UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Escola de Engenharia de Lorena - EEL

PRISCILA MAZIERO

**ESTUDOS TOPOQUÍMICOS DURANTE
OBTENÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE CELULOSE
DE BAGAÇO E PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR**

LORENA- SP
2013

PRISCILA MAZIERO

**ESTUDOS TOPOQUÍMICOS DURANTE OBTENÇÃO
DE ETANOL A PARTIR DE CELULOSE DE BAGAÇO E
PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR**

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

Orientador: Prof. Dr. Adilson Roberto Gonçalves

Co-orientador: Prof. Dr. Igor Polikarpov

Versão Original

Lorena, 2013

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

Catalogação na Publicação

Biblioteca “Cel. Luiz Sylvio Teixeira Leite”

Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Maziero, Priscila

Estudos topoquímicos durante obtenção de etanol a partir de celulose de bagaço e palha de cana-de-açúcar / Priscila Maziero. – 2013.

180 p. : il.

Tese (Doutora 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. 2013.

Orientador: Adilson Roberto Gonçalves

Co-orientador: Igor Polikarpov

1. Cana-de-açúcar 2. Hidrólise enzimática 3. Pré-tratamento hidrotérmico 4. Deslignificação alcalina 5. Parede celular 6. Caracterização I. Título. II. Gonçalves, Adilson Roberto, orient. III. Polikarpov, Igor, co-orient.

662.636 - CDU

Dedico esta tese de doutorado à minha mãe Sonia Regina Maziero e ao meu pai Alcides Antonio Maziero pelo amor incondicional, carinho e apoio na realização desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus e Nossa Senhora Aparecida por toda iluminação, intercessão e pela oportunidade de realizar este trabalho.

Aos meus pais Sonia e Alcides Maziero, os quais dedico integralmente esta tese, pelo esforço ao longo da vida para me propiciar estudo, por todo incentivo, motivação, participação, carinho e amor. Pai e Mãe vocês são meus exemplos de vida!

Ao meu “pai científico” e orientador Prof. Dr. Adilson Roberto Gonçalves, e Prof. Dr. George Jackson de Moraes Rocha pela orientação, aprendizado compartilhado, paciência e principalmente pela amizade. Obrigado professores, vocês sempre estiveram presentes na minha vida profissional e me deram oportunidades desde a iniciação científica até, e não finalmente, o doutorado. Além da amizade, conversas e conselhos que sempre serão lembrados em todas as minhas decisões.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Igor Polikarpov pelas discussões de resultados e disponibilidade dos recursos de seu laboratório no Instituto de Física de São Carlos.

Ao Prof. Dr. Peter Fratzl e Dra. Michaela Eder pela supervisão, colaboração e disponibilidade das instalações de microscopias e saxs do Max –Planck Institute Colloids and Interfaces-Potsdam Alemanha.

A FAPESP (Fundação de amparo a pesquisa) e ao DAAD (Deutscher Akademischer Austausch Dienst) pela concessão da bolsa de doutorado direto e auxílio financeiro para realização desta pesquisa.

Aos técnicos do laboratório Jussara Salet da Silva e Cibele Rosa pelas análises, auxílios e amizade. E em especial ao José Carlos Tavares, o Zé Cobrinha, por todo aprendizado, auxílio e participação na execução dos experimentos de pré-tratamento e principalmente pela grande amizade, carinho, conselhos e risadas ao longo destes anos.

Ao Rafael Garcia Cândido, meu grande amigo-irmão o qual estará sempre comigo e as minhas grandes amigas Patrícia Camara Mileo e Naila Ribeiro Mori. Por todo auxílio, discussões, risadas, companheirismo e “socorros” de última hora. Conhece-los sem dúvida foi um grande presente que a academia me proporcionou.

A todos os membros do GCBM, pela convivência, paciência e principalmente ótimos momentos compartilhados, sem dúvida, são pessoas memoráveis.

Ao Mario de Oliveira Neto e outras pessoas que fizeram parte da minha vida e me proporcionaram experiências incríveis e que de alguma forma, tornaram-se especiais e contribuíram para a conclusão deste trabalho.

