LARSEN; HAVEN; THIRUP, 2012; GUERRIERO et al., 2016). Além disso, a abundância e sustentabilidade de matéria-prima tornam o uso de energia e combustíveis obtidos a partir de fontes renováveis uma forma de contribuir para a diminuição da emissão de CO_2 (LARSEN et al., 2008; CAVALETT et al., 2017; JAISWAL et al., 2017) e a diminuição das reservas de petróleo melhoram as perspectivas para os combustíveis obtidos de fontes renováveis e beneficiam a obtenção de bioprodutos (LEITRITZ et al., 2006).

Em 2017 a CONAB projetou um aumento de 0,2 % na produção nacional de etanol anidro, atingindo cerca de 11,1 bilhões de litros. Em relação a última safra, estima-se que haja uma redução de 6,1 % na produção total de etanol, totalizando aproximadamente 26 bilhões de litros. Com a adoção de políticas ambientais mais rígidas no uso de energia de fontes renováveis (Figura 5), 32 países já adotam a mistura mandatória de etanol à gasolina (REN21, 2017).

Figura 6- Países com políticas de uso de energia de fontes renováveis



Fonte: Adaptado de REN21, (2017)

Do ano de 2014 até o final de 2016 observou-se o crescimento 7,1 % no número de países que adotaram políticas para o uso de energia de fontes renováveis. Dos 117 países que utilizam essas políticas, aproximadamente 54 % já utilizavam combustíveis de fontes renováveis no final do ano de 2015. Atualmente o Brasil utiliza a mistura na proporção de 27% de álcool a gasolina, e outros países espalhados pelo mundo utilizam misturas que variam entre 2% e 25%, com 47 % utilizando a mistura mandatória de álcool à gasolina (REN21, 2017).

Diante do aumento da demanda por etanol, uma alternativa para uma maior produtividade é a produção de etanol 2G, que pode ser produzido de diversas fontes de biomassa. No entanto, a matéria prima necessita ser pré-tratada para viabilizar a sua conversão em etanol, e dentre os pré-tratamentos podemos destacar a explosão a vapor que já mundialmente usado em plantas de etanol 2G (Tabela 2).

A produção industrial de etanol a partir de materiais lignocelulósicos começou entre as décadas de 1910 e 1930, em tentativas isoladas de converter madeira em etanol através de hidrólise ácida no período que antecedeu a Segunda Guerra Mundial (BIRGIT KAMM; GRUBER; MICHAEL KAMM, 2006). Atualmente no Brasil somente a Raízen Energia está em operação em escala comercial produzindo etanol celulósico, em operação desde 2015 com capacidade de produção de 31600 t/ano, e o Cane Technology Center

(CTC), possui uma planta de demonstração de etanol 2G, em operação desde 2012 com capacidade para 2.400 t/ano (Database: Task 39).

Tabela 2- Plantas de produção de etanol 2G e pré-tratamento utilizado.

Empresa	**Localização**	**Matéria prima**	**Pré-tratamento**	**Capacidade declarada (t/ano)**
Abengoa Bioenergy Biomass of Kansas, LLC	Kansas/ Estados Unidos	Forragem de milho/ *switch grass*/palha de trigo	Ácido diluído	75.000
Beta Renowables	Crescentino/Italia	Palha de arroz/palha de trigo/poplar	Explosão a vapor	40.000
DowDuPont	Iowa/Estados Unidos	Forragem de milho	Amônia diluída	82.672
Granbio	Alagoas/Brasil	Bagaço/palha de cana-de-açúcar	Explosão a vapor	65.000
Raízen	São Paulo/Brasil	Bagaço de cana-de-açúcar	Explosão a vapor	31.600
POET-DSM Advanced Biofuels	Iowa/Estados Unidos	Forragem de milho	Explosão a vapor	70.000

Fonte: adaptado de Database: Task 39.

Embora, as plantas de produção apresentadas utilizem principalmente os pré-tratamentos em meio ácido, como explosão a vapor, a DowDuPont era a única das plantas a utilizava o pré-tratamento em meio alcalino com amônia como catalisador, e das plantas que estavam em operação em 2016 somente a Raízen e POE-DSM Advanced Biofuel estão em atividade atualmente.

2.4.1 Hidrólise enzimática para produção de etanol 2G

Para obtenção do etanol 2G o complexo celulose-hemicelulose-lignina deve ser desconstruído e os polissacarídeos convertidos a açúcares monoméricos através da hidrólise enzimática. Esta etapa é catalisada por coquetéis enzimáticos que incluem celulases e enzimas-acessórias que atuam em componentes específicos da parede celular (MOHANRAM et al., 2013).

A conversão da celulose catalisada por enzimas depende da combinação de endoglucanases (EC 3.2.1.4), responsáveis pela clivagem aleatória nas regiões internas de

menor organização das cadeias de celulose, e celobiohidrolases (CBH) (EC 3.2.1.91) que atuam nas extremidades da cadeia de celulose. A CBH I age nas extremidades redutoras e a CBH II nas extremidades não redutoras da cadeia, liberando principalmente celobiose. A β-glicosidase (EC 3.2.1.21) hidrolisa principalmente a celobiose em unidades de glicose (LYND et al., 2002; MEYER; ROSGAARD; SØRENSEN, 2009). No entanto, a ação sinérgica entre as celulases e as enzimas auxiliares aumentam substancialmente a conversão da biomassa em açúcares fermentescíveis (BIRGIT KAMM; GRUBER; MICHAEL KAMM, 2006; HU; ARANTES; SADDLER, 2011; ROBL et al., 2016).

Um estudo realizado por (McMILLAN et al., 2011) avaliou quatro preparos pré-comercias ricos em celulases desenvolvidos por grandes fornecedoras de coquetéis enzimáticos para o mercado de conversão de biomassa. Neste estudo foi observado que os preparos com maior atividade das enzimas β-glicosidases obtiveram melhores desempenhos na conversão da celulose, com menores quantidades de enzimas, permitindo uma economia de custos dos processos.

Comercialmente os preparos enzimáticos ricos em hemicelulases foram desenvolvidos em menor proporção que os preparos ricos em celulases, devido aos pré-tratamentos aplicados à biomassa para hidrolisar a hemicelulose. No entanto, os preparos enzimáticos comerciais destinados a conversão de biomassa que dispunham de pequenas quantidades de hemicelulases eram inadequados para completa conversão da hemicelulose, o que motivou pesquisas de preparos de hemicelulases que atuassem sinergicamente com as celulases (MOHANRAM et al., 2013).

Um preparo enzimático eficiente deve ser capaz de maximizar a hidrólise dos polissacarídeos da biomassa quando usado em pequenas quantidades. Entretanto, vários fatores devem ser considerados, como o tipo de substrato, o pré-tratamento utilizado e o emprego de diferentes enzimas que compõem o coquetel (MEYER; ROSGAARD; SØRENSEN, 2009).

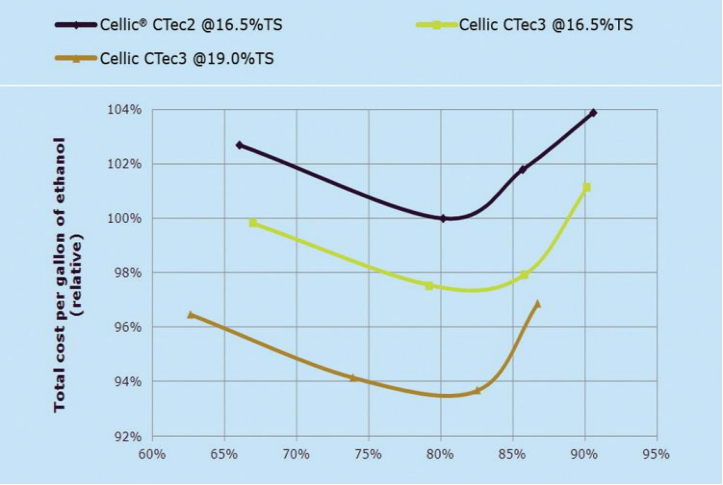
Na produção de etanol 2G além da etapa de pré-tratamento, outra etapa importante é a hidrólise enzimática, que nos últimos anos tem recebido atenção e esforços em pesquisa na hidrólise com alta cargas de sólidos (GAO et al., 2014; GENG et al., 2015; SANT'ANA DA SILVA et al., 2016; QIU et al., 2017). A alta carga de sólidos é considerada a concentração dos sólidos igual ou superior a 15% (m/m) (MODENBACH; NOKES, 2013; KOPPRAM et al., 2014), também como concentração de sólidos com pequena quantidade ou nenhuma quantidade de água livre (KRISTENSEN; FELBY; JØRGENSEN, 2009a).

Na hidrólise enzimática, a conversão da celulose diminui linearmente com o aumento da concentração de sólidos (KRISTENSEN; FELBY; JØRGENSEN, 2009b), causada pela dificuldade na difusão das enzimas devido a pequena quantidade de água disponível, e a alta viscosidade do sistema, que limita a transferência de massa, a transferência de calor e diminui a eficiência na agitação (MODENBACH; NOKES, 2013; DU et al., 2014b; KOPPRAM et al., 2014). Embora a alta carga de sólidos apresente desvantagens, um dos atrativos desse sistema é geração de açúcares em altas concentrações. Assim, a utilização de alta carga de sólidos possibilita a obtenção de concentrações de açúcares em torno de 8% (m/m) para viabilizar o processo de etanol 2G, isso porque, a concentração de etanol deve ser igual ou maior 4% (m/m) ao final da fermentação alcoólica para tornar o processo de destilação economicamente viável (LARSEN et al., 2008).

Estudos mostram que atingir 100% de conversão de celulose para a produção de etanol não parece ser uma estratégia viável tecnicamente (HOGAN et al., 1990; MOONEY et al., 1998; ARANTES; SADDLER, 2011; HORN et al., 2012), sendo o fator limitante da total conversão da celulose a cinética enzimática de conversão, que ocorre em três fases distintas. Na primeira fase, a taxa de e conversão é alta e caracterizada especialmente pela rápida adsorção das enzimas ao substrato; na segunda fase há uma taxa de conversão moderada do substrato (de 50 a 70%), seguida por uma fase final com baixa taxa de conversão, devido a ata recalcitrância do material restante (ARANTES; SADDLER, 2011).

De acordo com o maior fabricante de coquetéis enzimáticos destinados conversão de biomassa, Novozymes (2012), atingir 100% de conversão de celulose em etanol não é um processo viável economicamente (Figura 6), pois para atingir uma conversão com valores próximos a 100%, o tempo necessário seria extremamente alto e/ou cargas elevadas de enzimas seriam necessárias, mesmo para diferentes substratos e diferentes métodos de pré-tratamentos(ARANTES; SADDLER, 2011).

Figura 7- Custo relativo do galão de etanol 2G associado ao percentual de conversão de substrato.



Fonte: Adaptado de Novozymes, (2010).

Alcançar valores de conversão de celulose próximos de 70% (segunda fase da hidrólise) torna o processo mais atraente e ainda gera uma concentração viável de açúcares monoméricos (MODENBACH; NOKES, 2013). Consequentemente, também é obtido um resíduo altamente recalcitrante rico em celulose cristalina (OKSMAN et al., 2010; ZHU; SABO; LUO, 2011; TSUKAMOTO; DURÁN; TASIC, 2013; CAMARGO et al., 2016). Este resíduo pode ser usado para produzir nanoceluloses como co-produto de alto valor agregado, melhorando a viabilidade econômica da produção de etanol 2G (LEISTRITZ et al., 2006; DURÁN et al., 2011). Esta parece ser uma nova estratégia para a implantação ou adequação de plantas de etanol e biomateriais (CAMARGO et al., 2016). De fato, a produção integrada de nanocelulose com a produção de açúcar para o etanol 2G já foi investigada em alguns estudos recentes (CHIRAT; LACHENAL; DUFRESNE, 2010; OKSMAN et al., 2010; ZHU; SABO; LUO, 2011; TSUKAMOTO; DURÁN; TASIC, 2013; SONG et al., 2014; CAMARGO et al., 2016). No mais recente (CAMARGO et al., 2016), o bagaço de cana-de-açúcar foi utilizado como matéria-prima para a produção integrada de açúcares monoméricos e nanocelulose. Embora vários estudos já tenham provado que é possível, através da hidrólise enzimática, produzir nanocristais de celulose e açúcares fermentescíveis, vários destes estudos utilizaram matérias primas (FILSON; DAWSON-ANDOH; SCHWEGLER-BERRY, 2009; ANDERSON et al., 2014; TEIXEIRA et al., 2015) e/ou processos e condições (CHIRAT; LACHENAL; DUFRESNE, 2010; TSUKAMOTO; DURÁN; TASIC, 2013) de obtenção de polpa celulósica diferentes daqueles atualmente explorados para produção comercial de etanol

2G. Neste sentido, a real viabilidade técnica da produção integrada de CNC com o processo de etanol 2G ainda precisa ser avaliada.

O conceito de biorrefinaria torna-se atrativo economicamente, pois promove a valorização da biomassa vegetal, e dentro desse conceito os combustíveis são os produtos gerados em maior quantidade e os bioprodutos de alto valor agregado, em menor escala, garantem a rentabilidade de todo processo, situação semelhante a uma refinaria de petróleo.

2.5 Nanocelulose

A nanocelulose é um material em escala nanométrica que possui, pelo menos, uma das dimensões menor que 100 nm (HABIBI; LUCIA; ROJAS, 2010; MOON et al., 2011; DUFRESNE, 2012). Este material pode ser extraído de várias fontes de celulose nativa como plantas, animais, bactérias e algas e, de acordo com suas propriedades, é dividido em três categorias: celulose nanocristalina (CNC), celulose nanofibrilada (CNF) e celulose bacteriana (CB) (DUFRESNE, 2012). Dentre as fontes de extração de nanocelulose podemos destacar a biomassa vegetal, a mais abundante mundialmente.

O primeiro passo necessário na produção de nanocelulose é obter uma polpa rica em celulose. A maioria dos métodos para o isolamento de celulose do bagaço de cana-de-açúcar empregou tratamentos para a remoção total ou parcial de lignina e hemicelulose, seguido pelo branqueamento polpa de celulose. A caracterização química da polpa de celulose produzida é importante, pois a presença de materiais não celulósicos na polpa pode interferir no método subsequente escolhido para a produção de nanocelulose, aumentar o rendimento, alterar a estabilidade térmica e mesmo gerar nanocelulose com novas aplicações potenciais (JONOOBI et al., 2015; SANTUCCI et al., 2016).

No Brasil as maiores fontes de celulose são a polpa kraft de eucalipto, que já possui um destino principalmente dentro do mercado de papel e celulose, e o bagaço de cana-de-açúcar, que já é utilizado para a geração de energia e combustível é uma potencial matéria prima para a produção de nanocelulose. Independentemente da fonte, a celulose possui muitas características semelhantes, tais como biodegradabilidade e renovabilidade. As diferenças na morfologia e no tamanho das nanopartículas são geralmente associadas ao

método pelo qual a celulose é isolada da matriz lignocelulósica e processada em nanoceluloses (JONOOBI et al., 2015).

As propriedades mecânicas das nanoceluloses dependem da fonte do material celulósico, fatores como morfologia, dimensões, estrutura cristalina, grau de cristalinidade, que por sua vez dependem do método pelo qual a nanocelulose foi isolada (REBOUILLAT; PLA, 2013). Propriedades mecânicas das diferentes partículas de celulose são dadas pela alta razão de aspecto (comprimento/largura), módulo Young entre 129 e 250 GPa, que pode ser comparável ao kevlar (60 a 125 GPa) e superior ao aço 200-220 GPa (MOON et al., 2011; LIN; DUFRESNE, 2014). As propriedades térmicas (como temperatura de degradação) da CNC produzida por hidrólise ácida é geralmente em torno de 260 °C e coeficiente de expansão térmica similar ao do quartzo determinam as diferenças entre as CNCs.

As propriedades de biodegradabilidade e biocompatibilidade tornam a nanocelulose altamente aplicável na indústria biomédica, em formulações com agentes antibacterianos em curativos, ataduras, implantes, peles artificiais para queimaduras, máscaras, vasos sanguíneos artificiais, punhos para a cirurgia dos nervos, liberação de fármacos, suporte para imobilização de enzimas e tecidos cosméticos (REBOUILLAT; PLA, 2013; LIN; DUFRESNE, 2014).

A nanocelulose pode ser utilizada na indústria automotiva e aeroespacial, e modificações químicas da superfície de nanocelulose permitem que sejam utilizadas em revestimentos, adesivos, vedações, filtros, membranas, embalagem e cosméticos, dispositivos flexíveis transparentes, como telas planas, câmeras digitais, telefones celulares, circuitos integrados, papel ou cartão para impressão e gravação de cristais líquidos de informação para janelas transparentes, lâmpadas ou mostradores de relógios (HABIBI; LUCIA; ROJAS, 2010; REBOUILLAT; PLA, 2013; LIN; DUFRESNE, 2014).

Uma das aplicações mais inovadoras da nanocelulose está na indústria de óleo e gás. O setor tem recebido muita atenção dos pesquisadores em busca de materiais de alto desempenho e novas tecnologias. De acordo com Salas et al., (2014) a nanocelulose melhora a reologia dos fluidos de perfuração, reduz o atrito no revestimento dos poços de petróleo e devido à grande possiblidade de funcionalização, a CNC pode ser utilizada nas emulsões que estabilizam a interface óleo água (GRISHKEWICH et al., 2017).

Com base em aplicações da indústria de papel, embalagens, têxtil, cimento, e de automóveis o volume médio estimado de consumo de nanocelulose nos EUA é de 5,9

milhões toneladas/ano. Em aplicações em sensores, construção, aeroespacial, cosméticos, farmacêuticas e tintas e adesivos estima-se 0,48 milhões de toneladas/ano e consumo global em torno 35 milhões de toneladas/ano sem considerar os setores de inovação tecnológica (SHATKIN; WEGNER; BILEK, 2014).

Uma estimativa de mercado realizada no início desta década previu que produtos baseados em nanotecnologia movimentaria a cifra de US$ 3 trilhões em 2020, com 20% desses produtos obtidos a partir de biomassa vegetal e, o material de maior relevância, os nanocristais de celulose (WALKER, 2012).

Em 2014 já existiam empresas produzindo nanocelulose em escala piloto, como a CelluForce (1 tonelada/dia) e Alberta Inova (20 kg/dia) produzindo CNC no Canadá, e para a produção de CNF no Japão as Indústrias Nippon com 100 kg/dia, na Suécia a Innventia, 100 kg/dia, na Finlândia a UPM-Kymmene com 1 tonelada/dia e Stora Enso 1 tonelada/dia. (RAINS; RUDIE; WEGNER, 2014). A Tabela 3 mostra as maiores empresas produtoras de nanoceluloses atualmente, e de acordo com Cowie et al., (2014) o custo de produção de nanomateriais de celulose varia entre U$4,4 a U$11 por kg.

Tabela 3- Capacidade declarada de produção de CNC e CNF no ano de 2016

CNC		**CNF**	
Empresa	**Produção (kg/dia)**	**Empresa**	**Produção (kg/dia)**
CelluForce	1.000	Paperlogic	2.000
Americam Process	500	University of Maine	1.000
Melodea	100	Americam Process	500
Alberta Innovates	20	Nippon Paper	150
US Forest Products Lab	10	Innventia	100
Blue Goose Biorefineries	10	Oji Paper	100
FPInnovations	2	Empa	15

Fonte: Adaptado de Miller, (2016).

2.5.1 Celulose bacteriana

Devido a sua biocompatibilidade, que está diretamente associada seu auto grau de pureza e a forma como é sintetizada, a celulose bacteriana (CB) é a nanocelulose que mais se adequa as aplicações médicas como nos crescimentos de tecidos e ossos. (LIN; DUFRESNE, 2014; JONOOBI et al., 2015).

A CB pode ser sintetizada por várias espécies de bactérias, tais como, *Acetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligeneses*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* ou *Sarcina*, sendo a mais eficiente a *Acetobacter xylinum* ou *Gluconcetobacter xylinus* (LIN; DUFRESNE, 2014; JONOOBI et al., 2015). A CB é secretada com diâmetro que varia de 2-4 nm, comprimento menor que 100 nn, cristalinidade acima 85%, grau de polimerização acima de 8000 (SIRÓ; PLACKETT, 2010), densidade 1600 kg/m³, módulo de Young 30 GPa. Além disso, a CB é altamente hidrofílica e dispensa tratamentos de purificação como a celulose da biomassa lignocelulósica (JONOOBI et al., 2015).

2.5.2 Celulose Nanofibrilada

As nanofibrilas de celulose são partículas longas de fibrilas elementares de celulose que possuem regiões cristalinas e não cristalinas. O diâmetro do CNF pode variar de 2 a 20 nm e o comprimento pode ser até alguns micrômetros e, conseqüentemente, possui alta razão de aspecto (comprimento/diâmetro) (JONOOBI et al., 2015). A desintegração das fibras de celulose para obter CNF pode ser conseguida por métodos mecânicos, tais como homogeneização ou microfluidização em alta pressão, e desfibrilação mecânica por nanorrefino. A ultasonicação de alta intensidade também foi relatada como um método para a produção de CNF.

Para reduzir a necessidade de energia do tratamento mecânico - principalmente por homogeneização e microfluidização - para a produção de CNF e para tornar o processo mais econômico e ambientalmente atraente, os pré-tratamentos químicos ou enzimáticos são geralmente associados aos processos de desintegração das fibras de celulose.

2.5.2.1 Homogeneização e microfluidização em alta pressão

A homogeneização de alta pressão é um método conhecido que pode ser aplicado para desfibrilação de celulose em uma suspensão diluída 1-2% (m/m) que é bombeada através de uma fenda que se abre e fecha rapidamente por meio de um conjunto de válvula de mola. Este processo envolve as fibras de celulose para forças de cisalhamento e descompressão sob temperatura controlada (70-90 °C), para que a suspensão adquira uma aparência gelatinosa translúcida, uma indicação de que as fibras de celulose foram desintegradas, são necessárias várias passagens através do homogeneizador (10-15 passes) (HENRIKSSON et al., 2007; DUFRESNE, 2012; KHALIL et al., 2014).

No processo de microfluidização, uma suspensão de fibras de celulose é submetida a bombeamento de pressão através de um canal em forma de z, com dimensões variando de 200 a 400 μm. Quando comparado ao processo de homogeneização, a microfluidização é capaz de produzir partículas com tamanhos mais uniformes (ABDUL KHALIL et al., 2014). Embora a homogeneização de alta pressão e a microfluidização sejam métodos eficientes para a produção de CNF, esses processos têm dois grandes problemas associados: o alto consumo de energia devido à necessidade de muitos passes para atingir partículas de celulose em nanoescala; e obstrução frequente dos canais por onde passa a suspensão de celulose ((DUFRESNE, 2012; WANG et al., 2015).

2.5.2.2 Nanorefinamento

Outro método de produção do CNF é o nanorrefino em um refinador de disco. A separação das fibras é realizada através de discos cerâmicos dispostos uma sobre a outra com uma pequena separação entre eles. O disco superior é fixo e o inferior executa rotações tipicamente configuradas em cerca de 1500 rpm (ABDUL KHALIL et al., 2014), 2014). Neste método, as fibras de celulose são submetidas a forças de cisalhamento e atrito capazes de isolar fibrilas com diâmetros de 20-90 nm. Quando comparado ao homogeneizador e ao microfluidificador, o refinador de disco tem menor consumo de energia para desfibrilação de celulose (DUFRESNE, 2012; WANG et al., 2012, SIQUEIRA; ARANTES, 2016)

2.5.2.3 Ultrasonicação de alta intensidade

O método de ultrasonicação de alta intensidade é menos estudado do que os outros métodos para produção de CNF. Zhao; Feng; Gao, (2007) usou um ultra-som equipado com uma sonda de liga de titânio com um diâmetro de 2,5 cm e uma frequência de 20 kHz para gerar nanopartículas com diâmetro na faixa de 25-120 nm. Mais tarde, Wang; Cheng, (2009)Wang e Cheng, (2009) empregaram o mesmo método para isolar o CNF, que posteriormente foi caracterizado em Cheng; Wang; Han, (2010), obteve partículas de 20-30 nm de diâmetro. Neste método, a ação das forças hidrodinâmicas promove a cavitação das fibras de celulose, incluindo a formação, expansão e implosão das microbolhas no líquido. A eficiência de desfibrilação por ultrasonicação de alta intensidade depende da energia, do tamanho da fibra, da temperatura, do tempo, da concentração de suspensão de celulose e da distância da sonda (WANG; CHENG, 2009; DUFRESNE, 2012; DE CAMPOS et al., 2013; KHALIL et al., 2014).

2.5.2.4 Pré-tratamentos

Entre os pré-tratamentos químicos investigados para reduzir a demanda de energia durante a produção de CNF, destacam-se a oxidação com TEMPO (radical 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxilo) que promove a modificação das cargas de superfície da celulose (SAITO et al., 2009; JONOOBI et al., 2015), a oxidação com NaBr e NaClO utilizada como catalisadores ou oxidantes primários e carboximetilação (JONOOBI et al., 2015). As cargas negativas introduzidas pela reação de oxidação promovem a repulsão das nanofibrilas, favorecendo a ação de forças de cisalhamento ou de delaminação responsáveis pela desfibrilação (SIRÓ; PLACKETT, 2010; KHALIL et al., 2014).

Um pré-tratamento enzimático controlado também pode ser usado como um método eficiente antes da desfibrilação mecânica. Foi sugerido que o tratamento enzimático pode promover o afrouxamento das fibras de celulose, o que, por sua vez, favoreceria economia de energia (HENRIKSSON et al., 2007; PÄÄKKO et al., 2007; ZHU; SABO; LUO, 2011). Além disso, demonstrou-se que o resíduo da hidrólise

enzimática da polpa kraft de eucalipto, sob condições controladas para a produção de açúcares fermentáveis, também pode ser utilizado para a produção de CNF (ZHU; SABO; LUO, 2011; SONG et al., 2014).

2.5.3 Celulose nanocristaliana

Os nanocristais de celulose (CNC) são partículas no formato de hastes cilíndricas isoladas pela hidrólise das regiões amorfas e constituídas exclusivamente pelas regiões cristalinas da celulose, que frequentemente apresentam diâmetros menores que 10nm (BONDESON; MATHEW; OKSMAN, 2006; JONOOBI et al., 2015), com comprimentos que variam 100 a 1.000nm e dependo do tipo de reação catalítica pela qual as partículas são extraídas e seu índice de cristalinidade varia entre 50-90% (SIQUEIRA; ARANTES, 2016).

2.5.3.1 Métodos de extração de celulose nanocristalina

2.5.3.1.1 Hidrólise ácida

O método mais utilizado para a extração da CNC é a hidrólise com ácidos fortes. O ácido mais utilizado é ácido sulfúrico (H_2SO_4), tornando necessário o uso de equipamentos resistentes a corrosão. Embora o estudo realizado por (CHEN et al., 2015) tenha obtido rendimento de até 70%, o processo de extração de CNC gera açúcares em baixa concentração, produtos de degradação de carboidratos que inviabilizam a utilização dos coprodutos, requerem algumas etapas de purificação e com rendimento em torno de 30% (BONDESON; MATHEW; OKSMAN, 2006; HABIBI; LUCIA; ROJAS, 2010).

Para a obtenção de celulose nanocristalina, além do H_2SO_4, ácidos como HCl, H_3PO_4 e HBr em altas concentrações já foram utilizados (JONOOBI et al., 2015). A concentração do ácido sulfúrico utilizada para a extração da CNC varia em torno de 65% (m/m), a temperatura de ambiente até 70ºC, por um período de poucos minutos a algumas horas (HABIBI; LUCIA; ROJAS, 2010; DUFRESNE, 2012). Durante o processo de hidrólise as regiões de menor organização da celulose são hidrolisadas rapidamente. As

regiões cristalinas são altamente resistentes ao ataque do ácido devido ao empacotamento das cadeias de celulose (BRINCHI et al., 2013).

A extração da CNC através da hidrólise ácida, comumente, adota as seguintes etapas: a) hidrólise sob condições controladas (concentração do ácido, temperatura, tempo, agitação, razão entre o ácido e a celulose); b) interrupção da reação hidrolítica pela adição de água, sucessivas lavagens e centrifugação; c) extensivas diálises para remoção do ácido residual; d) tratamento mecânico por sonicação, para a dispersão das partículas para obtenção de uma suspensão uniforme e estável; e) concentração e secagem para obtenção do material sólido (BRINCHI et al., 2013).

Durante a hidrólise ácida ocorre a funcionalização da celulose, e os cristais formados possuem cargas negativas pela inserção dos grupos sulfatos que alteram sua superfície (BECK-CANDANEDO; ROMAN; GRAY, 2005), alteram a reatividade da celulose, além disso, o grau de polimerização das cadeias são alterados o que pode ser associado ao comprimento do cristal (HABIBI; LUCIA; ROJAS, 2010; BRINCHI et al., 2013). No entanto, a presença dos grupos sulfato na superfície da CNC melhoram a estabilidade da suspensão, e a cristalinidade do material é reduzida devido a inespecífica as ação do ácido em regiões amorfas e cristalinas da celulose (ANDERSON et al., 2014; LIN; DUFRESNE, 2014).

2.5.3.1.2 Hidrólise enzimática

O primeiro estudo para obtenção de CNC através de hidrólise enzimática foi realizado por Filson; Dauson-Andoh, Schewegler-Berry (2009) através de sucessivas etapas de hidrólise enzimática de polpa reciclada e o preparo enzimático Celluclast 1.5 L, (Novozymes). Neste estudo, foram obtidos cristais com diâmetros de 30-80nm e comprimento de 100 nm-1.8 µm.

A hidrólise enzimática para a obtenção da CNC é uma alternativa a hidrólise ácida, pois pode reduzir os impactos ambientais como a demanda de água utilizada e a baixa geração de resíduos químicos (FILSON; DAWSON-ANDOH; SCHWEGLER-BERRY, 2009; ZHU; SABO; LUO, 2011; BRINCHI et al., 2013). Além disso, favorece a recuperação dos açúcares em um processo integrado na obtenção de bioprodutos (DURÁN et al., 2011; ZHU; SABO; LUO, 2011).

O processo de sonicação também pode ser aplicado para a dispersão da CNC produzida por hidrólise enzimática, os cristais formados pela hidrólise das regiões amorfas da celulose não possuem cargas na superfície, o que diminui a estabilidade da suspenção, mas por outro lado, apresentam maior estabilidade térmicas, melhores propriedades mecânicas e permitem a pronta funcionalização pela presença de hidroxilas livres (ANDERSON et al., 2014).

Atualmente, não há relatos de preparos enzimático destinados a conversão de material lignocelulósico em nanoceluloses (ANDERSON et al., 2014; TEIXEIRA et al., 2015), o que leva a baixos rendimentos em CNC (SIQUEIRA; ARANTES, 2016). Considerando diferentes fontes de biomassa potencialmente geradoras de energia, vários estudos abordaram a produção de nanoceluloses integradas a produção de etanol 2G (Tabela 4).

Tabela 4- Capacidade declarada de produção de CNC e CNF no ano de 2016.

Matéria-prima	**Tipo de nanocelulose**	**Referência**
Bagaço de cana-de-açúcar	CNC	(CAMARGO et al., 2016)
Polpa kraft branqueada (*hardwood*)	CNF	(SONG et al., 2014)
Casca de laranja	CNC	(TSUKAMOTO; DURÁN; TASIC, 2013)
Resíduo de madeira	CNC	(OKSMAN et al., 2010)
Polpa kraft branqueada (*eucalyptus sp*)	CNF	(ZHU; SABO; LUO, 2011)
Madeira	CNC	(CHIRAT; LACHENAL; DUFRESNE, 2010)
Palha de trigo/	CNC	(LEISTRITZ et al., 2006)

Fonte: Arquivo pessoal

O estudo de prospecção econômica realizado por Leitritz et al., (2006) avaliou a viabilidade econômica da produção nanocristais de celulose (CNC), utilizando o resíduo de hidrólise de palha de trigo, em uma biorrefinaria de etanol 2G. O estudo considerou 60% de conversão da celulose para a produção de etanol, com isso, foi estimado que o valor de produção de etanol seria de US$ 0,41 sendo vendido pelo valor de mercado US$ 0,47 por litro. Para produção de CNC foi utilizado menos de 1% do resíduo da hidrólise da produção de etanol e dentro do conceito de biorrefinaria, o custo de produção estimado para CNC foi de US$ 1,26 por kg e o valor de venda US$ 1,89 por kg. A análise económica indica que a produção de CNC é um aprimoramento do desempenho económico de uma palha de trigo para usina de etanol.

Recentemente, Assis et al. (2017) realizaram o estudo econômico da produção CNC por hidrólise ácida utilizando polpa de dissolução. Durante o estudo foi observado que, a matéria-prima era responsável por cerca de 40 % do custo associado a produção de CNC, mesmo quando foi simulado reciclo do ácido sulfúrico e a planta de produção da CNC não estava colocalizada à planta de produção da matéria-prima.

Por outro lado, para os cenários nos quais a planta de CNC estava colocalizada à planta de produção da polpa de dissolução, sem o reciclo do ácido sulfúrico utilizado no processo o custo da matéria-prima correspondeu a cerca de 45% do custo de produção da CNC. Entretanto, o custo da matéria-prima representou aproximadamente 42,3 % para o cenário com o processo que recuperava o ácido.

A redução no custo de produção gerado pelo reuso do ácido sulfúrico foi 3,9 e 5,9% por tonelada de CNC (seca), para as plantas isoladas e colocalizadas à planta de produção de matéria-prima, respectivamente. Embora, tenha sido observado que o reciclo do ácido sulfúrico reduz o custo de produção da CNC, a matéria-prima é o componente de maior contribuição nos custos em todos os cenários. O cenário adotado pelos autores como o mais rentável, foi o que não recupera o ácido sulfúrico, a planta de produção de CNC está colocalizada à planta de produção de matéria-prima, e leva em consideração o menor tempo de retorno de investimento do projeto, com a CNC sendo comercializada por no mínimo US$ 4829 a tonelada.

2.6 Nanocelulose a partir de bagaço de cana-de-açúcar

Em geral, a CNC produzida a partir do bagaço de cana-de-açúcar mostrou ter diâmetro e comprimento dentro da faixa de 4 a 60 nm e 89 a 280 nm, respectivamente (Tabela 5). Para fins de comparação, o diâmetro e o comprimento típicos da CNC produzidas a partir de polpa celulose de madeira macia e dura - a celulose mais comumente utilizada para a produção de nanocelulose - é de cerca de 4-5 nm e 100-150 nm, respectivamente, para o método de hidrólise ácida (BECK-CANDANEDO; ROMAN; GRAY, 2005) e 4-80 nm e 70 nm-1.8 μm, respectivamente, para o método de hidrólise enzimática (FILSON; DAWSON-ANDOH; SCHWEGLER-BERRY, 2009). Quando comparados as CNC de celulose de madeira, a CNC da cana-de-açúcar parece ter partículas com maior diâmetro e menor comprimento.

Tabela 5- Métodos de produção e propriedades das nanoceluloses de bagaço de cana-de-açúcar.

NC	Método[1]	Diâmetro (nm)	Comprimento (nm)	ICr[2] (%)	Referência
CNC	HA	9.8 ±6.3	280.1 ±73.3	68.54 ±1.3	(LAM et al., 2017)
	HE/HA	14.0-18.0	193-246	77.7-81.7	(CAMARGO et al., 2016)
	HA	4.1-7.0	89-117	77-86	(OLIVEIRA et al., 2016)
	Moagem/HE	4-12	1000-5000	63.95-61.59	(TEIXEIRA et al., 2015)
	HA	20-60	250-480	72.5	(KUMAR et al., 2014)
	HA	10.11 ±3.36	247.51 ±32.34		(SLAVUTSKY; BERTUZZI, 2014)
	HA	35	170		(MANDAL; CHAKRABARTY, 2011)
	HA	4 ±2	255 ±55	70.5-87.5	(TEIXEIRA et al., 2011)
CNF	HG	5-10	264 ±69	68.10 ± 0.18	(SAELEE et al., 2016)
	HG	15 ±8		40.0	(ZHANG et al., 2016)
	HG	60-100	3000-4000		(BANSAL et al., 2016)
	USAI	31-33			(SANTUCCI et al., 2016)
	Moagem	4-35	500-1500	59.6	(TEIXEIRA et al., 2015)
	USAI	≈40			(DE CAMPOS et al., 2013)
	HG	10-20		36	(LI et al., 2012)
	HG/HA	30			(BHATTACHARYA; GERMINARIO; WINTER, 2008)

[1]HA: hidrólise ácida; EH: hidrólise enzimática; HG: Homogeneização; USAI: ultrassonicação de alta intensidade; [2]CrI: índice cristalinidade.

Fonte: Arquivo pessoal

O índice de cristalinidade (ICr), comumente medido por difração de raios X e analisado pelo método de Segal et al. (1959), é outro parâmetro importante das nanoceluloses e indica o nível de organização do material. Para a CNC da cana-de-açúcar, o índice de cristalinidade variou de 68,5-87,5% (TEIXEIRA et al., 2011; KUMAR et al., 2014; CAMARGO et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2016; LAM et al., 2017).

O método mais utilizado para a produção de CNC a partir de polpa de bagaço de cana-de-açúcar é a hidrólise ácida, o que leva a um aumento do índice de cristalinidade de 56,7% (BEZERRA; RAGAUSKAS, 2016) para valores em torno de 74 (valores médios de cristalinidade apresentados na Tabela 3). O rendimento de nanocristais do bagaço de cana de açúcar foi relatado em um número limitado de estudos. Por exemplo, (OLIVEIRA et al., 2016) relataram rendimento de CNC de 9-24% e (TEIXEIRA et al., 2011) cerca de 50-58%. Esses rendimentos são distintos da maioria dos estudos sobre a produção de CNC a partir de polpa à base de madeira, geralmente cerca de 30% de (BONDESON; MATHEW; OKSMAN, 2006).

Embora a cristalinidade inferior da CNF – em comparação com os materiais de partida – parece ser uma tendência geral como mostrado por Li et al. (2012), que relataram uma diminuição de 60 para 36% e Zhang et al., (2016) de 65 a 40%, no entanto, Saelee et al., (2016) relataram um aumento no índice de cristalinidade de 59,5% para o material de partida para 68,1% para a CNF produzida.

Embora o índice de cristalinidade para CNF do bagaço tenha sido relatado apenas em alguns estudos (Tabela 5), não há consenso geral sobre o que acontece com o índice de cristalinidade durante o processamento de celulose para a produção de CNC. Recentemente foi demonstrado que há relatos na literatura que indicam um aumento no ICr após o processamento, enquanto outros observaram uma diminuição e até mesmo a manutenção da cristalinidade da matéria-prima (SIQUEIRA e ARANTE, 2016). Essas observações contraditórias sobre a cristalinidade de CNF provavelmente foram causadas pelas diferenças nos processos de obtenção. Agoda- Tanjawa et al. (2010) e Iwamoto; Nakagaito, Yano (2007) produziram CNF por homogeneização e moagem, respectivamente, e observaram uma diminuição no índice de cristalinidade. Por outro lado, Cheng et al. (2007) e Abe e Yano, (2009) observaram um aumento no índice de cristalinidade da CNF produzida usando ultrassonicação de alta intensidade e moagem de, respectivamente.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a viabilidade técnica da integração da produção de nanoceluloses ao processo de produção de etanol de segunda geração a partir do bagaço de cana-de-açúcar.

3.2 Objetivos Específicos

- Produzir polpa celulósica de bagaço de cana-de-açúcar através de pré-tratamento por explosão a vapor seguido por deslignificação em meio alcalino;
- Identificar os parâmetros de hidrólise que possibilitem a obtenção de açúcares fermentescíveis de bagaço de cana-de-açúcar;
- Determinar o ponto de conversão ideal para a produção de nanocelulose em um processo integrado a obtenção de açúcares fermentescíveis;
- Produzir nanocelulose (CNC e CNF) a partir do resíduo de hidrólise da polpa celulósica;
- Caracterizar as nanoceluloses obtidas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

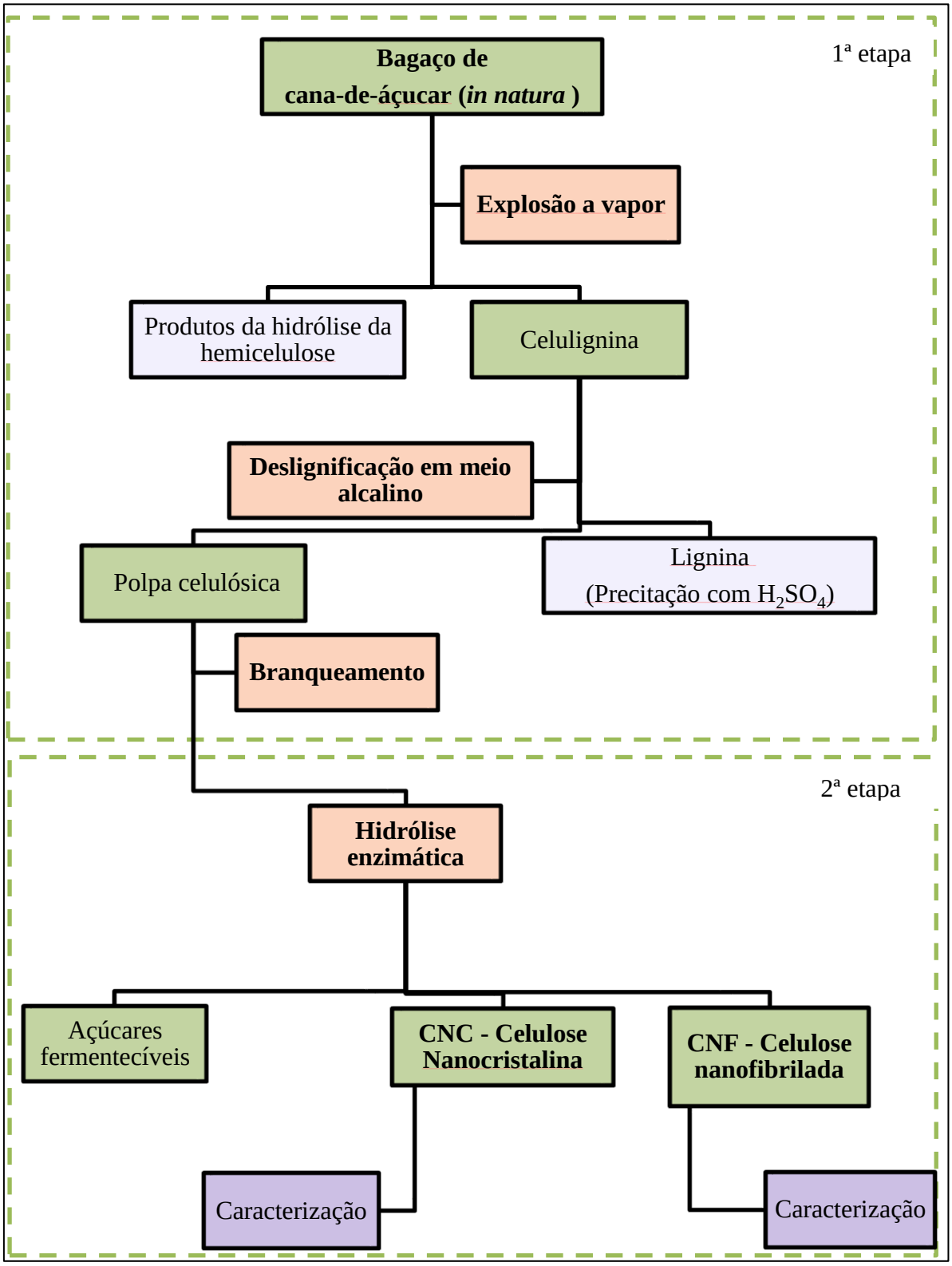
O bagaço de cana-de-açúcar utilizado para a realização do estudo foi fornecido pela Usina Vale - Estância Vale do Rio Turvo - Onda Verde Agro Comercial S.A (Onda verde-SP). A Polpa kraft branqueada de *Eucaliptus* sp fornecida pela Fibria Celulose S.A. (Jacareí-SP), foi utilizada como matéria-prima para comparação, apresentando composição química de 78,6 % de celulose, 14,6% de xilana e 2,7% (m/m) determinada de acordo com Sluiter et al., (2012).