“Nos campos da observação, o acaso favorece apenas as mentes preparadas”.

Louis Pasteur

RESUMO

MAZIERO, P. Estudos topoquímicos durante obtenção de etanol a partir de celulose de bagaço e palha de cana-de-açúcar. 2013. Tese (Doutorado em Ciências)- Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2013.

As tecnologias de conversão de biomassa para produção de biocombustíveis são principalmente desenvolvidas de forma empírica, baseadas na compreensão das suas propriedades biológicas e químicas. Muitos estudos de variações de parâmetros de processo são realizados, porém todos encontram dificuldades na compreensão do que ocorre com o material lignocelulósico durante as reações. Neste contexto, os estudos topoquímicos tornam-se uma ferramenta de fundamental importância para elucidar estes mecanismos. Este trabalho tem por objetivo avaliar diferentes condições de pré-tratamento hidrotérmico seguida de deslignificação alcalina de bagaço e palha de cana de açúcar. E, a partir de uma condição otimizada, compreender, o que ocorre com a parede celular vegetal durante estes processos de modificação. O bagaço e a palha de cana apresentaram comportamentos distintos ao final do seu processamento. Observou-se uma maior mudança morfológica do bagaço comparado à palha, a qual apresentou exposição das fibras, porém ainda agregadas. Tal fato pode ser explicado pela menor remoção de lignina e hemicelulose desta biomassa quando comparada as mesmas condições de processamento do bagaço. Este fator contribuiu para uma maior digestibilidade da celulose de bagaço, devido a uma área maior de contato da enzima com o substrato e minimização da interferência de inibidores, como a lignina. As condições de pré-tratamento mais promissoras para o bagaço e a palha foram a 180°C por 20 e 30 min. respectivamente, mostrando que a palha necessita de tratamentos mais prolongados para obter uma maior digestibilidade no processo de hidrólise enzimática. A condição otimizada para o bagaço de cana foi utilizada para caracterização das mudanças que ocorrem nas células de parênquima e feixes vasculares do colmo da cana, em diferentes regiões de crescimento, após o seu processamento. Os resultados mostraram uma variação de tamanho das células em função do crescimento da planta sendo a diferença entre medula e casca mais pronunciada para a região do topo da cana, onde observou-se 60% de diferença no tamanho das células de parênquima. Além disso, observou-se que após processamento estas células e os feixes vasculares perderam sua conformação estrutural e tornaram-se mais frágeis, após secagem, evidenciando a significativa remoção dos componentes estruturais. Os dados de microscopia Raman revelaram que a lignina das células de parênquima foi totalmente removida após a deslignificação, diferentemente do que ocorreu com os feixes vasculares, os quais apresentaram lignina principalmente localizada nos cantos das células. Em relação à orientação de celulose foi possível determinar que a parte inicial do colmo da cana apresenta duas direções preferenciais de orientação, sendo uma paralela e outra perpendicular ao eixo de crescimento da planta, que podem estar associadas à fase de maturação da cana que se apresenta incompleta, uma vez que a parte intermediária e topo da cana apresentam apenas uma direção preferencial evidenciando que a contribuição da camada S1 é proeminente, sendo a camada secundária S2 ainda não depositada. Outro indicativo de maturação incompleta pode ser associado à porosidade do parênquima e feixes vasculares, os quais apresentam o topo da cana mais poroso, que indica um processo de lignificação incompleto. Os resultados revelam que o processo de pré-tratamento contribui para um aumento de até 54% na porosidade, sendo este tratamento o mais impactante nesta variável, uma vez que o processo de deslignificação não alterou significativamente a porosidade das células.

Palavras-Chave: Bagaço e Palha de cana-de-açúcar, Pré-tratamento hidrotérmico, Deslignificação Alcalina, Hidrólise Enzimática, Parede celular, Caracterização.

ABSTRACT

MAZIERO, P. Topochemical studies applied to ethanol production from bagasse and straw sugarcane. 2013. Thesis (Doctor of Science)- Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2013.