O preparo enzimático utilizado foi Cellic CTec2 (VHN00003) fornecido Empresa Novozymes (Araucária, PR) com 200,0 (mg de proteína/g) determinada de acordo com Mok; Arantes, Saddler (2015) .

4.2 Métodos

A abordagem experimental adotada neste estudo foi dividida em duas etapas (Figura 8). A primeira etapa foi executada parte na planta piloto do Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE) com pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar por explosão a vapor e deslignificação do material pré-tratado, seguida pela geração de polpa celulósica parcialmente branqueada (PPB-B) no Laboratório de Biocatálise e Bioprodutos (BBioPRO) na EEL-USP. A segunda etapa foi realizar a determinação dos parâmetros de hidrólise enzimática da PPB-B, que tornaram viável tecnicamente, tanto a obtenção de açúcares fermentescíveis como um resíduo celulósico adequado para a produção de nanoceluloses, CNC e CNF, e caracterização das mesmas.

Figura 8- Fluxograma esquemático da abordagem experimental em duas etapas utilizada neste estudo



Fonte: Arquivo pessoal

4.2.1 Moagem e classificação granulométrica do bagaço de cana-de açúcar *in natura*

Para a execução do pré-tratamento por explosão a vapor, o bagaço cana-de açúcar (BC) foi coletado diretamente do processo de moagem de cana-de-açúcar na Usina Vale e transportado para a planta piloto do CTBE.

Na planta piloto, o BC foi moído em moinho de martelos, equipamento que permite a moagem do material sem que seja necessária uma secagem prévia, e classificado em peneira vibratória Multideck® (Multivibro, Brasil) para que somente partículas menores que 6 mm fossem submetidas ao processo de pré-tratamento.

4.2.2 Pré-tratamento por explosão a vapor

O BC moído, com cerca de 50% de umidade, foi alimentado por sistema contínuo de silo e rosca, na vazão de 10 kg/h, em um reator contínuo ADVANCEbio® em escala piloto, com tempo de residência de 15 min. Simultaneamente, vapor saturado foi injetado no reator a 15 bar com de vazão de 25-30 kg/h a 190 °C ± 1(ROCHA et al., 2012b). Após o tempo de residência no reator, o bagaço pré-tratado foi descarregado automaticamente, e o material foi coletado, suspendido a 8% (m/m) em água e centrifugado para a remoção da fração líquida. A fração líquida foi coletada e utilizada para detecção de xilose, arabinose e ácido acético e furfural e hidroximetilfural de acordo com os itens 4.2.7 e 4.2.8 e o BC pré-tratado foi submetido à deslignificação conforme o item 4.2.3.

4.2.3 Deslignificação em meio alcalino

Para a reação de deslignificação, o BC pré-tratado por explosão de vapor foi tratado em reator POPE Scientic em aço Hastelloy 276, com capacidade para 350 L, com solução de NaOH 1,0% (m/v) na razão de 1:10 sólido-líquido (m/v), sob agitação constante de 80 rpm a 100 °C ± 2, durante 1 h (ROCHA et al., 2012b).

Após a reação de deslignificação, o material foi filtrado em filtro Nutsche (POPE Scientic) com capacidade para 100L. A fração sólida (polpa) foi ressuspensa e lavada com água sob constante agitação, recolhida e armazenada a 4 °C. Ao final do processo as

amostras foram caracterizadas de acordo com a adaptação do método descrito por Sluiter et al., (2012).

4.2.4 Precipitação de lignina

O licor negro obtido no processo de deslignificação em meio alcalino foi acidificado até atingir o pH 2,0 para a precipitação da lignina, com aproximadamente 1,5 L de ácido sulfúrico a 98%(m/m) (ROCHA et al., 2012b). A lignina precipitada foi separada por filtração em filtro prensa e lavada com água até atingir um pH final de aproximadamente 6,0. Após a lavagem, foi retirado o excesso de água com ar comprimido e estocada a 4 °C.

4.2.5 Branqueamento com peróxido de hidrogênio em meio alcalino

Em reator Parr (modelo 4848 Reactor Controller) com capacidade para 8 L, 250 g (5% de sólidos em massa seca) de polpa celulósica obtida do processo de deslignificação alcalina foram tratados com H_2O_2 a 8% (m/m), NaOH 3% (m/m) e $MgSO_4$ 1,2% (m/m) a 80 °C ± 2 durante 2 h sob constante agitação de 150 rpm. $MgSO_4$ foi adicionado para evitar a decomposição do H_2O_2. Esta metodologia foi adaptada do estudo realizado por de Li et al., (2011). Ao final do processo o material branqueado foi lavado com água destilada (20 vezes a massa inicial) e caracterizada de acordo com a adaptação do método descrito por Sluiter et al., (2012).

4.2.6 Balanço de massas

Para a determinação do balanço de massas dos processos de explosão a vapor, deslignificação alcalina e branqueamento, foram consideradas as massas inicias (massa seca) de celulose, hemiceluloses, lignina e cinzas e as massas recuperadas de cada um desses componentes após cada processo.

Para a quantificação da celulose foram consideradas as concentrações glicose e a hemicelulose foi quantificada a partir das concentrações de xilose, arabinose e ácido acético assumindo, para cada um dos produtos.

4.2.7 Caracterização química

A composição do BC (*in natura*), pré-tratado por explosão a vapor (celulignina), deslignificado e a polpa celulósica parcialmente branqueada (PPB-B) foi determinada segundo adaptação do método descrito por Sluiter et al. (2012), sendo quantificados celulose, extrativos, cinzas, hemicelulose e lignina solúvel e insolúvel.

A lignina solúvel foi quantificada por espectrometria UV à 205 nm, considerando a constante de absortividade igual a 105 $L.g^{-1}.cm^{-1}$ (DENCE, 1992), com auxílio de espectrofotômetro Epoch 2 (Biotek®). Os monossacarídeos foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-Waters®), utilizando uma coluna HPX-87H (Bio-rad) a 45° C, eluída com ácido sulfúrico 0,005mol/L a uma taxa de 0,6mL/min. A concentração de açúcares foi determinada utilizando um detector de índice de refração (Waters®) a 35 °C, e as áreas dos cromatogramas convertidas em concentração utilizando curvas de calibração previamente construídas com soluções-padrão de glicose, xilose, arabinose e ácido acético.

4.2.8 Composição química da fração líquidas obtidas após o pré-tramento por explosão a vapor

Os produtos de degradação de carboidratos furfural e hidroximetilfurfural (HMF) foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em cromatógrafo Agilent Technology series 1200 (Agilent, EU), utilizando coluna Zorbax C18 Eclipse Plus, eluída com acetonitrila/água na proporção1:8 e ácido acético 1% a 0,8 mL/min. A concentração do furfural e HMF foram determinadas utilizando um detector de UV-vísivel (276 nm) a 25 ºC, e as áreas dos cromatogramas convertidas em concentração utilizando

curvas de calibração previamente construídas utilizando soluções padrão de furfural e HMF.

4.2.9 Determinação da concentração de proteínas

Para quantificação de proteínas totais no preparo Cellic CTec2, foi utilizado o método adaptado de ninidrina descrito por Mok, Arantes e Saddler (2015).

Foram mantidos 100 μL de amostra com 50 μL de NaBH4 (razão de 1:3 de NaBH4/total de açúcar) por 1 h. Em seguida, foram adicionados 300 μL de HCl 9 M e mantido a 105°C por 24 horas. Após a amostra ser resfriada a temperatura ambiente, uma alíquota de 100 μL foi transferida para um microtubo de centrífuga e neutralizada com 100 μL de NaOH 5 M. Em seguida foram adicionados 200 μL da solução de ninidrina 2% (m/v) (Sigma) e aqueceu-se a 100ºC por 10 minutos. Posteriormente, resfriou-se a amostra (temperatura ambiente) e adicionou-se 500 μL de etanol 50% (v/v). Logo após, 200 μL da mistura foi transferida para uma microplaca de 96 poços para a realização de análise por espectrofotometria a 560 nm em espectrofotômetro de microplacas Epoch 2 (Biotek®).

Os valores de absorbância obtidos foram convertidos em concentração de proteínas utilizando como padrão albumina sérica bovina (BSA-Sigma) para a construção de curva de calibração (concentração entre 0 a 800 μg/g).

4.2.10 Efeito da carga de enzima na eficiência de hidrólise hidrolise enzimática

Para avaliar o efeito da carga de enzima no tratamento enzimático, o BC pré-tratado por explosão a vapor (celulignina), deslignificado e parcialmente branqueado (PPB-B) foram hidrolisados em frasco erlenmeyer de 125 mL com volume reacional de 50 mL, com teor de sólidos de 10% (massa seca) em tampão acetato de sódio 50mM, pH 4,8, azida de sódio 0,01% (m/m), em diferentes cargas de Cellic CTec2 (5, 10 e 30 mg de proteína/g de substrato), com reação controle para cada substrato substituindo a quantidade de proteína utilizada por água destilada.

Os ensaios foram realizados em incubadora orbital (*shaker*) (Tecnal, TE 420) a 150 rpm e 50°C em duplicatas por 72 h de reação. Após o tempo de reação, as amostras foram retiradas e imediatamente aquecidas a 100 °C por 10 minutos, para inativar as enzimas e centrifugadas a 3.000 rpm (1.962 x g) por 15 minutos a 10 °C. Os sobrenadantes foram utilizados para quantificar a concentração dos açúcares liberados por cromatografia liquida como descrito no item 4.2.13.

4.2.11 Efeito da agitação e da carga de enzima na eficiência de hidrólise enzimática

Para avaliar o efeito da agitação combinada com carga de enzima, a celulignina e a PPB-B em frasco falcon de 50 mL com volume reacional de 30 mL, teor de sólidos de 10% (m/m) em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8, azida de sódio 0,01% (m/m), em diferentes cargas de Cellic CTec2 (5, 10 e 30 mg de proteína/g de substrato).

Os ensaios foram realizados em incubadoras de hibridação HB-3D (Techne®, Hybrigene) (hibridizador) a 20 rpm e 50°C em duplicatas por 72 h. Após o tempo de reação, as amostras foram retiradas e imediatamente aquecidas a 100 °C por 10 minutos, para inativar as enzimas e centrifugadas a 3.000 rpm (1.962 x g) por 15 minutos a 10 °C. Os sobrenadantes foram utilizados para quantificar a concentração dos açúcares liberados por cromatografia liquida como descrito no item (4.2.13).

4.2.12 Efeito da carga de sólidos combinada com a carga de enzimas na eficiência de hidrólise enzimática

Para avaliar o efeito da carga de sólidos no tratamento enzimático combinada com diferentes cargas de enzimas, a hidrólise da PPB-B foi conduzida em tubo falcon de 50 mL com volume reacional de 30 mL, os teores de sólidos avaliados foram de 10%, 15 %, 17,5% e 20% (m/m), em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8 e azida de sódio 0,01% (m/m). As cargas de sólidos foram combinadas com diferentes cargas do preparo enzimático Cellic CTec2 de acordo com a Tabela 6.

Tabela 6- Combinação de carga de sólidos com carga de proteínas na hidrólise da PPB-B.

Carga de Sólidos (m/m)	**Carga de proteína (mg proteína/g substrato)**
10%	5,0 e 10,0
15%	7,5 e 10,0
17,5%	10,0 e 12,5
20%	12,5 e 15,0

Fonte: Arquivo pessoal

Os ensaios foram realizados em incubadoras de hibridação HB-3D (Techne®, Hybrigene) (hibridizador) a 20 rpm e 50°C em duplicatas por 72 h. Após o tempo de reação as amostras foram retiradas, imediatamente aquecidas a 100°C por 10 minutos, para inativar as enzimas, e centrifugadas a 3.000 rpm (1.962 x g) por 15 minutos a 10 °C. Os sobrenadantes foram utilizados para quantificar a concentração dos açúcares liberados, através de cromatografia líquida como descrito no item (4.2.13).

4.2.13 Quantificação dos produtos de hidrólise e conversão em monossacarídeos

A fração solúvel obtida após a hidrólise com cada tratamento foi analisada quanto ao conteúdo de monossacarídeos e celobiose por CLAE como descrito no item 4.2.7. A conversão de glicose e xilose foram obtidas através da equação 1 e 2:

$$\%C = \frac{C_{gli} \times 0{,}9 \times v}{m \times C_{\%}} \times 100 \qquad (1)$$

Onde, %C é a conversão de celulose, C_{gli} concentração de glicose (g/L), m a massa inicial de substrato, $C_{\%}$ percentagem de celulose no substrato e v volume reacional.

$$\%X = \frac{X_{xil} \times 0{,}88 \times v}{m \times X_{\%}} \times 100 \qquad (2)$$

Onde, %X é a conversão de celulose, X_{xil} concentração de xilose (g/L), m a massa inicial de substrato, $X_{\%}$ percentagem de xilana no substrato, 0,88 fator de conversão de xilose em xilana e v volume reacional.

4.2.14 Produção de celulose nanocelulose

Após determinar dos parâmetros de hidrólise para obtenção dos açúcares fermentescíveis a partir da PPB-B, os mesmos parâmetros de hidrólise foram aplicados para a PKB-E para fins de comparação das concentrações de açúcares e os resíduos após a hidrólise. Os ensaios foram realizados em incubadoras de hibridação HB-3D (Techne®) (hibridizador) com carga de sólidos de 17,5% de sólidos (m/m) e 12,5 (mg de proteína/g de substrato) em um total de reação de 500,0 g, a 20 rpm e 50°C em duplicatas por 72 h.

Para o hidrolisado obtido a partir da PKB-E a separação do sólido residual da fração líquida contendo açúcares, foi realizada tanto por filtração a vácuo em funil de Buckner, utilizando papel de filtro Whatman® nº 1, como por centrifugação a 4.500 g por 10 minutos a 4 ºC, em frasco de 1000 mL utilizando 200 g do hidrolisado. O líquido obtido foi separado e os açúcares quantificados conforme o item (4.2.12) e para completa remoção dos açúcares o sólido residual foi ressuspendido e separado por duas vezes com 400 mL de água destilada.

Procedimento semelhante foi adotado para a separação do sólido residual obtido a partir da PPB-B, alterando a quantidade de hidrolisado para 150 g e o volume de água para 300 mL. Os resíduos obtidos foram separados e utilizados no isolamento da CNC (item 4.2.13.1) e refino em nanorefinador de disco SuperMassColloider (Mazuko MKCA6-5J) (item 4.2.13.1).

4.2.14.1 Produção de celulose nanocristalina (CNC)

Para o isolamento de nanocristais de celulose, o sólido residual livre de açucares foi ressuspendido em 400 mL água destilada para o resíduo obtido a partir da PKB-E e 300 mL para o resíduo obtido a partir da PPB-B. Em seguida, cada suspensão foi centrifugada a

300 G por 10 min a 4 ºC e o sobrenadante contendo a CNC foi coletado e o tamanho das partículas foi determinada segundo o item (4.2.14.1). O procedimento foi realizado até que fosse obtida uma suspenção com baixa turbidez, o que resultou em seis vezes para o resíduo obtido a partir da PKB-E e cinco vezes para o resíduo obtido a partir da PPB-B.

4.2.14.2 Produção de celulose nanofibrilada

Para a obtenção da celulose nanofibrilada, o resíduo obtido do isolamento da CNC foi processado mecânicamente em ultra-refinador de discos SuperMassColloider (Masuko MKCA6-5J) com discos cerâmicos (MKGA10-80)

Os discos posicionados um sobre outro, foram ajustados de modo que não houvesse contato durante o processamento (WANG et al., 2012a). Deste modo, enquanto o disco inferior gira a 1600 rpm a posição zero de movimento foi determinada a partir do ruído ocasionado pelo toque entre os discos, iniciando a alimentação manual do equipamento com 1,0 L de uma suspensão de 1% de sólidos (m/m) e ajustando simultaneamente a posição dos discos para -100 µm. Durante o processamento, foram monitorados o tempo e consumo de energia (kWh) do SuperMassColloider através de medidor de energia (ForLong DRT-341D). Foi considerado como um ciclo a passagem de todo o volume utilizado na alimentação.

A sílica presente na PPB-B foi retirada por decantação antes da obtenção da CNF-B, a fim de evitar danos aos discos cerâmicos no equipamento de ultra-refiano, para isso a suspensão do resíduo do isolamento da CNC-B, contida em um béquer de 2L, foi agitada com bastão de vidro e deixada em repouso por 5 minutos para a decantação da sílica, em seguida o sobrenadante foi transferido cuidadosamente para outro béquer de mesmo volume, para evitar a ressuspensão da sílica repetindo o processo por 5 vezes. Ao final da etapa de remoção da sílica, a concentração do resíduo foi ajustada para 1% (m/m) e a suspensão processada para a obtenção da CNF.

4.2.15 Caracterização das partículas de nanocelulose

4.2.15.1 Tamanho das partículas

A celulose nanocristalina e celulose nanofibrilada obtidas foram analisadas quantitativamente quanto ao tamanho médio (D_{x10}, D_{x50}, D_{x90}) e distribuição das partículas utilizando o analisador de tamanho de partículas por difração a lazer Mastersizer 3000 (Malvern Instruments, Reino Unido) com faixa de detecção de 10 nm a 3,5 mm. D_{x50} representa a média de tamanho das partículas, medido através do diâmetro hidrodinâmico da partícula transformado em um tamanho equivalente, D_{x10} e D_{x90} representam os 10% e 90% das partículas que são menores que os tamanhos apresentados. A dispersão das partículas é realizada através do Hydro MV (unidade de dispersão), que evita a sedimentação, a agregação da partícula e promove circulação da amostra. O equipamento também possui um sistema de monitoramento ótico, Hydro Sight com resolução em torno de 300 µm.

Foram realizadas 4 leituras utilizando o índice de refração de 1,4683 da celulose, sob agitação de 3.500 rpm e obscuração entre 0,5 e 4%. Os resultados foram reportados na forma de densidade numérica (%). Ao final das 4 leituras a unidade de dispersão foi lavada automaticamente por três vezes utilizando água deionizada.

4.2.15.2 Índice de cristalinidade e tamanho de cristal

Para o monitoramento do índice de cristalinidade foi utilizado o difratômetro de raio-X Shimadzu 6000 XRD, com radiação CuKα e monocramador grafite. As amostras secas por liofilizacão (Edwards Super Modulyo Freeze Dryer) foram colocadas em suporte de vidro e os parâmetros de medição foram $10 < 2\theta < 40$; 2θ com passos de 0,02º, 30 s por passo. Os picos XRD foram separados por deconvolução, através uma função Gaussiana no *software* Origin (versão 2017, OriginLab). O índice de cristalinidade (ICr) foi determinado de acordo com Segal et al. (1959), usando o método da deconvolução da altura dos picos, que utiliza dos dados XRD ajustados para calcular ICr de acordo com a equação 3, onde I_{002} é a altura máxima em torno de $2\theta = 22{,}5º$ e I_{am} é a altura mínima em torno de $2\theta = 18º$.

$$ICr = \frac{I_{002} - I_{am}}{I_{002}} \times 100 \quad (3)$$

Os difratogramas de raios-X também foram usados para calcular a dimensão lateral do cristalito de celulose em relação ao plano (200) (L_{200}) (nm), de acordo com a equação de Scherrer (equação 4), onde K é o fator de correção (0,91), λ é o comprimento de onda de radiação (para CuKα, λ = 1.54060 Å), θ é o ângulo de difração (em torno de 11,25º para o plano (200)) e $\beta_{1/2}$ é a largura do pico na metade da altura máxima (em radianos).

$$L_{200} = \frac{K \times \lambda}{\beta_{1/2} \times cos\theta} \quad (4)$$

4.2.15.3 Microscopia de força atômica (AFM- *Atomic Force Microscopy*)

As topografias das amostras de nanoceluloses foram analisadas em uma suspenção com teor de sólidos de aproximadamente 0,01% (m/m), dispersas em banho de ultrassom por 5 min, em seguida 100 µL foram colocados na superfície da mica recém clivada. As análises foram realizadas no Laboratório de polímeros (LabPol) do Departamento de Engenharia Química da EEL, utilizando o equipamento Park Systems XE7 (Corea do Sul) com *cantilever* (CONTSCR 10M), frequência de 1,0 Hz, operado em sistema de contato intermitente. As topografias geradas foram tratadas e os diâmetros mensurados utilizando o *software* Gwyddion (64 bit).

4.2.15.4 Potencial zeta

As análises de potencial zeta foram realizadas no Laboratório de polímeros (LabPol) do Departamento de Engenharia Química da EEL.

As amostras foram analisadas em uma suspenção com teor de sólidos de aproximadamente 0,01% (m/m), dispersas em banho de ultrassom por 5 min. O potencial zeta das partículas em suspensão foi analisado por um instrumento Zetasizer Nano ZS

(Malvern Instruments, Reino Unido) com base na dispersão dinâmica da luz, a 25 ºC utilizando como dispersante agua com índice de refração de 1,33 constante dielétrica de 78,5 e viscosidade de 0,8872 cP. Para cada amostra, as medidas foram realizadas por no mínimo 12 corridas e os valores médios foram relatados reportados em mV.

4.2.15.5 Rendimento de CNC

A determinação do rendimento de CNC foi realizada em triplicata por análise gravimétrica. Alíquotas de 10,0 mL de amostras de suspensão de CNC foram colocadas em cadinho de porcelana (seco por 4 h a 105 ºC) previamente aferido. Em seguida, os cadinhos com amostra foram colocados em estufa a 105 ºC por aproximadamente 12 h. Após o resfriamento e aferição do cadinho com amostra, o rendimento foi determinado segundo a equação (5).

$$\%R = \frac{m_f - m_i}{v_a} \times v_t \times 100 \qquad (5)$$

Onde, m_f massa final do cadinho com amostra, m_i massa inicial do cadinho, v_a volume da amostra (mL) e v_t volume total recuperado de suspenção de CNC.

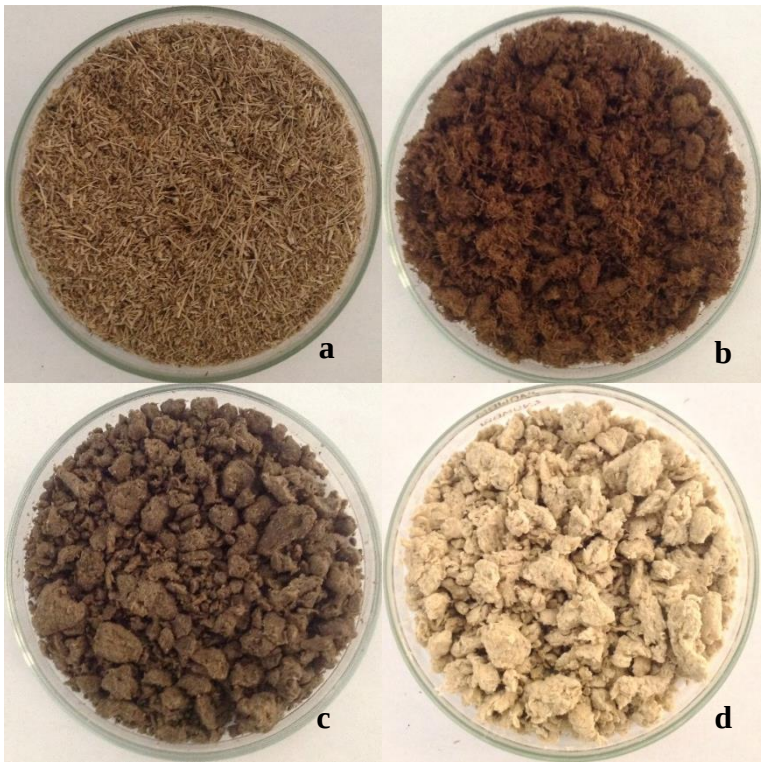
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste estudo, o objetivo foi avaliar a viabilidade da integração da produção de nanoceluloses ao processo de produção de etanol celulósico a partir do bagaço de cana-de-açúcar. Assim, a configuração do processo de produção de etanol 2G adotado para este estudo foi a descrita em Rocha et al., (2012b), pois apresenta condições otimizadas para a produção de etanol 2G a partir de bagaço de cana-de-açúcar. Além disso, as condições tiveram sua viabilidade técnica e econômica avaliadas pelo estudo realizado por Dias et. al., (2012). Para evidenciar a eficiência do preparo enzimático utilizado no presente estudo, o trabalho de Oliveira et al., (2013) foi utilizado para comparação.

5.1 Composição química

De acordo com o pré-tratamento aplicado, ácido ou alcalino, observou-se o decrescimento do conteúdo de componentes da biomassa, bem como a mudança da aparência do material de partida (Figura 9).

Figura 9- Processamento do bagaço (a) bagaço in natura; (b) celulignina; (c) polpa celulósica; (d) PPB-B



Fonte: Arquivo pessoal

A Tabela 7 exibe os resultados da composição química do bagaço de cana-de-açúcar (*in natura*), pré-tratado por explosão a vapor (celulignina), seguido de uma deslignificação com NaOH (polpa celulósica) e polpa parcialmente branqueada de bagaço de cana-de-açúcar (PPB-B) com peróxido de hidrogênio em meio alcalino (H_2O_2/NaOH).

Tabela 7- Composição química do bagaço de cana-de-açúcar in natura e processado.

	Composição química %(m/m)			
	Bagaço *in natura*	**Celulignina**	**Polpa celulósica**	**PPB-B**
Glucana	36,7 ±0,3	52,7 ±0,3	76,1 ±0,6	79,1 ± 1,4
Xilana	20,5 ±0,1	4,7 ±0,0	2,5 ±0,1	2,4 ±0,0
Lignina	24,4±0,0	20,9 ±0,1	15,9 ±0,0	9,9 ±0,5
Arabinosil	1,1 ± 0,0	nd	nd	nd
Grupos acetila	4,6 ±0,0	nd	nd	nd
Extrativos	4,8 ±0,0	17,2 ±0,2	na	na
Cinzas	6,4 ±0,3	8,8±0,3	13,4 ±1,3	13,4 ±1,0
Total	**98,5 ± 0,2**	**104,3 ±0,2**	**107,9 ±0,7**	**104,9 ±2,6**

nd- não detectado na- não analisado

Fonte: Arquivo pessoal

Ainda que a composição química do bagaço sofra variações, os valores do bagaço *in natura* detectados neste estudo estão próximos aos encontrados na literatura em trabalhos como (ROCHA et al., 2012a; DIEDERICKS; VAN RENSBURG; GÖRGENS, 2013; OLIVEIRA et al., 2013; SAELEE et al., 2016). Por outo lado, estudos com pré-tratamento por explosão a vapor nas mesmas condições de reação (OLIVEIRA et al., 2013; ROCHA et al., 2014), não reportaram valores para extrativos, além disso, utilizam protocolos de quantificação de composição química diferentes dos utilizados para este estudo. Assim, o percentual de 17,2 ±0,2 %(m/m) de extrativos da celulignina pode ser explicado pela não remoção, por lavagem, dos resíduos gerados durante o pré-tratamento. Além disso, o processo de extração permite que seja quantificada a lignina que está efetivamente ligada aos polissacarídeos.

O resultado esperado após o pré-tratamento era um aumento do percentual de lignina na celulignina, no entanto, observou-se a diminuição desse percentual. Este resultado pode ser explicado pelo processo de extração durante a análise composicional do material, visto que os compostos gerados pela clivagem de ligações da lignina, que

ocorrem pelas reações de despolimerização e repolimerização durante o pré-tratamento (LI; HENRIKSSON; GELLERSTEDT, 2007), foram removidos e quantificados como extrativos.

Mesmo que o pré-tratamento por explosão a vapor tenha sido realizado nas mesmas condições reacionais do estudo de referência, ressalta-se que, além da diferença da composição inicial do bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, o reator utilizado no estudo de referência foi um reator do tipo batelada e no presente estudo foi utilizado um reator em sistema contínuo, sendo esse um fator que pode contribuir para as diferenças na composição da biomassa pré-tratada e comparadas através da tabela 8.

Tabela 8- Comparação entre a composição química do bagaço tratado com a material referência na literatura.

Composição química % (m/m)						
				Rocha et al., (2012b)*		
Componente	**Bagaço *in natura***	**Celulignin a**	**Polpa celulósica**	**Bagaço *in natura***	**Celulignina**	**Polpa celulósica**
Glucana	36,7 ±0,3	52,7 ±0,3	76,1 ±0,6	42,3 ±0,5	57,5 ±0,3	89,6 ±0,9
Pentosanas	21,6 ±0,1	4,7 ±0,0	2,5 ±0,1	25,1 ±0,3	6,6 ±0,0	3,4 ±0,1
Lignina	24,4 ±0,0	20,9 ±0,1	15,9 ±0,0	24,7 ±0,1	32,5 ±0,2	5,4 ±0,0
Grupo acetil	4,6 ±0,0	nd	nd	3,7 ±0,0	0,0 ±0,0	0,0±0,0
Extrativos	4,8 ±0,0	17,2 ±0,2	na	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	0,0 ±0.0
Cinzas	6,4 ±0,3	8,8 ±0,3	13,4 ±1,3	3,5±0,0	2,8±0,0	1,6 ±0,3
Total	**98,5 ± 0,2**	**104,3 ±0,2**	**107,9 ±0,7**	**100,0 ±0,1**	**99,4 ±0,0**	**100,0 ±0,0**

nd- não detectado na- não analisado

Fonte: Arquivo pessoal e (*) Rocha et al., (2012b)

Em comparação com o estudo referência, foi observado um aumento no teor de glucana e um decréscimo do conteúdo de hemicelulose e lignina com a sequência de tratamentos aplicados ao bagaço. Para a polpa parcialmente branqueada, o conteúdo de lignina apresentado na Tabela 7, é maior que a polpa celulósica do estudo realizado por (ROCHA et al., 2012a, 2012b). A severidade do pré-tratamento que antecede o processo de deslignificação é um dos fatores que interferem na remoção da lignina, assim, os processos com média severidade favorecem a recuperação dos açúcares da hemicelulose a com menor geração de produtos de degradação e a remoção da lignina em processos de deslignificação (KUMAR; CHANDRA; SADDLER, 2011).

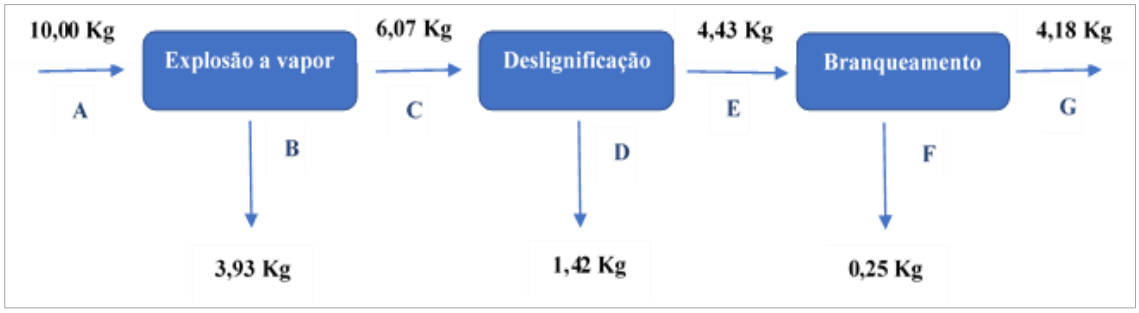
O processo de branqueamento da polpa celulósica em uma única etapa reduziu o percentual de lignina residual. Embora seja comumente aplicado em várias etapas na

indústria de papel e celulose, o branqueamento reduziu o percentual de lignina da polpa celulósica para 9,9% ± 0,5. Este procedimento já foi aplicado em outros estudos como método de purificação da celulose com o objetivo de obter nanoceluloses a partir de bagaço de cana-de-açúcar. No entanto nos estudos de (TEIXEIRA et al., 2011; CAMARGO et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2016; LEÃO et al., 2017), as cargas de reagentes químicos utilizadas foram mais altas do que as utilizadas neste estudo. Além disso, no presente estudo foi utilizado um agente estabilizante para minimizar a decomposição do peróxido de hidrogênio.

5.2 Balanço de massas

Para avaliar e comparar a viabilidade de um processo de pré-tratamento, o balanço de massas é uma ferramenta fundamental (GARLOCK et al., 2011), pois é capaz de indicar parâmetros críticos, mostrar os critérios mínimos de desempenho e auxiliar na análise composicional de um processo, fornecendo um inventário dos principais componentes. Em processos de pré-tratamento e na produção de etanol celulósico o balanço de massas fornece informações sobre o rendimento e recuperação de açúcares, permitindo uma comparação dos diferentes tratamentos aplicados a biomassa (HATZIS; RILEY; PHILIPPIDIS, 1996). A Figura 10 mostra as entradas e saídas de biomassas durante o processo para a obtenção da PPB-B, os fluxos A, C e E indicam entrada de material nos processos de pré-tramento, em quanto que os fluxos B, D, F e G indicam saída de hidrolisado de hemicelulose e produtos de degradação, remoção e precipitação da lignina, remoção de parte da lignina residual e a PPB-B, respectivamente.

Figura 10- Balanço de massas total da geração da PPB-B



Fonte: Arquivo pessoal

Após o pré-tratamento de explosão a vapor, 60,7% da massa inicial de bagaço foi recuperada sob a forma de celulignina, mostrando perdas de material majoritariamente devido a extração significativa do conteúdo de hemicelulose (≈86%). Embora, o hidrolisado obtido no pré-tratamento por explosão a vapor não tenha sido coletado durante o pré-tramento, a saída de massas no fluxo B foi determinada baseando-se na massa recuperada de celulignina (fluxo C) e massa de bagaço de cana-de-açúcar *in natura* contida no fluxo de entrada A.

Tabela 9- Balanço de massas total da geração da PPB-B

Balanço de massas em 10,00 Kg de bagaço de cana-de-açúcar *in natura*				
	Bagaço *in natura*	**Celulignina**	**Polpa celulósica**	**PPB-B**
Glucana	3,67 ± 0,02	3,20 ± 0,01	3,37 ± 0,00	3,31 ± 0,05
Xilana	2,05 ± 0,01	0,29 ± 0,00	0,11 ± 0,00	0,10 ± 0,00
Lignina	2,44 ± 0,00	1,27 ± 0,00	0,70 ± 0,00	0,41 ± 0,00
Arabinosil	0,11 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Grupo acetila	0,46 ± 0,00	0,00± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Extrativos	0,48 ± 0,00	1,04 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Cinzas	0,64 ± 0,00	0,53 ± 0,00	0,59 ± 0,00	0,56 ± 0,01

Fonte: Arquivo pessoal

No processo de deslignificação alcalina da celulignina, a lignina solubilizada e precipitada com H_2SO_4 98%(m/m) resultou em 1,42 kg de lignina, indicando que houve perdas de material durante o processo. Nesta etapa, 73% da massa inicial de celulignina foi recuperada sob a forma de polpa celulósica. Por fim, o rendimento obtido na obtenção da PPB-B foi de 41,8 % com recuperação de 91,2% da celulose e remoção de 95,1 % e 83,2 % de xilana e lignina, respectivamente.

Os resultados mostrados na Tabela 9 se mostram consistentes com os reportados na literatura (ROCHA et al., 2012b), sendo observadas diferenças que podem ser atribuídas à variações de condições reacionais durante os processos aplicados.

O descarte do líquido gerado pelo processo de explosão a vapor do bagaço de cana-de-açúcar inviabiliza o fechamento do balanço de massas na fração líquida, não permitindo a quantificação das reais perdas de material durante este processo. Entretanto, no líquido obtido a partir da lavagem da celulignina (1124,90 L) foram quantificados, ácido acético 0,15 g/L ± 0,00, arabinose 0,04 g/L ± 0,0 glicose 0,12 g/L ± 0,02 e xilose 0,93 g/L ± 0,01, também foram quantificados os produtos de degradação da glicose e xilose como 0,07 g/L ± 0,0 de HMF e como 0,23 g/L ± 0,0 furfural, respectivamente.

5.3 Avalição do efeito da carga de enzima na eficiência de hidrólise

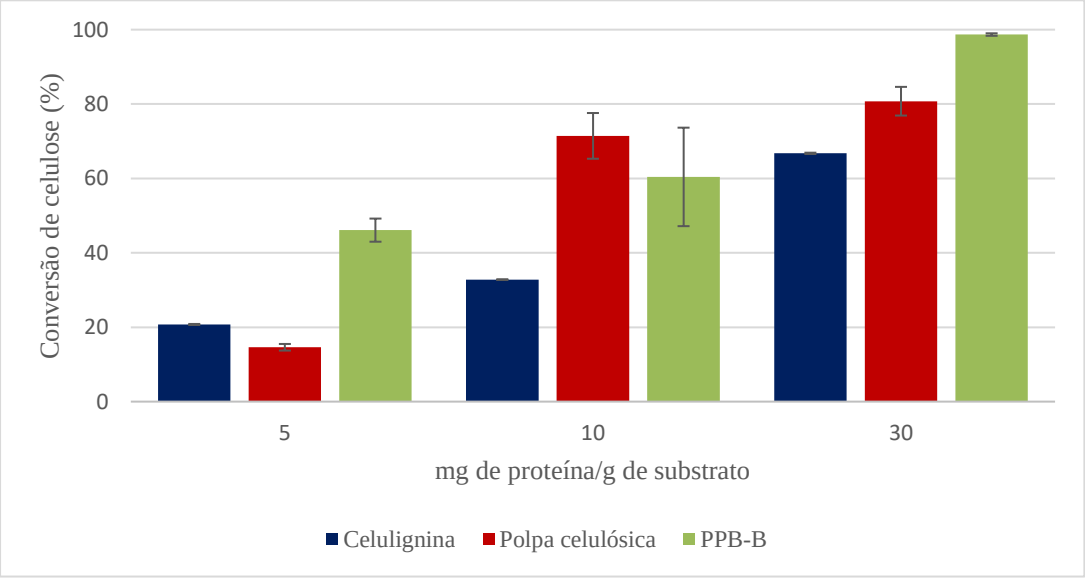
A hidrólise enzimática foi realizada para identificar os parâmetros de hidrólise que possibilitem a obtenção de açúcares fermentescíveis e para avaliar eficiência da hidrólise enzimática em função da carga de enzimas. Para isso, foi utilizado o preparo enzimático Cellic CTec 2 com 200,0 (mg de proteína/mL) (item 4.2.3).

O porcentual de conversão de celulose foi determinado a partir da glicose liberada durante a hidrólise, já que testes preliminares indicaram que em uma etapa de pós-hidrolise enzimática, não houve a liberação de celobiose e/ou celu-oligossacarídeos, indicando a eficiência do preparo enzimático na conversão de celulose em glicose.

Na Figura 11 são apresentados os resultados de conversão da celulose após o período de 72 h, utilizando como substrato celulignina, polpa celulósica e polpa branqueada de bagaço de cana-de-açúcar.

Como esperado, observou-se que a elevação da carga enzimática aumentou o nível de conversão da celulose para todos os substratos, chegando a atingir 98,7% ± 0,3 de conversão da polpa parcialmente branqueada. Quando comparamos a polpa celulósica com a celulignina hidrolisada nas mesmas condições, a remoção de 23,9% de lignina foi capaz de elevar a conversão da celulose para todas as cargas de enzimas.

Figura 11- Percentual de conversão de celulose em função da carga de enzimas em diferentes substratos



Fonte: Arquivo pessoal

Os resultados apresentados na Figura 14 estão de acordo com os resultados reportados por Camargo et al. (2016), confirmando que o aumento da carga enzimática eleva o nível de conversão da celulose, sendo favorecida pelo processamento do bagaço de cana-de-açúcar, que eleva a digestibilidade do material em decorrência da diminuição do conteúdo de hemicelulose e lignina.

Com aproximadamente 21% de lignina, a celulignina atingiu 20,7 e 66,7% de conversão com 10 e 30 (mg de proteína/g de substrato), respectivamente. O comportamento pode ser explicado por estudos que comprovam que a acessibilidade é um dos fatores limitantes da conversão da celulose (ARANTES; SADDLER, 2011; KUMAR et al., 2012). Deste modo, a lignina e a hemicelulose presentes no substrato são capazes de restringir o acesso das enzimas à celulose, juntamente com interação improdutivas entre lignina e as celulases (ARANTES; SADDLER, 2011; KUMAR et al., 2012; MORALES et al., 2014) diminuindo a conversão da celulose.

Sabe-se que diversos fatores contribuem para a diminuição da taxa de hidrólise da celulose, entre os quais, a difusão das enzimas e agitação do sistema (MODENBACH; NOKES, 2013; KOPPRAM et al., 2014). Na hidrólise da PPB-B, a característica hidrofílica da celulose e a baixa eficiência do sistema de agitação, possivelmente dificultaram a difusão das enzimas na conversão da celulose, com isso, foi possível observar que a conversão de celulose na PPB-B foi menor que na polpa celulósica (Figura 14), apesar dos menores teores de lignina e hemicelulose.

O estudo realizado por Oliveira et al. (2013) utilizou uma combinação dos preparos enzimáticos Celluclast 1.5L e Novozym188 para hidrolisar polpa celulósica de bagaço de cana-de-açúcar, produzida nas mesmas condições da polpa celulósica do presente estudo. Para possibilitar uma comparação com o trabalho de Oliveira et al. (2013), os dados de atividades enzimáticas foram convertidos em mg de proteína por mL, considerando os teores de proteínas totais e atividades enzimáticas determinados por Hu, Arantes e Saddler (2011) (Tabela 10).

Dessa forma, estima-se que os 15 (FPU/g de celulose) de Celluclast 1.5L e 10 U/g de celulose de Novozym 188 utilizados por Oliveira et al. (2013) correspondem a aproximadamente a 39,5 (mg de proteína/g substrato). Com esta dosagem enzimática Oliveira et al., (2013) obtiveram níveis de conversão de 69,7±2 e 73,0±1 % para a celulignina e polpa celulósica, respectivamente.

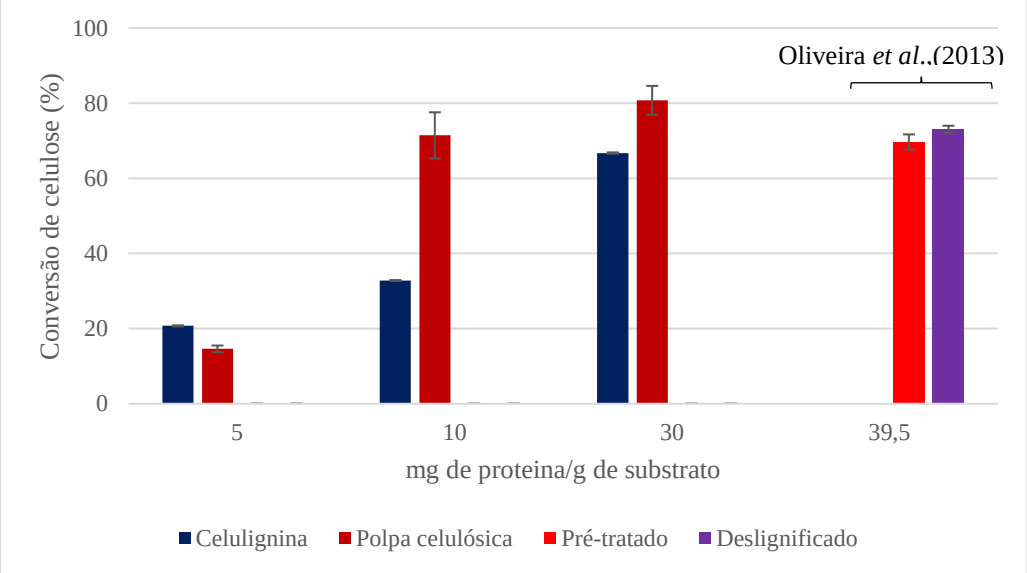
Tabela 10- Dosagem de proteínas totais e atividade enzimática de Celluclast 1.5L e Novozym 188 de acordo com Hu; Arantes e Saddler (2011).