Studies of fuels from renewable sources are a topic of fundamental importance. Taking into account, the production of ethanol from biomass, such as bagasse and straw sugarcane, offers benefits to sustainable production and energy security. Biomass conversion technologies are mainly developed empirically, based on chemical and biological properties of biomass and many studies include variations of parameters of process. But there are difficulties to understand the changes of the lignocellulosic material during reactions. In this context, topochemical studies are a tool of significant importance to elucidate these characteristics. This study aims to evaluate different conditions of hydrothermal pretreatment followed by a fixed condition of alkaline delignification of straw and bagasse sugarcane. Additionally, this work deals the evaluation of plant cell wall modification during hydrothermal pretreatment an alkaline delignification in the optimized condition, considering the best cellulose digestibility at enzymatic hydrolysis process of bagasse. Results reveal a different behavior of bagasse and straw from sugarcane at the end of its processing. There was a greater morphological change of sugarcane bagasse compared to straw, which presented exposure of the fibers, but also aggregated. This fact can be explained by less removal of lignin and hemicellulose of this biomass compared to the same processing conditions of bagasse. The exposure of fibers contributed to increase the cellulose of bagasse digestibility, since there was a greater area of contact of the enzyme with the substrate and a minimization of interference from inhibitors, such as lignin. The conditions of pretreatment most promising for bagasse and straw sugarcane were 180°C for 20 and 30 min. respectively, showing that the straw requires longer treatments to reach a higher digestibility in the enzymatic hydrolysis process. The optimal condition for the sugarcane bagasse was used to characterize the changes in parenchyma cells and vascular bundles from stalk of sugarcane at different growth regions, after its processing. The results showed a variation of cell size depending on growth of the plant. The top of sugarcane stalk presented the more pronounced difference between parenchyma cells from pith and rind region. Furthermore, it was observed that after processing these cells and vascular bundles lost its structural conformation and become more fragile after drying. This result indicated the significant removal of the structural components for all growth region of sugarcane stalk analyzed. Differently from vascular bundles, which presented lignin mainly located in the cell corners, the lignin from parenchyma cells was completely removed after delignification. Regarding the orientation of cellulose, determined by SAXS and Raman microscopy, the parenchyma cells from initial part of stalk presented two preferential directions of orientation, one parallel and other perpendicular to the axis of plant growth. This feature may be associated with maturation phase of sugarcane which appears incomplete, since the middle and top part of the stalk showed only one preferred direction, indicating that the contribution of the layer S_1 is prominent, and the S_2 layer is not deposited. Another indication of incomplete maturation process may be associated with porosity of parenchyma and vascular bundles, which have the top of the cane more porous that indicates an incomplete lignification process. The results showed that the pretreatment can be considered the most important treatment which affects this variable, since promotes an increase of up to 54% in porosity, differently of alkaline delignification process which no presented significant changes in the porosity of the cells.