Preparo enzimático	Proteína (mg/mL)	FPA (FPU/mL)	β-glicosidase
Celluclast 1.5L	129,8	50,3	17,0
Novozym188	233,4	Nd	239,0

nd- não determinado
Fonte: Adaptado de Hu, Arantes e Saddler (2011)

Embora, níveis de conversão próximos aos de Oliveira et al., (2013) para celulignina só tenham sido atingidos com a maior carga enzimática empregada para o presente estudo (30 mg/g de substrato), a carga de enzima foi 31,7% menor que a empregada por Oliveira et al. (2013), sendo capaz de converter 66,7 % ± 0,2 da celulose (Figura 12). No entanto, para a polpa celulósica foi obtida uma conversão de 71,4% ± 6,1, utilizando uma carga de apenas 25,3% da carga utilizada por Oliveira et al. (2013). Com esses resultados pode-se constatar que, mesmo quando utilizados em baixas cargas de enzimas, o uso de um preparo enzimático mais eficiente, como Cellic CTec2, pode elevar os níveis de conversão da celulose em substratos pré-tratados nas mesmas condições.

Figura 12- Comparação de resultados de conversão de substratos obtidos sob mesmas condições de pré-tramento hidrolisados com diferentes coquetéis enzimáticos

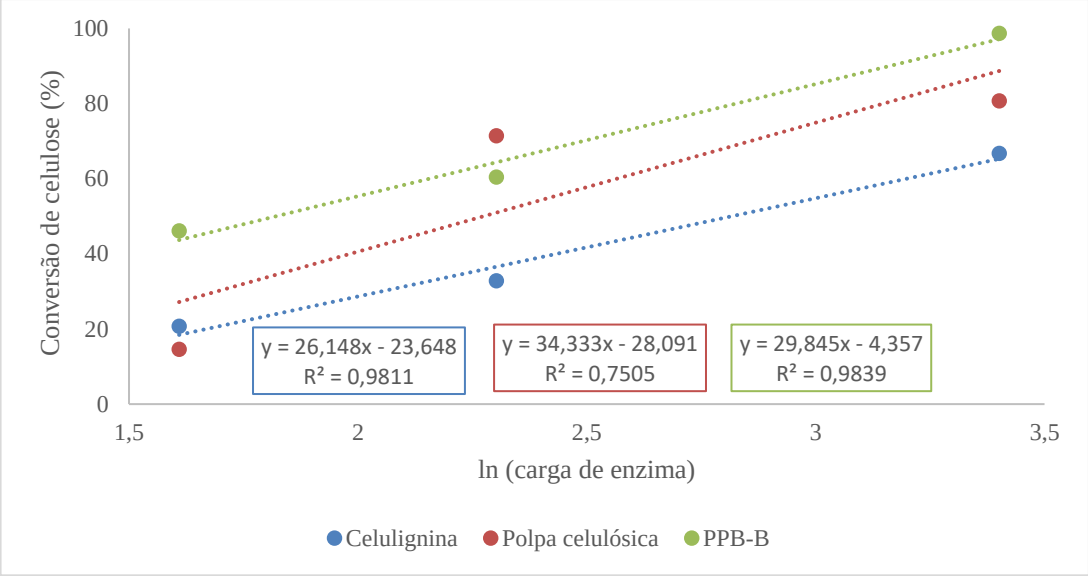


Fonte: Arquivo pessoal

Com os resultados de conversão obtidos pela hidrólise da celulose para os diferentes substratos (celulignina, polpa celulósica e polpa parcialmente branqueada), foi possível correlacionar linearmente a carga de enzima utilizada com a conversão da celulose

nos diferentes materiais testados (Figura13). Os modelos obtidos possibilitam predizer a conversão da celulose em açúcares fermentescíveis, permitindo uma avaliação da eficiência dos pré-tratamentos aplicados a biomassa e a carga enzimática utilizada durante a hidrólise da celulose. Desse modo, com a mesma carga de enzima, observa-se a mudança na digestibilidade causada pelos processos de deslignificação.

Figura 13- Correlação linear entre a carga enzimática e a conversão da celulose de celulignina, polpa celulósica e PPB-B com residual de lignina de 20,9 %,15,9 % e 9,9 % (m/m), respectivamente.



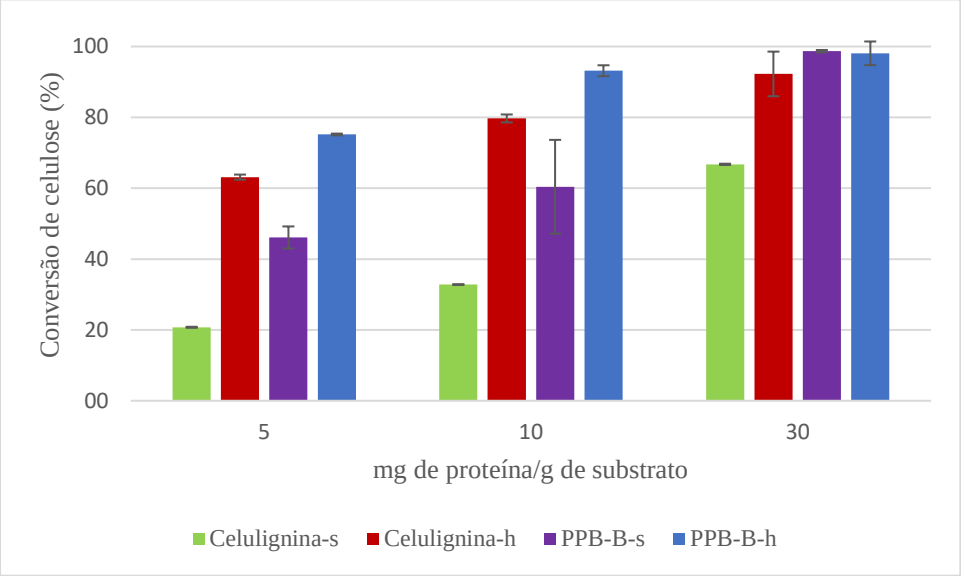
Fonte: Arquivo pessoal

De acordo com Zhu et al. (2010) quanto maior a inclinação das curvas obtidas pelo método de linearização, mais eficiente é o pré-tratamento. Desse modo, pode-se determinar a carga enzimática necessária e prever o nível de conversão da celulose para obtenção os açúcares fermentescíveis, gerando um resíduo celulósico altamente cristalino.

5.4 Efeito da agitação na conversão da celulose

A agitação é um dos desafios para a conversão de enzimática em alta carga de sólidos, com isso a mudança na agitação (orientação do reator, tipos de agitador) é um fator que contribui para a conversão da celulose com um menor consumo de energia (MODENBACH; NOKES, 2013; DU et al., 2014b).

Figura 14- Influência da agitação na conversão de celulose a 10% sólido, Celulignina-s (agitação em shaker), Celulignina-h (agitação em hibridizador), PPB-B-s (agitação em shaker) e PPB-B-h (agitação em hibridizador).



Fonte: Arquivo pessoal

Ao compararmos a conversão da Celulignina e a PPB-B sob duas formas diferentes de agitação (Figura 14), nota-se que, a alteração na forma de agitação é capaz de aumentar a conversão da celulose para diferentes substratos. Quando a hidrólise enzimática foi conduzida em incubadora de hibridação utilizando cargas de enzimas de 5, 10, e 30 (mg de proteína/g de substrato), o aumento da conversão da celulose na celulignina foi de 70,6 %, 58,8% e 27,7%, respectivamente.

Entretanto, efeito benéfico da agitação em incubadora de hibridação foi menos acentuado na PPB-B. Utilizando-se as mesmas combinações de carga de sólido e cargas enzimáticas a elevação da conversão da celulose foi de 38,6%, 35,2%, nas menores cargas enzimáticas, não sendo observada alteração significativa na conversão da celulose com a carga de enzimas de 30 (mg de proteína/g de substrato), o que deve ser atribuído às características do substrato e à alta carga de enzimas. Assim sendo, o sistema de agitação por incubadora de hibridação foi escolhido para as etapas seguintes de hidrólise.

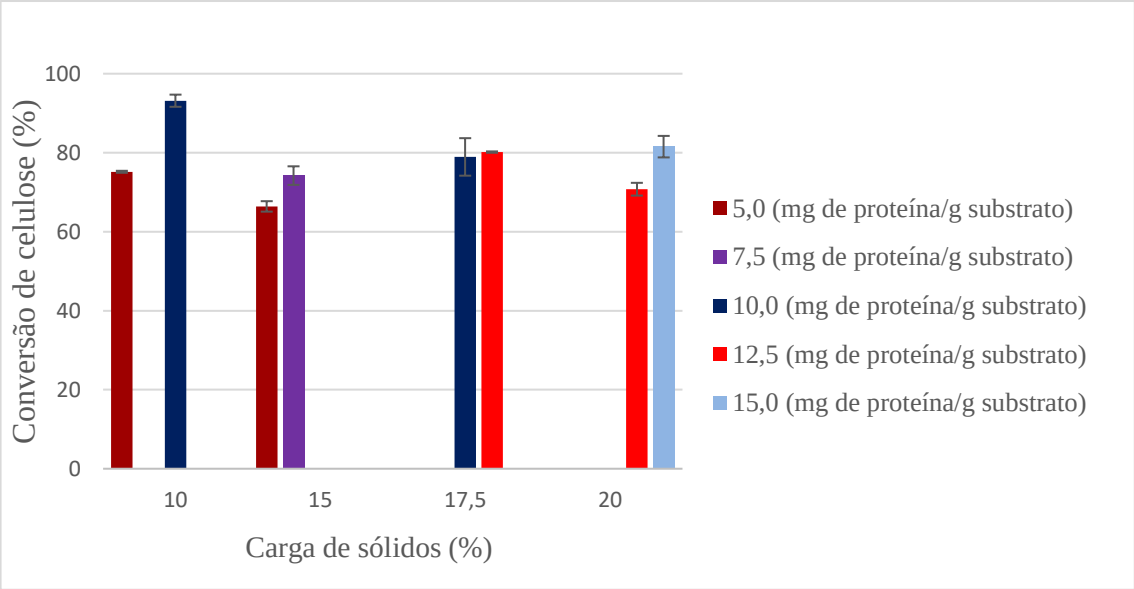
5.5 Influência da carga de sólidos na conversão da celulose e geração de glicose

Com base nos estudos iniciais de hidrólise enzimática, o sistema de agitação através de incubadora de hibridação e o substrato PPB-B foram selecionados para a continuação

dos ensaios, devido a melhor eficiência agitação e na composição química do substrato com menor conteúdo de lignina e maior teor de celulose, respectivamente.

Embora, o efeito a carga de sólidos não tenha sido avaliado simultaneamente para todas as cargas de enzimáticas, a Figura 15 mostra a tendência de diminuição da conversão da celulose com o aumento da carga de sólidos e o efeito do aumento da carga enzimática.

Figura 15- Conversão de celulose da PPB-B em diferentes cargas de sólidos em função da carga de enzimas.



Fonte: Arquivo pessoal

Com valores de conversão da celulose variando entre 65 e 93% e cargas de enzimáticas entre 5 e 15 (mg de proteína/g de substrato), a escolha da carga enzimática combinada com a carga de sólidos foi baseada na recuperação de açúcares e tempo de reação. Comparando a conversão de celulose para diferentes cargas de sólidos e mesma carga de enzimas, observa-se o decréscimo da conversão de 11,1 e 15,3 % de 10 para 15 % de sólidos com carga enzimáticas de 5 e 10 (mg de proteína/ g de substrato), respectivamente.

O tempo liquefação do substrato é um dos parâmetros importantes para a viabilidade da conversão de biomassa em alta cargas de sólidos (MODENBACH; NOKES, 2013). A mudança na reologia do substrato pode ocorrer em até 4h, sem que haja mudanças expressivas na conversão (KRISTENSEN; FELBY; JØRGENSEN, 2009b). Estudos anteriores, com bagaço de cana-de-açúcar submetidos a diferentes pré-tratamentos e utilizando a hidrólise enzimática em alta carga de sólidos observaram a mudança na

reologia do substrato com tempos que variaram entre 4 e 6 h (GAO et al., 2014; SANT'ANA DA SILVA et al., 2016). Aplicando carga de sólidos entre 8 e 14% o melhor rendimento de glicose obtido foi com 12% sólidos, observando o retardamento na mudança da reologia do substrato com carga de sólidos de 14%. No entanto, com cargas de 20% de sólidos, foram reportados tempos de liquefação do substrato em torno de 6 h (SANT'ANA DA SILVA et al., 2016), diferente do que foi observado neste estudo.

Os resultados da Tabela10 mostram que concentrações de glicose viáveis (> 80 g/L, Larsen et al. (2008); Modenbach; Nokes, (2013) para a obtenção de etanol 2G são atingidas com cargas de sólidos maiores ou iguais a 15%. Por outro lado, mesmo atingindo altas concentrações de glicose, o tempo necessário para mudança de reologia do substrato com carga de sólido variou, sendo observado com 4, 6 e 8h de hidrólise para as cargas de sólidos de 10, 15 e 17,5%, respectivamente.

Tabela 11- Concentração de glicose em função da carga de sólidos de PPB-B combinadas com diferentes cargas de enzimas.

		Concentração de glicose (g/L)			
	Sólidos (%)	**10**	**15**	**17,5**	**20**
enzima (mg de proteína/g	**5**	66,6 ± 0,2	88,4 ± 1,8		
	7,5		98,7 ± 3,1		
	10	82,6 ± 1,4		122,5 ± 7,3*	
	12,5			124,4 ± 0,2	125,5 ± 2,9*
	15,0				144,6 ± 4,8 *

(*) concentrações alcançadas com 96 h de hidrólise enzimática
Fonte: Arquivo pessoal

As maiores concentrações de glicose foram atingidas com carga de sólidos de 20% (Tabela 11). No entanto, o tempo para que o substrato atingisse fluidez (liquefação) foi 25% maior que o tempo determinado como referência (72 h) para conversão da celulose neste e em outros estudos em alta carga de sólidos (DU et al., 2014a, 2017; GAO et al., 2014; GENG et al., 2015; SANT'ANA DA SILVA et al., 2016). A carga de sólidos de 17,5% combinada com a carga de enzima de 10 (mg de proteína/g substrato) atingiu concentração de glicose superior a 80 (g/L), no entanto, o tempo necessário para o substrato ser liquefeito foi de 96 h. Com isso, a carga de sólido de 17,5% e carga de enzimas de 12,5 (mg de proteína/ g de substrato) foram escolhidas para dar continuidade aos experimentos para a obtenção de nanoceluloses.

5.6 Separação de açúcares e isolamento das nanoceluloses

Na separação da CNC, a completa remoção dos açúcares e dos resíduos gerados pelo processo de hidrólise da celulose, geralmente é realizada através de sucessivas centrifugações em altas rotações (BRINCHI et al., 2013; JONOOBI et al., 2015), até que o sobrenadante se torne turvo, evidenciando a presença da CNC (FILSON; DAWSON-ANDOH; SCHWEGLER-BERRY, 2009; CUI et al., 2016), tanto para a hidrólise ácida quanto para hidrólise enzimática. Entretanto, a centrifugação demanda um alto consumo de energia, devido as sucessivas etapas do processo.

De acordo com Gimbert et al., (2005) a filtração é uma operação mais simples que centrifugação. Buscando uma alternativa ao processo de centrifugação utilizou-se a filtração, por ser um processo de separação muito aplicado industrialmente, podendo também ser aplicado à produção de CNC, facilitando a ampliação de escala e a utilizando equipamentos menos complexos (KOWALCZYK; LAGZI; GRZYBOWSKI, 2011).

Testes comparativos preliminares de separação de açúcares e resíduo sólido de hidrólise foram realizados por centrifugação a 4.500 x g e filtração a vácuo, utilizando como meio filtrante papel de filtro Whatman nº 1. Os resultados não apresentaram diferenças significativas entre os métodos, na recuperação das frações sólida e líquida. Desse modo, a filtração foi eleita o método para etapa de separação e remoção de açúcares do resíduo de hidrólise, considerando a facilidade de operação e possibilidade de ampliação de escala.

As maiores fontes de celulose no Brasil são a polpa kraft de eucalipto, que já possui mercado estabelecido na indústria de papel e celulose, e o bagaço de cana-de-açúcar, utilizado para a geração de energia renovável. Neste estudo, o bagaço de cana-de-açúcar foi a matéria-prima utilizada para avaliar viabilidade de a obtenção de açúcares fermentescíveis e nanoceluloses em processo integrado. Contudo, a PKB-E foi utilizada para fins comparativos, principalmente para a obtenção nanoceluloses, já que a PKB é a fonte de celulose mais utilizada para a produção de nanoceluloses (BECK-CANDANEDO; ROMAN; GRAY, 2005; CHEN et al., 2015)

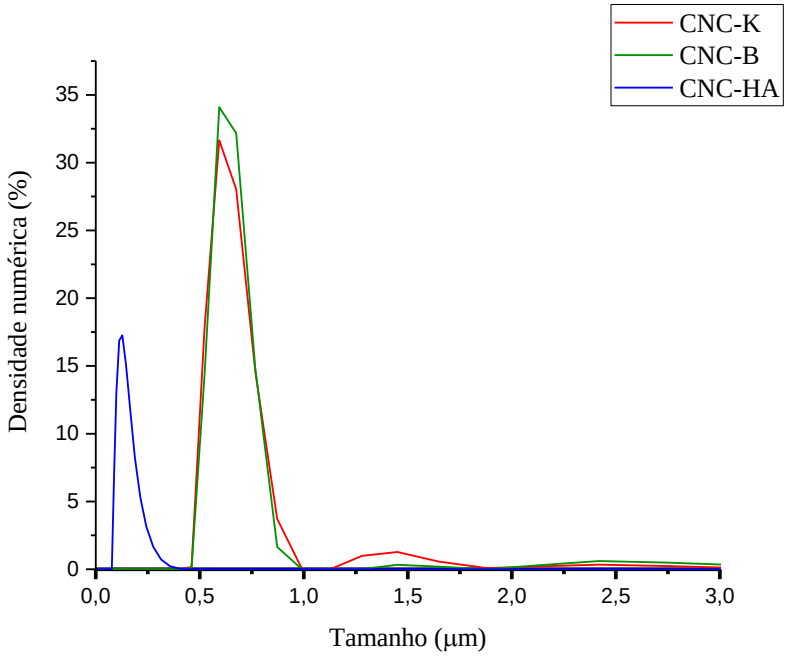
Com 80,7% de conversão da celulose para PPB-B e 66,7% para a PKB-E, os níveis de glicose atingidos pela hidrólise foram de 124,9 g/L ± 0,2 e 101,8 g/L ± 0,3, respectivamente, atingindo concentrações viáveis para a produção de etanol 2G, isto é, concentrações maiores que 80 g/L (LARSEN et al., 2008; MODENBACH; NOKES,

2013). Quanto ao conteúdo de xilana convertida em xilose, a PPB-B atingiu a máxima conversão totalizando 4,7 g/L de xilose e a PKB-E atingiu 22,9 g/L conversão que corresponde a 66,1 %.

5.6.1 Isolamento e tamanho das partículas de CNC

As dimensões das nanoceluloses são dependes da matéria-prima utilizada, da forma com a qual ela é processada e o método utilizado para a obtenção das nanopartículas. Neste estudo, foram utilizadas 5 etapas de lavagens para a extração da CNC partir PPB-B (CNC-B) e 6 etapas de lavagens para a extração da CNC partir da PKB-E (CNC-K). A turbidez da suspenção foi considerada como um critério para a extração das partículas de CNC-B e CNC-K (FILSON; DAWSON-ANDOH; SCHWEGLER-BERRY, 2009; MANDAL; CHAKRABARTY, 2011; TEIXEIRA et al., 2015).

Figura 16- Distribuição do tamanho de partículas das suspensões produzidas a partir da PPPB-B (CNC-B) e PKEB (CNC-K) comparadas a CNC produzida por hidrólise ácida da PKB-E de acordo com a metodologia descrita por Bondeson, Mathew and Oksman, (2006) (CNC-HA).



Fonte: Arquivo pessoal

A hidrólise enzimática da PPB-B e PKB-E resultou em partículas com tamanhos médios de 679 nm, 676 nm para CNC-B e CNC-K, respetivamente. Ao comparar o tamanho dessas partículas às obtidas por hidrólise ácida da PKB-E, produzidas de acordo com a metodologia descrita por Bondeson, Mathew and Oksman, (2006), observou-se que as partículas produzidas pela hidrólise enzimática, neste estudo, apresentaram- se em média 535 nm maiores que as resultantes da hidrólise ácida (142 nm).

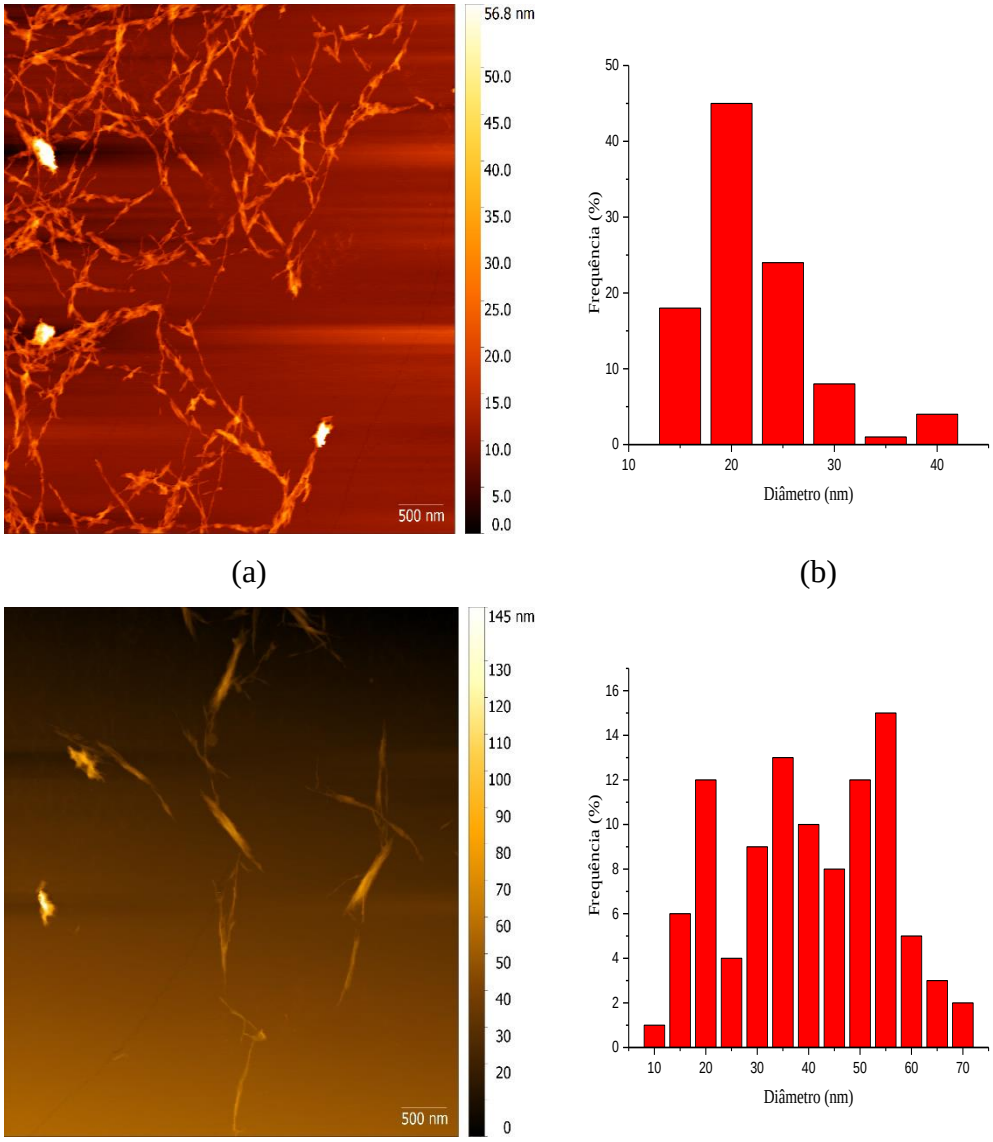
De acordo com a Tabela 5, o tamanho médio da CNC obtidas exclusivamente por hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar está em torno de 250 nm. Resultados que não se assemelham aos obtidos por hidrólise enzimática (Figura 16). No entanto, os tamanhos encontrados neste estudo estão de acordo com oss reportados para CNC obtida via hidrólise enzimática, que variam de 100 a 1000 nm de comprimento (FILSON; DAWSON-ANDOH; SCHWEGLER-BERRY, 2009; TEIXEIRA et al., 2015). Quando comparamos a CNC-B e a CNC-K, não fsão observadas grandes diferenças nos tamanhos das nanopartículas, mostrando semelhança na uniformidade entre as obtidas a partir de diferentes matérias-primas e pequenas diferenças na densidade numérica.

5.6.2 Morfologia das partículas e diâmetro do cristal

A microscopia de força atômica (AFM) é um método analítico que permite não só a visualização da morfologia das nanoceluloses, bem como realizar medidas de diâmetros mostrando a frequência com a qual aparece o diâmetro das nanoparticulas.

A morfologia da CNC-B obtida durante este estudo se apresenta consistente com os resultados reportados para essas partículas obtidas a partir de bagaço de cana-de-açúcar (Figura 17 (a)) (CAMARGO et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2016; LAM et al., 2017; LEÃO et al., 2017). A distribuição de frequência do diâmetro mostrou que o maior número de partículas possui diâmetro em torno de 20 nm. A CNC-K também apresentou morfologia de acordo com os nanocristais descritos na literatura, com diâmetros menos uniformes que a CNC-B (Figura 17 (d)). Por outo lado, mesmo com os diâmetros apresentando diferentes distribuições de frequência, tanto CNC-B quanto para CNC-K, os resultados estão de acordo com valores reportados na literatura, com medidas que variam de 4 a 80nm (FILSON; DAWSON-ANDOH; SCHWEGLER-BERRY, 2009; TEIXEIRA et al., 2015).

Figura 17- (a) imagem de AFM da CNC-B, (b) distribuição de frequência do diâmetro da CNF-B, (c) imagem de AFM da CNC-K e (c) distribuição de frequência do diâmetro da CNF-K (d).



Fonte: Arquivo pessoal

O diâmetro médio reportado na literatura para CNC a partir de bagaço de cana-de-açúcar varia entre 4 e 14 nm, de acordo com a Tabela 5. No entanto, é importante ressaltar que essas partículas são produzidas quase que exclusivamente através de hidrólise ácida, que nos permite dizer que as partículas de CNC-B apresentam na sua maioria diâmetros maiores devido à menor seletividade do ácido entre as de regiões cristalinas e amorfas da celulose.

5.6.2 Índice de Cristalinidade e tamanho do cristalito

O índice cristalinidade (ICr) é um dos critérios mais importantes para evidenciar o nível de organização das nanopartículas, influenciando nas propriedades térmicas e mecânicas do material. Para o bagaço de cana-de-açúcar não tratado o ICr médio encontrado na literatura é de 56,7% (BEZERRA; RAGAUSKAS, 2016) e quando comparamos o ICr da PPB-B observa-se que valor é superior ao do bagaço de cana-de-açúcar, o que pode ser atribuído à remoção de componentes amorfos do material (hemicelulose e lignina) pelos pré-tratamentos aplicados e a CNC-B menor ICr.

Tabela 12- Índice de Cristalinidade (ICr) e tamanho do cristalito da CNC-B, CNC-K, PPB-B e PKB-E

Amostra	ICr (%)	Tamanho do cristalito (nm)
PPB-B	62,3 ± 2,3	3,2 ± 0,485
PKB-E	69,1 ± 0,8	3,3 ± 0,014
CNC-B	54,0 ± 0,7	3,4 ± 0,101
CNC-K	46,5 ±1,0	3,6 ± 0,325

Fonte: Arquivo pessoal

Para o CNCs obtidas a partir do bagaço de cana-de-açúcar, estudos mostram índice de cristalinidade entre 51 e 87,5% (KUMAR et al., 2014; TEIXEIRA et al., 2015; CAMARGO et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2016; LAM et al., 2017; LEÃO et al., 2017). Entretanto, observou-se o decréscimo do ICr da PPB-B para CNC-B (Tabela 12). Este resultado pode ser explicado pela combinação da ação do coquetel enzimático nas porções cristalinas da celulose e o aumento proporcional de lignina no material.

O decréscimo de cristalinidade também foi observado na produção de CNC-K em relação a matéria-prima. Anteriormente, o coquetel enzimático Cellic CTec 2 foi utilizado para a hidrólise da PKB-E e foi notada a redução do ICr no resíduo de hidrólise em relação a PKB-E, que pode ser atribuída a ação das enzimas em regiões cristalinas da celulose (SIQUIERA; NARDI; ARANTES, 2015).

Na tabela 12 são mostrados os tamanhos dos cristalitos de celulose que refletem a estrutura cristalina da celulose (NISHIYAMA; JOHNSON; FRENCH, 2012), evidenciando a semelhança da celulose de diferentes fontes.

5.6.4 Composição química e rendimento de CNC

Uma característica importante da CNC é a sua composição química (Tabela 12), pois ela está ligada as suas propriedades, como termoestabilidade e hidrofobicidade (SANTUCCI et al., 2016). Alterações causadas na composição química da CNC também podem ser vistas no rendimento, pois a presença de componentes não celulósicos podem contribuir para o aumento do rendimento (OLIVEIRA et al., 2016).

Ao compararmos a composição química da CNC-B e CNC-K com a CNC obtida através de hidrólise ácida, observamos que o conteúdo de celulose é menor para a CNC-B (Tabela 13), que pode ser atribuído a degradação da celulose durante o processo de hidrólise e a composição química do matéria-prima, o que permite a essas partículas serem utilizadas em diferentes aplicações.

Tabela 13- Composição química da CNC

	Composição química (%)		
Componente	**CNC-B**	**CNC-K**	**CNC-HA***
Celulose	69,4 ± 2,8	74,0 ±0,2	91,8 ± 0,4
Xilana	nd	9,6 ± 0,2	3,2 ± 0,1
Lignina	18,7 ± 1,5	nd	nd

* CNC produzida por hidrólise acida da PKB-E de acordo a metodologia descrita por Bondeson, Mathew and Oksman, (2006); nd - não detectado
Fonte: Arquivo pessoal

O rendimento de CNC é um ponto pouco abordado nos trabalhos de produção de CNC a partir de bagaço de cana-de-açúcar. Os rendimentos já reportados são da ordem de 9-24% (OLIVEIRA et al., 2016) e 50-58% (TEIXEIRA et al., 2011), com método tradicional, o rendimento é de cerca de 30% (BONDESON; MATHEW; OKSMAN, 2006).

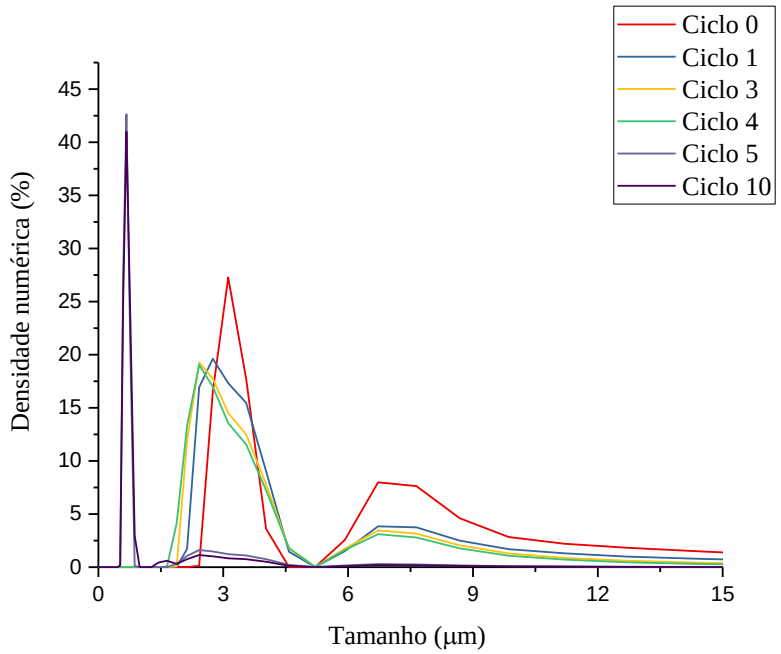
Neste estudo, o rendimento de CNC-B obtido foi de 48,4% e 18,6% para CNC-K, sendo recuperados 10,6 g ± 0,23 de CNC-B e 4,8 g ± 0,14 de CNC-K, para cada 500 g de hidrolisado. Por outro lado, é importante ressaltar que os rendimentos obtidos se baseiam no resíduo da hidrólise para a obtenção de açúcares para etanol 2G, e as condições de hidrólise foram ajustadas para a recuperação de açúcares e CNC a partir de bagaço de cana-de-açúcar, e para fins comparativos, as mesmas condições de hidrólise foram aplicadas à PKB-E, influenciando no baixo rendimento de CNC-K.

5.6.5 Produção e tamanho das partículas de CNF

A produção de CNF a partir de bagaço de cana-de-açúcar já foi avaliada em diversos estudos utilizado diferentes métodos, no entanto poucos utilizaram enzimas durante o processo de obtenção da nanopartículas (DE CAMPOS et al., 2013; TEIXEIRA et al., 2015; SAELEE et al., 2016).

Uma diferente abordagem na produção da CNF é a utilização do resíduo do isolamento da CNC para a produção da CNF, isto é, produção CNF integrada à produção de CNC. Entretanto, os estudos que avaliaram a viabilidade desta alternativa de obtenção de CNF utilizaram hidrólise ácida, com ácido sulfúrico (WANG et al., 2012b; WANG; ZHU; CONSIDINE, 2013) ou com ácido orgânico (BIAN et al., 2017; WANG et al., 2017), para a obtenção da CNC e para a obtenção de CNF foi utilizado microfluidizador, com exceção de Wang, Zhu, Considine, (2013) que utilizaram o ultra-refinador SuperMassColloider .

Figura 18- Distribuição do tamanho de partículas de CNF-B produzidas a partir do resíduo de isolamento da CNC-B.



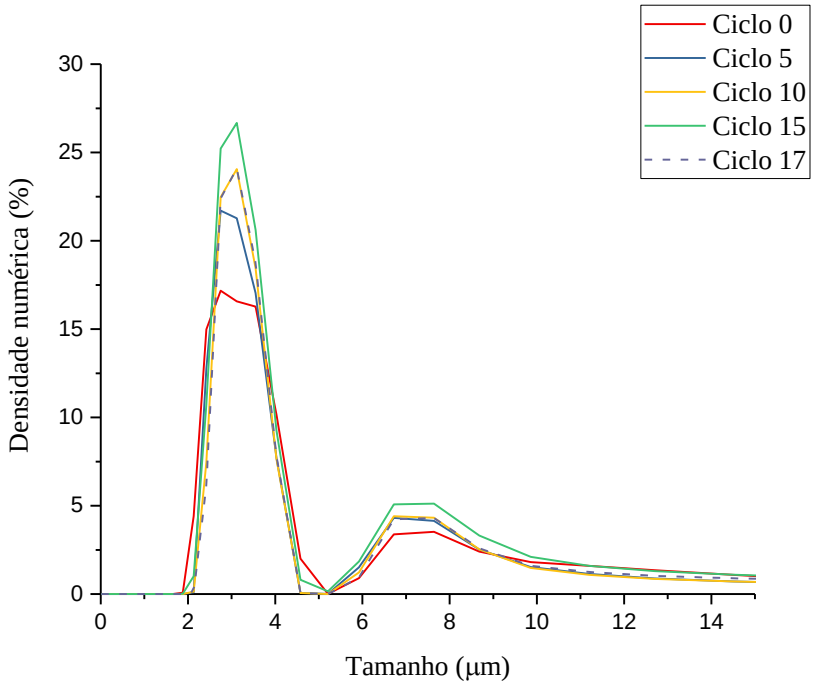
Fonte: Arquivo pessoal

Durante o processamento do resíduo do isolamento da CNC-B foi observada a diminuição gradual do tamanho das partículas até a obtenção da CNF-B (ciclo 5), caracterizada pelo aspecto gelatinoso e mudança no tamanho médio das partículas do resíduo de isolamento da CNC-B, de 3,71 µm para 722 nm. De acordo com a Figura 18, a maior alteração no tamanho das partículas foi obtida do ciclo 4 para o ciclo 5, e mesmo com o prosseguimento do processamento até o ciclo 10, não foram observadas alterações significativas nos tamanhos das partículas.

Quando comparamos a CNF-B com a CNF-K, são observadas diferenças no tamanho médio das partículas de 722 nm e 3,5 µm, respectivamente.

Entretanto, mesmo com um processamento mais extensivo que o aplicado ao resíduo do isolamento da CNB-B, as condições de refino aplicadas ao resíduo do isolamento da CNC-K não foram capazes de realizar grandes modificações no tamanho das partículas (Figura 19). Desse modo, podemos inferir que as mudanças causadas na estrutura da celulose pela ação das enzimas do preparo enzimático utilizado impedem a alteração do tamanho das partículas nas condições de refino aplicadas ao resíduo do isolamento da CNC-K.

Figura 19- Distribuição do tamanho de partículas da CNF-K

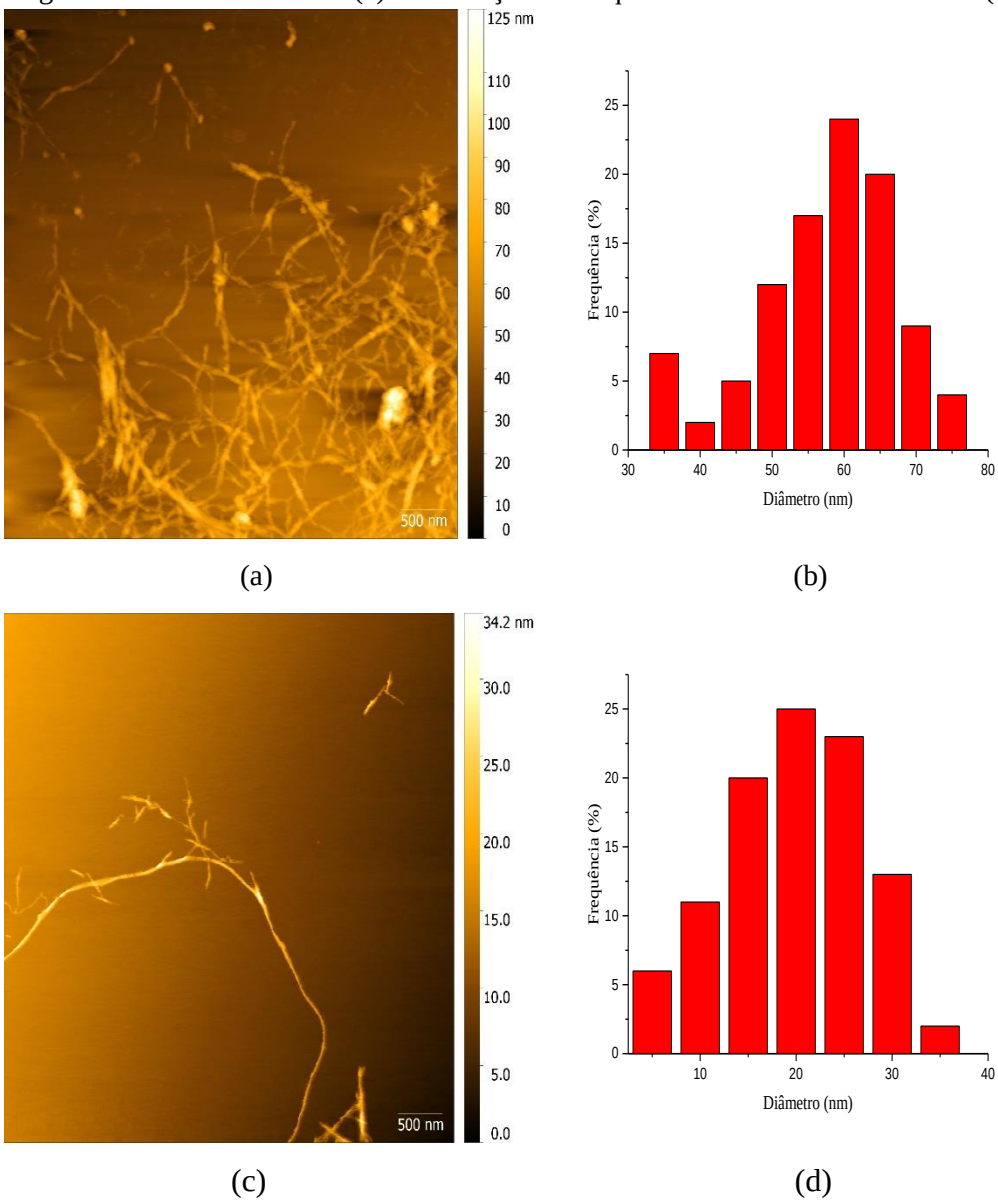


Fonte: Arquivo pessoal

5.6.6 Morfologia das partículas e diâmetro da CNF

A morfologia das partículas observadas na Figura 20(a) e (c) mostra que tanto o processamento do resíduo obtido após isolamento da CNC-B, quanto o processamento do resíduo obtido após isolamento da CNC-K foram capazes de produzir CNF. Entretanto, mesmo não apresentando redução no tamanho das partículas, a CNF-K apresentou uma distribuição de frequência dos diâmetros com medidas menores do que 40 nm (Figura 20 (d)).

Figura 20- (a) imagem de AFM da CNF-B, (b) distribuição de frequência do diâmetro da CNF-B, (c), imagem de AFM da CNF-K e (c) distribuição de frequência do diâmetro da CNF-K (d)



Fonte: Arquivo pessoal

O tamanho das partículas de CNF produzida a partir de bagaço de cana-de-açúcar é reportado em poucos trabalhos (TEIXEIRA et al., 2015; BANSAL et al., 2016; SAELEE et al., 2016), e variam entre 264 nm e 4 µm de acordo com a Tabela 5. O valor médio do tamanho das partículas encontrado para este estudo foi de 722 nm e com diâmetros aparecendo em maior frequência entre 55 e 65 nm. A eficiência do processamento é demonstrada pela morfologia observada, e pelos diâmetros das partículas que de acordo com a literatura pode de 4 a 100 nm (TEIXEIRA et al., 2015; BANSAL et al., 2016).

O consumo de energia é um dos aspectos avaliados durante o processo de obtenção de CNF é o consumo de energia. De acordo com Wang et al., (2015), o consumo de energia necessário para obtenção de CNF através da desfibrilação mecânica a partir da PKB-E varia entre 5 e 40 kWh/kg. Com isso, mesmo não observando a redução de tamanho das partículas de CNF-K por vários ciclos, o processamento do resíduo obtido após o isolamento da CNC-K foi interrompido no ciclo 17, por ter atingido o consumo de energia de 40 kWh/kg. Por outro lado, o consumo de energia para a obtenção da CNF-B (14,6 kWh/kg) foi 63,5 % menor do que o consumo de energia utilizado para a produção da CNF-K.

O menor consumo de energia na produção da CNF-B pode ser atribuído as modificações intensas sofridas pela fibras do bagaço de cana-de-açúcar durante os tratamentos aplicados (pré-tratamento por explosão a vapor, deslignificação e branqueamento), a hidrólise enzimática, que já foi utilizada como pré-tramento na obtenção de CNF (HENRIKSSON et al., 2007; DE CAMPOS et al., 2013; TEIXEIRA et al., 2015; SAELEE et al., 2016), além da presença de lignina que pode facilitar a desfibrilação da celulose através de tratamentos mecânicos (SANTUCCI et al., 2016).

A partir de um balanço de massas ao final da obtenção das CNF, é possível observar que 38,7% do resíduo obtido após a hidrólise da PPB-B foi utilizado para a obtenção da CNF-B e 81,2% do resíduo obtido após hidrólise da PKB-E foi utilizado para a produção da CNF-K, resultando em rendimentos finais em relação a massa iniciais de polpa de 13,07% e 23,9% de CNF-B e CNF-K.

5.6.2 Estabilidade da suspensão e potencial zeta

A medida do potencial zeta indica a magnitude da repulsão eletrostática das partículas presentes em uma suspensão coloidal. Valores em módulo do potencial zeta de 10-30 Mv indica que a suspensão é considerada instável, ao passo que quando o módulo varia de 30-40 mV, a suspensão é considera moderadamente estável, e módulo de potencial zeta maiores que 40 mV permite que a suspensão seja considerada estável (MARTELLI-TOSI et al., 2016).

A estabilidade de uma suspensão coloidal é um parâmetro crítico para as nanoceluloses, uma forma de monitorá-la é através do potencial zeta. As nanoceluloses produzidas através de hidrólise enzimática tendem a apresentar baixa estabilidade, devido a não substituição dos grupos hidroxilas por grupos sulfato como ocorre na CNC produzida por hidrolise com ácido sulfúrico. Entretanto, para a CNC-B, o valor de potencial zeta está próximo aos valores encontrados na literatura (≈ -7,0 mV) para CNC modificada com o reagente TEMPO (LI et al., 2015), e diferente das partículas de CNC obtidas por Filson; Dawson-Andoh; Schwegler-Berry, (2009) (-31,37 mV), e demostram boa estabilidade da suspenção.

Tabela 14- Potencial zeta das suspensões de CNC, CNF, PKB-E e PPB-B

	Potencial zeta (mV)
CNC-B	-7,8 ± 3,5
CNC-K	-15,4 ±10,6
CNF-B	-16,2 ± 6,4
CNF-K	-10, 1 ± 3,1
PPB-B	- 22,2 ± 6,8
PKB-E	-19,5 ± 7,7

Fonte: Arquivo pessoal

Por outro lado, ao compararmos o potencial zeta das amostras da Tabela 14, observamos a diminuição da estabilidade das nanocelulose em relação as polpas PPB-B e PPB-K, o que podemos atribuir as mudanças na superfície das partículas, ocasionadas pela hidrólise enzimática para as CNC e a ação combinada da hidrólise enzimática com o ultra-refino mecânico para as CNF.

6 CONCLUSÃO

O pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar por explosão a vapor foi eficiente na remoção da hemicelulose e associado aos tratamentos em meio alcalino promoveram o enriquecimento em celulose no material pré-tratado, garantindo a acessibilidade das enzimas à celulose. Os resultados de conversão da celulose obtidos, comparados aos resultados da literatura mostraram que o uso de um preparo enzimático mais eficiente melhorou o processo de hidrólise e diminuindo a carga de enzima empregada.

O sistema de agitação e a alta carga de sólidos combinados como a carga de enzima foram fatores fundamentais para atingir conversões de celulose em torno de 80% e concentrações de glicose superiores 100 g/L. Além disso, a filtração foi utilizada como uma alternativa eficiente a centrifugação na recuperação de açúcares e na separação do resíduo sólido da hidrólise enzimática no processo integrado de obtenção de nanoceluloses.

As partículas de CNC obtidas a partir de bagaço de cana-de-açúcar através da hidrólise enzimática apresentaram tamanho médio de 679 nm, cristalinidade 54% e diâmetros com maior frequência entra 55 e 65 nm. O rendimento de CNC baseado no resíduo de hidrólise, foi aproximadamente 48%.

As alterações na fibra da PPB-B caudas pelo tratamento enzimático permitiram que partículas de CNF fossem alcançadas consumindo quase 3 vezes menos energia que na obtenção da CNF partir do resíduo de hidrólise da PKB-E. Assim, a metodologia empregada na obtenção de CNF integrada a produção de CNC mostrou-se eficiente, com a CNF-B apresentando tamanho médio de 722 nm e diâmetros entre 30 e 80 nm. O monitoramento do potencial zeta mostrou que, tanto as partículas de CNC quanto as partículas de CNF apresentam baixa estabilidade em suspenção.

Com a abordagem experimental adotada neste estudo pode-se concluir que é possível obter nanoceluloses integradas ao processo de obtenção de açúcares para etanol 2G a partir de bagaço de cana-de-açúcar.

7 REFERÊNCIAS

ABDUL KHALIL, H. P. S.; DAVOUDPOUR, Y.; ISLAM, M. N.; MUSTAPHA, A.; SUDESH, K.; DUNGANI, R.; JAWAID, M. Production and modification of nanofibrillated cellulose using various mechanical processes: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, n. July, p. 649–665, 2014.

ABE, K.; YANO, H. Comparison of the characteristics of cellulose microfibril aggregates of wood, rice straw and potato tuber. **Cellulose**, v. 16, n. 6, p. 1017–1023, 2009.

AGBOR, V. B.; CICEK, N.; SPARLING, R.; BERLIN, A.; LEVIN, D. B. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 675–685, 2011.

AGODA-TANDJAWA, G.; DURAND, S.; BEROT, S.; BLASSEL, C.; GAILLARD, C.; GARNIER, C.; DOUBLIER, J. L. Rheological characterization of microfibrillated cellulose suspensions after freezing. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 3, p. 677–686, 2010.

ALVAREZ-VASCO, C.; ZHANG, X. Alkaline hydrogen peroxide pretreatment of softwood: Hemicellulose degradation pathways. **Bioresource Technology**, v. 150, p. 321–327, dez. 2013.

ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4851–4861, 2010.

ANDERSON, S. R.; ESPOSITO, D.; GILLETTE, W.; ZHU, J. Y.; BAXA, U.; MCNEIL, S. E. and Microcrystalline Cellulose. **Tappi Journal**, v. 13, n. 5, p. 35–42, 2014.

ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Cellulose accessibility limits the effectiveness of minimum cellulase loading on the efficient hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. 1, p. 3, 2011.

ASSIS, C. A.; HOUTMAN, C.; PHILLIPS, R.; BILEK, E. M. T.; ROJAS, O. J.; PAL, L.; PERESIN, M. S.; JAMEEL, H.; GONZALEZ, R. Conversion Economics of Forest Biomaterials: Risk and Financial Analysis of CNC Manufacturing. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 11, n. 4, p. 682–700, jul. 2017

BANSAL, M.; CHAUHAN, G. S.; KAUSHIK, A.; SHARMA, A. Extraction and functionzalization of bagasse cellulose nanofibres to Schiff-base based antimicrobial membranes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 887–894, 2016.

BECK-CANDANEDO, S.; ROMAN, M.; GRAY, D. G. Effect of reaction conditions on the properties and behavior of wood cellulose nanocrystal suspensions. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 2, p. 1048–1054, 2005.

BERGGREN, R.; MOLIN, U.; BERTHOLD, F.; LENNHOLM, H.; LINDSTRÖM, M. Alkaline degradation of birch and spruce: Influence of degradation conditions on molecular mass distributions and fibre strength. **Carbohydrate Polymers**, v. 51, n. 3, p. 255–264, 2002.

BEZERRA, T. L.; RAGAUSKAS, A. J. A review of sugarcane bagasse for second-generation bioethanol and biopower productionBiofuels**, Bioproducts and Biorefining**,

set. 2016.

BHATTACHARYA, D.; GERMINARIO, L. T.; WINTER, W. T. Isolation, preparation and characterization of cellulose microfibers obtained from bagasse. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, n. 3, p. 371–377, 2008.

BIAN, H.; CHEN, L.; DAI, H.; ZHU, J. Y. Integrated production of lignin containing cellulose nanocrystals (LCNC) and nanofibrils (LCNF) using an easily recyclable di-carboxylic acid. **Carbohydrate Polymers**, v. 167, p. 167–176, 2017.

BIRGIT KAMM; GRUBER, P. R.; MICHAEL KAMM. Biorefineries – Industrial Processes and Products. In: **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**. [s.l: s.n.]p. 659–683.

BONDESON, D.; MATHEW, A.; OKSMAN, K. Optimization of the isolation of nanocrystals from microcrystalline cellulose by acid hydrolysis. **Cellulose**, v. 13, n. 2, p. 171–180, 2006.

BRINCHI, L.; COTANA, F.; FORTUNATI, E.; KENNY, J. M. Production of nanocrystalline cellulose from lignocellulosic biomass: Technology and applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 1, p. 154–169, 2013.

BUCKERIDGE, M. S.; SOUZA, A. P. Breaking the "Glycomic Code" of cell wall polysaccharides may improve second-generation bioenergy production from biomass. **Bioenergy Research**, v. 7, n. 4, p. 1065-1073, 2014.

CAMARGO, L. A.; PEREIRA, S. C.; CORREA, A. C.; FARINAS, C. S.; MARCONCINI, J. M.; MATTOSO, L. H. C. Feasibility of Manufacturing Cellulose Nanocrystals from the Solid Residues of Second-Generation Ethanol Production from Sugarcane Bagasse. **Bioenergy Research**, v. 9, n. 3, p. 894–906, 2016.

CAMPOS, A.; CORREA, A. C.; CANNELLA, D.; DE M TEIXEIRA, E.; MARCONCINI, J. M.; DUFRESNE, A.; MATTOSO, L. H. C.; CASSLAND, P.; SANADI, A. R. Obtaining nanofibers from curau?? and sugarcane bagasse fibers using enzymatic hydrolysis followed by sonication. **Cellulose**, v. 20, n. 3, p. 1491–1500, 2013.

CARVALHO, Walter et al. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 1-5, 2009.

CARVALHO, D. M. de; QUEIROZ, J. H. de; COLODETTE, J. L. Assessment of alkaline pretreatment for the production of bioethanol from eucalyptus, sugarcane bagasse and sugarcane straw. **Industrial Crops and Products**, v. 94, p. 932-941, 2016.

CAVALETT, O.; CHAGAS, M. F.; JUNQUEIRA, T. L.; WATANABE, M. D. B.; BONOMI, A. Environmental impacts of technology learning curve for cellulosic ethanol in Brazil. **Industrial Crops and Products**, v. 106, p. 31–39, 2017.

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

CHEN, L.; WANG, Q.; HIRTH, K.; BAEZ, C.; AGARWAL, U. P.; ZHU, J. Y. Tailoring the yield and characteristics of wood cellulose nanocrystals (CNC) using concentrated acid hydrolysis. **Cellulose**, v. 22, n. 3, p. 1753–1762, 1 jun. 2015.

CHENG, Q.; WANG, S.; HAN, Q. Novel process for isolating fibrils from cellulose fibers

by high-intensity ultrasonication. II. Fibril characterization. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 115, n. 5, p. 2756-2762, 2010.

CHENG, Q.; WANG, S.; RIALS, T. G.; LEE, S. H. Physical and mechanical properties of polyvinyl alcohol and polypropylene composite materials reinforced with fibril aggregates isolated from regenerated cellulose fibers. **Cellulose**, v. 14, n. 6, p. 593–602, 2007.

CHIRAT, C.; LACHENAL, D.; DUFRESNE, A. Biorefinery in a kraft pulp mill: From bioethanol to cellulose nanocrystals. **Cellulose Chem. Technol**, v. 44, n. 3, p. 59–64, 2010.

COMPANHIA NACIONAL DE ABATECIMENTO - CONAB. ACOMPANHAMENTO DA SAFRA BRASILEIRA Cana-de- açúcar. **Companhia Nacional de Abastecimento.**, v. 4, n. 2, p. 1–73, 2017.

COSGROVE, D. J. Re-constructing our models of cellulose and primary cell wall assembly. **Current opinion in plant biology,** v. 22, p. 122-131, 2014**.**

COWIE, J.; BILEK, E. M.; WEGNER, T. H.; SHATKIN, J. A.. Market projections of cellulose nanomaterial-enabled products-Part 2: Volume estimates. **TAPPI J**, v. 13, n. 6, p. 57-69, 2014.

CUI, S.; ZHANG, S.; GE, S.; XIONG, L.; SUN, Q. Green preparation and characterization of size-controlled nanocrystalline cellulose via ultrasonic-assisted enzymatic hydrolysis. **Industrial Crops and Products**, v. 83, p. 346–352, 2016.

DATABASE: Task 39. Disponível em: <http://demoplants21.bioenergy2020.eu/projects/displaymap/VEcQZJ> Acesso em: 23, nov, 2017

DEL RÍO, J. C.; LINO, A. G.; COLODETTE, J. L.; LIMA, C. F.; GUTIÉRREZ, A.; MARTÍNEZ, Á. T.; LU, F.; RALPH, J.; RENCORET, J. Differences in the chemical structure of the lignins from sugarcane bagasse and straw. **Biomass and Bioenergy**, v. 81, p. 322-338, 2015.

DELMER, D. P.; AMOR, Y. Cellulose Biosynthesis. **American Society of Plant Physiologis**, v. 7, n. July, p. 987–1000, 1995.

DIAS, M. O. S.; JUNQUEIRA, T. L.; CAVALETT, O.; CUNHA, M. P.; JESUS, C. D. F.; ROSSELL, C. E. V.; MACIEL FILHO, R.; BONOMI, A. Integrated versus stand-alone second generation ethanol production from sugarcane bagasse and trash. **Bioresource Technology**, v. 103, n. 1, p. 152–161, 2012

DIEDERICKS, D.; VAN RENSBURG, E.; GÖRGENS, J. F. Enhancing sugar recovery from sugarcane bagasse by kinetic analysis of a two-step dilute acid pretreatment process. **Biomass and Bioenergy**, v. 57, p. 149–160, 2013.

DU, J.; CAO, Y.; LIU, G.; ZHAO, J.; LI, X.; QU, Y. Identifying and overcoming the effect of mass transfer limitation on decreased yield in enzymatic hydrolysis of lignocellulose at high solid concentrations. **Bioresource Technology**, v. 229, p. 88–95, 2017.

DU, J.; LI, Y.; ZHANG, H.; ZHENG, H.; HUANG, H. Factors to decrease the cellulose conversion of enzymatic hydrolysis of lignocellulose at high solid concentrations. **Cellulose**, v. 21, n. 4, p. 2409–2417, 2014a.

DU, J.; ZHANG, F.; LI, Y.; ZHANG, H.; LIANG, J.; ZHENG, H.; HUANG, H. Enzymatic liquefaction and saccharification of pretreated corn stover at high-solids

concentrations in a horizontal rotating bioreactor. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, n. 2, p. 173–181, 2014b.

DUFRESNE, A. **Nanocellulose: From Nature to High Performance Tailored Materials**. Munchen DEU: Walter de Gruyter, 2012.

DURÁN, N.; LEMES, A. N. A. P.; DURÁN, M.; FREER, J.; BAEZA, J. A A minireview of cellulose nanocrystals and its potential integration as co-product in bioethanol production. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 56, n. 2, p. 672-677, 2011.

FENGEL, D.; WEGENER, G (Ed). **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions.** Walter de Gruyte, 1989

FERNANDES, A. N.; THOMAS, L. H.; ALTANER, C. M.; CALLOW, P.; FORSYTH, V. T.; APPERLEY, D. C.; KENNEDY, C. J.; JARVIS, M. C. Nanostructure of cellulose microfibrils in spruce wood. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2011.

FIELD, C. B.; CAMPBELL, J. E.; LOBELL, D. B. Biomass energy: the scale of the potential resource. **Trends in ecology & evolution**, v. 23, n. 2, p. 65-72, 2008.

FILSON, P. B.; DAWSON-ANDOH, B. E.; SCHWEGLER-BERRY, D. Enzymatic-mediated production of cellulose nanocrystals from recycled pulp. **Green Chemistry**, v. 11, n. 11, p. 1808, 2009.

FREIRE, C. S. R.; SILVESTRE, A. J. D.; GANDINI, A.; NETO, C. P. New materials from cellulose fibers. A contribution to the implementation of the integrated biorefinery concept. **O Papel**, v. 72, n. 9, p. 91–96, 2011.

GAO, Y.; XU, J.; YUAN, Z.; ZHANG, Y.; LIU, Y.; LIANG, C. Optimization of fed-batch enzymatic hydrolysis from alkali-pretreated sugarcane bagasse for high-concentration sugar production. **Bioresource Technology**, v. 167, p. 41–45, 2014.

GARLOCK, R. J.; BALAN, V.; DALE, B. E.; RAMESH PALLAPOLU, V.; LEE, Y. Y.; KIM, Y.; MOSIER, N. S.; LADISCH, M. R.; HOLTZAPPLE, M. T.; FALLS, M.; SIERRA-RAMIREZ, R.; SHI, J.; EBRIK, M. A.; REDMOND, T.; YANG, B.; WYMAN, C. E.; DONOHOE, B. S.; VINZANT, T. B.; ELANDER, R. T.; HAMES, B.; THOMAS, S.; WARNER, R. E. Comparative material balances around pretreatment technologies for the conversion of switchgrass to soluble sugars. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 24, p. 11063–11071, 2011.

GELLERSTEDT, G.; EK, M.; HENRIKSSON, G (Ed). **Wood Chemistry and Wood Biotechnology**. Walter de Gruyter, 2009. v. 1

GENG, W.; JIN, Y.; JAMEEL, H.; PARK, S. Strategies to achieve high-solids enzymatic hydrolysis of dilute-acid pretreated corn stover. **Bioresource Technology**, v. 187, p. 43–48, 2015.

GIMBERT, L. J.; HAYGARTH, P. M.; BECKETT, R.; WORSFOLD, P. J. Comparison of centrifugation and filtration techniques for the size fractionation of colloidal material in soil suspensions using sedimentation field-flow fractionation. **Environmental Science and Technology**, v. 39, n. 6, p. 1731–1735, 2005.

GRISHKEWICH, N.; MOHAMMED, N.; TANG, J.; TAM, K. C. Recent advances in the application of cellulose nanocrystals. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 29, p. 32–45, 2017.

GUERRIERO, G.; HAUSMAN, J. F.; STRAUSS, J.; ERTAN, H.; SIDDIQUI, K. S. Lignocellulosic biomass: Biosynthesis, degradation, and industrial utilization. **Engineering in Life Sciences**, v. 16, n. 1, p. 1–16, 2016.

GUPTA, V. K.; KUBICEK, C. P.; BERRIN, J. G.; WILSON, D. W.; COUTURIER, M.; BERLIN, A.; FILHO, E. X. F.; EZEJI, T. Fungal Enzymes for Bio-Products from Sustainable and Waste Biomass. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 41, n. 7, p. 633–645, 2016..

HABIBI, Y.; LUCIA, L. A.; ROJAS, O. J. Cellulose nanocrystals: Chemistry, self-assembly, and applications. **Chemical Reviews**, v. 110, n. 6, p. 3479–3500, 2010.

HALLAC, B. B.; RAGAUSKAS, A. J. Analyzing cellulose degree of polymerization and its relevancy to cellulosic ethanol. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining,** v. 5, n. 2, p. 215-225, 2011.

HATZIS, C.; RILEY, C.; PHILIPPIDIS, G. P. Detailed material balance and ethanol yield calculations for the biomass-to-ethanol conversion process. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 57–58, n. 1, p. 443–459, 1996.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 10–18, 2009.

HENRIKSSON, M.; HENRIKSSON, G.; BERGLUND, L. A.; LINDSTRÖM, T. An environmentally friendly method for enzyme-assisted preparation of microfibrillated cellulose (MFC) nanofibers. **European Polymer Journal**, v. 43, n. 8, p. 3434–3441, 2007.

HOGAN, C. M.; MES-HARTREE, M.; SADDLER, J. N.; KUSHNER, D. J. Assessment of methods to determine minimal cellulase concentrations for efficient hydrolysis of cellulose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 5, p. 614–620, 1990.

HORN, S.; VAAJE-KOLSTAD, G.; WESTERENG, B.; EIJSINK, V. G. Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 1, p. 45, 2012.

HU, F.; RAGAUSKAS, A. Pretreatment and Lignocellulosic Chemistry. **Bioenergy Research**, v. 5, n. 4, p. 1043–1066, 2012.

HU, J.; ARANTES, V.; SADDLER, J. N. The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: is it an additive or synergistic effect? **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. 1, p. 36, 2011.

HURTER, R. W. Nonwood Plant Fiber Characteristics HurterConsult. **HurterConsult**, n. August, p. 1–4, 2001.

IWAMOTO, S.; NAKAGAITO, A. N.; YANO, H. Nano-fibrillation of pulp fibers for the processing of transparent nanocomposites. **Applied Physics A: Materials Science and Processing**, v. 89, n. 2, p. 461–466, 2007.

JAISWAL, D.; DE SOUZA, A. P.; LARSEN, S.; LEBAUER, D. S.; MIGUEZ, F. E.; SPAROVEK, G.; BOLLERO, G.; BUCKERIDGE, M. S.; LONG, S. P. Brazilian sugarcane ethanol as an expandable green alternative to crude oil use (in press). **Nature Climate Change**, v. 7, n. November, 2017.

JONOOBI, M.; OLADI, R.; DAVOUDPOUR, Y.; OKSMAN, K.; DUFRESNE, A.; HAMZEH, Y.; DAVOODI, R. Different preparation methods and properties of nanostructured cellulose from various natural resources and residues: a review. **Cellulose**,

v. 22, n. 2, p. 935–969, 2015.

KHALIL, H. P. S. A.; DAVOUDPOUR, Y.; ISLAM, N.; MUSTAPHA, A.; SUDESH, K.; DUNGANI, R.; JAWAID, M. Production and modification of nanofibrillated cellulose using various mechanical processes : A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 649–665, 2014.

KOPPRAM, R.; TOMÁS-PEJÓ, E.; XIROS, C.; OLSSON, L. Lignocellulosic ethanol production at high-gravity: Challenges and perspectives. **Trends in Biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 46–53, 2014.

KOWALCZYK, B.; LAGZI, I.; GRZYBOWSKI, B. A. Nanoseparations: Strategies for size and/or shape-selective purification of nanoparticles. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 16, n. 2, p. 135–148, 2011.

KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C.; JØRGENSEN, H. Yield-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 2, n. 1, p. 11, 2009a.

KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C.; JØRGENSEN, H. Determining yields in high solids enzymatic hydrolysis of biomass. In: Applied Biochemistry and Biotechnology, 1–3, **Anais**...2009b.

KUMAR, A.; NEGI, Y. S.; CHOUDHARY, V.; BHARDWAJ, N. K. Characterization of Cellulose Nanocrystals Produced by Acid-Hydrolysis from Sugarcane Bagasse as Agro-Waste. **Journal of Materials Physics and Chemistry**, v. 2, n. 1, p. 1–8, 2014.

KUMAR, L.; ARANTES, V.; CHANDRA, R.; SADDLER, J. The lignin present in steam pretreated softwood binds enzymes and limits cellulose accessibility. **Bioresource Technology**, v. 103, n. 1, p. 201–208, jan. 2012.

KUMAR, L.; CHANDRA, R.; SADDLER, J. Influence of steam pretreatment severity on post-treatments used to enhance the enzymatic hydrolysis of pretreated softwoods at low enzyme loadings. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, n. 10, p. 2300–2311, 2011.

KUMAR, P.; BARRETT, D. M.; DELWICHE, M. J.; STROEVE, P. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production**.** **Industrial & engineering chemistry research,** v. 48, n. 8, p. 3713-3729, 2009

LAM, N. T.; CHOLLAKUP, R.; SMITTHIPONG, W.; NIMCHUA, T.; SUKYAI, P. Characterization of Cellulose Nanocrystals Extracted from Sugarcane Bagasse for Potential Biomedical Materials. **Sugar Tech**, v. 19, n. 5, p. 539–552, 7 out. 2017.

LARSEN, J.; HAVEN, M.Ø; THIRUP, L. Inbicon makes lignocellulosic ethanol a commercial reality. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 36–45, 2012.

LARSEN, J.; ØTERGAARD PETERSEN, M.; THIRUP, L.; LI, H. W.; IVERSEN, F. K. The IBUS process - Lignocellulosic bioethanol close to a commercial reality. **Chemical Engineering and Technology**, v. 31, n. 5, p. 765–772, 2008.

LEÃO, R. M.; MILÉO, P. C.; MAIA, J. M. L. L.; LUZ, S. M. Environmental and technical feasibility of cellulose nanocrystal manufacturing from sugarcane bagasse. **Carbohydrate Polymers**, v. 175, p. 518–529, nov. 2017.

LEISTRITZ, F. L.; SENECHAL, D. M.; STOWERS, M. D.; MCDONALD, W. F.; SAFFRON, C. M.; HODUR, N. M. Preliminary feasibility analysis for an integrated

biomaterials and ethanol biorefinery using wheat straw feedstock. **Agribusiness Applied Economics Report**, n. 590, p. 48, 2006.

LI, B.; XU, W.; KRONLUND, D.; MÄÄTTÄNEN, A.; LIU, J.; SMÅTT, J.; PELTONEN, J.; WILLFÖR, S.; MU, X.; XU, C. Cellulose nanocrystals prepared via formic acid hydrolysis followed by TEMPO-mediated oxidation. **Carbohydrate Polymers**, v. 133, p. 605–612, 2015.

LI, J.; GELLERSTEDT, G.; TOVEN, K. Steam explosion lignins; their extraction, structure and potential as feedstock for biodiesel and chemicals. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 9, p. 2556–2561, 2009..

LI, J.; HENRIKSSON, G.; GELLERSTEDT, G. Lignin depolymerization/repolymerization and its critical role for delignification of aspen wood by steam explosion. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 16, p. 3061–3068, 2007.

LI, J.; WEI, X.; WANG, Q.; CHEN, J.; CHANG, G.; KONG, L.; SU, J.; LIU, Y. Homogeneous isolation of nanocellulose from sugarcane bagasse by high pressure homogenization. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 4, p. 1609–1613, 2012.

LI, L.; LEE, S.; LEE, H. L.; YOUN, H. J. Hydrogen peroxide bleaching of hardwood kraft pulp with adsorbed birch xylan and its effect on paper properties. **BioResources**, v. 6, n. 1, p. 721–736, 2011.

LIN, N.; DUFRESNE, A. Nanocellulose in biomedicine: Current status and future prospect. **European Polymer Journal**, v. 59, p. 302–325, 2014.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 4, p. 739–739, 2002.

MANDAL, A.; CHAKRABARTY, D. Isolation of nanocellulose from waste sugarcane bagasse (SCB) and its characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 3, p. 1291–1299, 2011.

MARTELLI-TOSI, M.; TORRICILLAS, M. D. S.; MARTINS, M. A.; ASSIS, O. B. G. De; TAPIA-BLÁCIDO, D. R. Using Commercial Enzymes to Produce Cellulose Nanofibers from Soybean Straw. **Journal of Nanomaterials**, v. 2016, 2016.

McMILLAN, J. D.; JENNINGS, E. W.; MOHAGHEGHI, A.; ZUCCARELLO, M. Comparative performance of precommercial cellulases hydrolyzing pretreated corn stover. p. 1–17, 2011.

MEYER, A. S.; ROSGAARD, L.; SØRENSEN, H. R. The minimal enzyme cocktail concept for biomass processing. **Journal of Cereal Science**, v. 50, n. 3, p. 337–344, 2009.

MODENBACH, A. A.; NOKES, S. E. Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings - A review. **Biomass and Bioenergy**, v. 56, p. 526–544, 2013.

MOHANRAM, S.; AMAT, D.; CHOUDHARY, J.; ARORA, A.; NAIN, L. Novel perspectives for evolving enzyme cocktails for lignocellulose hydrolysis in biorefineries. **Sustainable Chemical Processes**, v. 1, n. 1, p. 15, 2013.

MOK, Y. K.; ARANTES, V.; SADDLER, J. N. A NaBH<inf>4</inf> Coupled Ninhydrin-Based Assay for the Quantification of Protein/Enzymes During the Enzymatic Hydrolysis of Pretreated Lignocellulosic Biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 176,

n. 6, p. 1564–1580, 2015.

MOON, R. J.; MARTINI, A.; NAIRN, J.; SIMONSEN, J.; YOUNGBLOOD, J. Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 7, p. 3941, jul. 2011.

MOONEY, C. A.; MANSFIELD, S. D.; TOUHY, M. G.; SADDLER, J. N. The effect of initial pore volume and lignin content on the enzymatic hydrolysis of softwoods. **Bioresource Technology**, v. 64, n. 2, p. 113–119, maio 1998.

MORALES, L. O.; IAKOVLEV, M.; MARTIN-SAMPEDRO, R.; RAHIKAINEN, J. L.; LAINE, J.; VAN HEININGEN, A.; ROJAS, O. J. Effects of residual lignin and heteropolysaccharides on the bioconversion of softwood lignocellulose nanofibrils obtained by SO2-ethanol-water fractionation. **Bioresource Technology**, v. 161, p. 55–62, jun. 2014.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass**. Bioresource technology,** v. 96, n. 6, p. 673-686, 2005**.**

NASCIMENTO, V. M.; NAKANISHI, S. C.; ROCHA, G. J. M.; RABELO, S. C.; PIMENTA, M. T. B.; ROSSELL, C. E. V. Effect of anthraquinone on alkaline pretreatment and enzymatic kinetics of sugarcane bagasse saccharification: Laboratory and pilot scale approach. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 4, n. 7, p. 3609–3617, 2016.

NEWMAN, R. H.; HEMMINGSON, J. A. Determination of the Degree of Cellulose Crystallinity in Wood by Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. **Holzforschung**, v. 44, n. 5, p. 351–356, 1990.

NISHIYAMA, Y.; JOHNSON, G. P.; FRENCH, A. D. Diffraction from nonperiodic models of cellulose crystals. **Cellulose**, v. 19, n. 2, p. 319–336, 2012.

NOGUEIRA, L.; SEABRA, J.; BEST, G.; LEAL, M.; POPPE, M. Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável. **Rio de Janeiro, BNDES⁄CGEE**, 2008.

NOVOZYMES. 2010 Disponível em <http://bioenergy.novozymes.com/en/cellulosic-ethanol/CellicCTec3/Documents/AS_2010-01668-03.pdf> acesso em 20 de abril de 2016

OKSMAN, K.; ETANG, J. A.; MATHEW, A. P.; JONOOBI, M. Cellulose nanowhiskers separated from a bio-residue from wood bioethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 1, p. 146–152, 2010.

OLIVEIRA, F. M. V.; PINHEIRO, I. O.; SOUTO-MAIOR, A. M.; MARTIN, C.; GONÇALVES, A. R.; ROCHA, G. J. M. Industrial-scale steam explosion pretreatment of sugarcane straw for enzymatic hydrolysis of cellulose for production of second generation ethanol and value-added products. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 168–173, 2013.

OLIVEIRA, F. B. de; BRAS, J.; PIMENTA, M. T. B.; CURVELO, A. A. da S.; BELGACEM, M. N. Production of cellulose nanocrystals from sugarcane bagasse fibers and pith. **Industrial Crops and Products**, v. 93, p. 48–57, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.04.064>.

PÄÄKKO, M.; ANKERFORS, M.; KOSONEN, H.; NYKÄNEN, A.; AHOLA, S.; ÖSTERBERG, M.; RUOKOLAINEN, J.; LAINE, J.; LARSSON, P. T.; IKKALA, O.;

LINDSTRÖM, T. Enzymatic hydrolysis combined with mechanical shearing and high-pressure homogenization for nanoscale cellulose fibrils and strong gels. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 6, p. 1934–1941, 2007.

PANG, C.; XIE, T.; LIN, L.; ZHUANG, J.; LIU, Y.; SHI, J.; YANG, Q. Changes of the surface structure of corn stalk in the cooking process with active oxygen and MgO-based solid alkali as a pretreatment of its biomass conversion. **Bioresource Technology**, v. 103, n. 1, p. 432–439, 2012.

PETERSEN, A. M.; ANEKE, M. C.; GÖRGENS, J. F. Techno-economic comparison of ethanol and electricity coproduction schemes from sugarcane residues at existing sugar mills in Southern Africa. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 105, 2014.

QIU, J.; MA, L.; SHEN, F.; YANG, G.; ZHANG, Y.; DENG, S.; ZHANG, J.; ZENG, Y.; HU, Y. Pretreating wheat straw by phosphoric acid plus hydrogen peroxide for enzymatic saccharification and ethanol production at high solid loading. **Bioresource Technology**, v. 238, p. 174–181, 2017.

REBOUILLAT, S.; PLA, F. State of the Art Manufacturing and Engineering of Nanocellulose: A Review of Available Data and Industrial Applications. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 4, n. 2, p. 165–188, 2013.

REN21- Renewables 2016 Global Status Report. Disponível em: <http://www.ren21.net/>. Acesso em: 25/10/201

ROBL, D.; DOS SANTOS COSTA, P.; RABELO, S. C.; DA SILVA DELABONA, P.; DA SILVA LIMA, D. J.; PADILLA, G.; DA CRUZ PRADELLA, J. G. Use of Ascomycete Extracts in Enzymatic Cocktail Formulations Increases Sugar Cane Bagasse Hydrolysis. **Bioenergy Research**, v. 9, n. 2, p. 559–565, 2016.

ROCHA, G. J. de M.; NASCIMENTO, V. M.; GONÇALVES, A. R.; SILVA, V. F. N.; MARTÍN, C. Influence of mixed sugarcane bagasse samples evaluated by elemental and physical-chemical composition. **Industrial Crops and Products**, v. 64, p. 52–58, 2015.

ROCHA, G. J. M.; GONÇALVES, A. R.; OLIVEIRA, B. R.; OLIVARES, E. G.; ROSSELL, C. E. V. Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 35, n. 1, p. 274–279, jan. 2012a.

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

ROCHA, G. J. M.; NASCIMENTO, V. M.; SILVA, V. F. N. da; CORSO, D. L. S.; GONÇALVES, A. R. Contributing to the environmental sustainability of the second generation ethanol production: Delignification of sugarcane bagasse with sodium hydroxide recycling. **Industrial Crops and Products**, v. 59, p. 63–68, ago. 2014.

SAELEE, K.; YINGKAMHAENG, N.; NIMCHUA, T.; SUKYAI, P. An environmentally friendly xylanase-assisted pretreatment for cellulose nanofibrils isolation from sugarcane bagasse by high-pressure homogenization. **Industrial Crops & Products**, v. 82, p. 149–160, 2016.

SAITO, T.; HIROTA, M.; TAMURA, N.; KIMURA, S.; FUKUZUMI, H.; HEUX, L.;

ISOGAI, A. Individualization of nano-sized plant cellulose fibrils by direct surface carboxylation using TEMPO catalyst under neutral conditions. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 7, p. 1992-1996, 2009.

SALAS, C.; NYPELÖ, T.; RODRIGUEZ-ABREU, C.; CARRILLO, C.; ROJAS, O. J. Nanocellulose properties and applications in colloids and interfaces. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 19, n. 5, p. 383–396, 2014.

SANT'ANA DA SILVA, A.; FERNANDES DE SOUZA, M.; BALLESTEROS, I.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, M.; P. S. BON, E. High-solids content enzymatic hydrolysis of hydrothermally pretreated sugarcane bagasse using a laboratory-made enzyme blend and commercial preparations. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 10, p. 1561–1567, out. 2016.

SANTUCCI, B. S.; BRAS, J.; BELGACEM, M. N.; CURVELO, A. A. da S.; PIMENTA, M. T. B. Evaluation of the effects of chemical composition and refining treatments on the properties of nanofibrillated cellulose films from sugarcane bagasse. **Industrial Crops and Products**, v. 91, p. 238–248, nov. 2016.

SCHILD, G.; SIXTA, H.; TESTOVA, L. Multifunctional Alkaline Pulping , Delignification and Hemicellulose Extraction. **Cellulose Chemistry and Technology**, v. 44, n. 1–3, p. 35–45, 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**, 1959.

SHATKIN, J. O. A.; WEGNER, T. H.; BILEK, E. M. T. E. D. Market projections of cellulose nanomaterial-enabled products − Part 1: Applications. v. 13, n. 5, p. 9–16, 2014.

SIQUEIRA, G.; NARDI, R. & ARANTES, V. Comparative analysis of commercial cellulases cocktails for the production of nanocrystalline cellulose. 3rd Latin American Congress on Biorefineries: Science Technology and Innovation for the Bioeconomy.Concepción/Chile. November 23-25. **Abstract Book**, pg. 106-107. 2015.

SIQUEIRA, G.; ARANTES, V. Nanocelluloses from Lignocellulosic Biomass. In. Valorization of Lignocellulosic Biomass in a Biorefinery: From Logistics to Environmental and Performance. **Nova Scien ed**. 2016

SIRÓ, I.; PLACKETT, D. Microfibrillated cellulose and new nanocomposite materials: a review. **Cellulose**, v. 17, n. 3, p. 459-494, 2010.

SIXTA, H. (Ed.). **Handbook of pulp**.Weinheim, Germany.Wiley-vch, 2006.

SJÖSTRÖM, E. **Wood Chemistry - Fundamentals and Applications**. Elsevier, 1993.

SLAVUTSKY, A. M.; BERTUZZI, M. A. Water barrier properties of starch films reinforced with cellulose nanocrystals obtained from sugarcane bagasse. **Carbohydrate Polymers**, v. 110, p. 53–61, 2014.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. Golden, Colorado: National Renewable Energy Laboratory; **Report N. TP-510-42618**, 17 p., 2012

SONG, Q.; WINTER, W. T.; BUJANOVIC, B. M.; AMIDON, T. E. Nanofibrillated Cellulose (NFC): A High-Value Co-Product that Improves the Economics of Cellulosic

Ethanol Production. p. 607–618, 2014.

STRASSBERGER, Z.; TANASE, S.; ROTHENBERG, G. The pros and cons of lignin valorisation in an integrated biorefinery. **RSC Adv.**, v. 4, n. 48, p. 25310–25318, 2014.

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

TEIXEIRA, E. de M.; BONDANCIA, T. J.; TEODORO, K. B. R.; CORRÊA, A. C.; MARCONCINI, J. M.; MATTOSO, L. H. C. Sugarcane bagasse whiskers: Extraction and characterizations. **Industrial Crops and Products**, v. 33, n. 1, p. 63–66, 2011.

TEIXEIRA, R. S. S.; DA SILVA, A. S. A.; JANG, J. H.; KIM, H. W.; ISHIKAWA, K.; ENDO, T.; LEE, S. H.; BON, E. P. S. Combining biomass wet disk milling and endoglucanase/β-glucosidase hydrolysis for the production of cellulose nanocrystals. **Carbohydrate Polymers**, v. 128, p. 75–81, 2015.

THOMAS, L. H.; FORSYTH, V. T.; STURCOVA, A.; KENNEDY, C. J.; MAY, R. P.; ALTANER, C. M.; APPERLEY, D. C.; WESS, T. J.; JARVIS, M. C. Structure of Cellulose Microfibrils in Primary Cell Walls from Collenchyma. **Plant Physiology**, v. 161, n. 1, p. 465–476, 2013.

TIAN, D.; CHANDRA, R. P.; LEE, J.-S.; LU, C.; SADDLER, J. N. A comparison of various lignin-extraction methods to enhance the accessibility and ease of enzymatic hydrolysis of the cellulosic component of steam-pretreated poplar. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 157, 2017.

TSUKAMOTO, J.; DURÁN, N.; TASIC, L. Nanocellulose and bioethanol production from orange waste using isolated microorganisms. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, n. 9, p. 1537–1543, 2013.

WALKER C.. Thinking small is leading to big changes. **Paper 360°-TAPPI**, v. 7, n1, p.8-13, 2012.

WANG, Q. Q.; ZHU, J. Y.; GLEISNER, R.; KUSTER, T. A.; BAXA, U.; MCNEIL, S. E. Morphological development of cellulose fibrils of a bleached eucalyptus pulp by mechanical fibrillation. **Cellulose**, v. 19, n. 5, p. 1631–1643, 2012a.

WANG, Q. Q.; ZHU, J. Y.; REINER, R. S.; VERRILL, S. P.; BAXA, U.; MCNEIL, S. E. Approaching zero cellulose loss in cellulose nanocrystal (CNC) production : recovery and characterization of cellulosic solid residues (CSR) and CNC. p. 2033–2047, 2012b.

WANG, Q.; ZHU, J. Y.; CONSIDINE, J. M. Strong and Optically Transparent Films Prepared Using Cellulosic Solid Residue Recovered from Cellulose Nanocrystals Production Waste Stream. 2013.

WANG, R.; CHEN, L.; ZHU, J. Y.; YANG, R. Tailored and Integrated Production of Carboxylated Cellulose Nanocrystals (CNC) with Nanofibrils (CNF) through Maleic Acid Hydrolysis. **ChemNanoMat**, v. 3, n. 5, p. 328–335, 2017.

WANG, S.; CHENG, Q. A novel process to isolate fibrils from cellulose fibers by high-intensity ultrasonication, Part 1: Process optimization. **Journal of applied polymer science**, v. 113, n. 2, p. 1270-1275, 2009.

WANG, W.; MOZUCH, M. D.; SABO, R. C.; KERSTEN, P.; ZHU, J. Y.; JIN, Y.

Production of cellulose nanofibrils from bleached eucalyptus fibers by hyperthermostable endoglucanase treatment and subsequent microfluidization. **Cellulose**, v. 22, n. 1, p. 351–361, 2015.

XIE, T.; LIN, L.; PANG, C.; ZHUANG, J.; SHI, J.; YANG, Q. Efficient enzymatic hydrolysis of the bagasse pulp prepared with active oxygen and MgO-based solid alkali. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 2, p. 807–813, 2013.

ZERONIAN, S. H.; INGLESBY, M. K. Bleaching of cellulose by hydrogen peroxide. **Cellulose**, v. 2, n. 4, p. 265–272, 1995.

ZHANG, K.; SUN, P.; LIU, H.; SHANG, S.; SONG, J.; WANG, D. Extraction and comparison of carboxylated cellulose nanocrystals from bleached sugarcane bagasse pulp using two different oxidation methods. **Carbohydrate Polymers**, v. 138, p. 237–243, 2016.

ZHAO, H. P.; FENG, X. Q.; GAO, H. Ultrasonic technique for extracting nanofibers from nature materials. **Applied Physics Letters**, v. 90, n. 7, p. 1–3, 2007.

ZHU, J. Y.; PAN, X. J. Woody biomass pretreatment for cellulosic ethanol production: Technology and energy consumption evaluation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4992–5002, 2010.

ZHU, J. Y.; SABO, R.; LUO, X. Integrated production of nano-fibrillated cellulose and cellulosic biofuel (ethanol) by enzymatic fractionation of wood fibers. **Green Chemistry**, v. 13, n. 5, p. 1339, 2011.