Keywords: Bagasse and Straw sugarcane, Hydrothermal pretreatment, Alkaline Delignification, Enzymatic Hydrolysis, Cell wall, Characterization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Média histórica dos preços de combustíveis fósseis de 1950 a 2008 (SHAFIEE; TOPAL, 2010).....	25
Figura 2 -	Projeções de produção de etanol (EPE, 2008).....	26
Figura 3 -	Representação esquemática da morfologia da cana-de-açúcar (GRASSES, 2012) e microscopia de luz evidenciando as características morfológicas do nó e entre-nó.....	28
Figura 4 -	Disposição anatômica dos diferentes tecidos vegetais (obtida por microscopia ótica) e nomenclatura estabelecida por VAN DILLEWIJN, 1951.....	29
Figura 5 -	Estrutura morfológica da parede celular vegetal (figura adaptada de STICKLEN, 2008).....	30
Figura 6 -	Representação esquemática da disposição dos componentes lignocelulósicos na parede celular vegetal (adaptado de STICKLEN, 2008).....	31
Figura 7 -	Composição e distribuição da molécula de celulose na parede celular (Chemical engineering, 2012).....	32
Figura 8 -	Representação esquemática de uma xilana de gramínea mostrando alguns grupos substituintes. Xyl = D-xilopiranoose; Ara = L-arabinofuranose; (4-Me)-GlcA = ácido (4-O-metil)-D-glicopiranurônico; Ac = acetil; FA = ácido ferúlico; DDFA = ácido desidroferúlico (McDOUGALL et al., 1993).....	33
Figura 9 -	Esquema estrutural de lignina (adaptado de Plant, 2012).....	34
Figura 10 -	Representação esquemática de aproveitamento integral da cana-de-açúcar.....	35
Figura 11 -	Fluxo de um possível processo de obtenção de bioetanol (adaptado de GRAF, OREGON, 2000).....	36
Figura 12 -	Efeito do pré-tratamento em materiais lignocelulósicos (adaptado de MOSIER et al., 2005a).....	37
Figura 13 -	Representação esquemática da conformação das celulasas (adaptado de PAULO, 1995).....	41
Figura 14 -	Sistema celulolítico de <i>Trichoderma reesei</i> (MURAD; AZZAZ, 2010 apud MALHERB; CLOETE, 2003).....	43

Figura 15 -	Métodos de análises para caracterização de biomassa em diferentes escalas (TETARD et.al.2010).....	44
Figura 16 -	Gráfico de $\ln(I) \times q^2$, utilizado para cálculo de raio de giro (Rg) de macromoléculas.....	48
Figura 17 -	Exemplos de estruturas fractais.....	49
Figura 18 -	Descrição do comportamento de ligninas. Composta de um sistema polidisperso as ligninas apresentam partículas coloidais e agregados fractais em solução.....	50
Figura 19 -	Visualização dos padrões tridimensionais de SAXS esperados para medidas de fibrilas. (a) Espalhamento em forma de disco de uma fibrila de celulose (cilindro preto) orientada ao longo da direção na camada S ₂ . (b) Espalhamento da superposição de muitas fibrilas de celulose (pequenos cilindros pretos) perpendiculares a direção vertical que estão presentes em S ₁ . (c) Superposição dos padrões de espalhamento (a) e (b). A letra Q indica o plano correspondente a seção de corte e R ou T o plano correspondente respectivamente às seções radial e tangencial. (d) Padrão de SAXS de uma seção radial de Picea abies, “earlywood” num detector bidimensional, a uma distância de 1 m. (e) O mesmo para seção de corte da amostra.....	53
Figura 20 -	Reator REG MED modelo AU/E-20 utilizado para os testes de pré-tratamento hidrotérmico de bagaço e palha de cana-de-açúcar.....	61
Figura 21 -	Rampas de aquecimento e resfriamento para as diferentes condições de reação de pré-tratamento hidrotérmico (a) bagaço, (b) palha de cana-de-açúcar.....	62
Figura 22 -	(a) Laboratório Nacional de Luz Sincrotron, (b) linha de SAXS utilizada para coleta de dados de ligninas em solução.....	69
Figura 23 -	Representação esquemática da modificação dos componentes lignocelulósicos na etapa de pré-tratamento. (1) Remoção de componentes lignocelulósicos amorfos: hemicelulose e lignina). (2) Remoção de celulose amorfa.....	72
Figura 24 -	a) Microscópio FEI FE-ESEM, Quanta 600, eletrônico de varredura e ambiental (MEV e MEV-ambiental), (b) amostras fixas no porta amostra, (c) Porta amostra e fitas de carbono.....	73
Figura 25 -	Representação esquemática das regiões de crescimento do colmo da cana.....	75
Figura 26 -	Microscopia ótica do corte longitudinal do entre-nó da região do topo da cana (a) aumento de 3X (b) aumento de 12x.....	77
Figura 27 -	Seção transversal do colmo da cana, na região do topo, obtido por microscopia ótica.....	77

Figura 28 -	Reator utilizado no pré-tratamento e deslignificação das regiões do colmo da cana (a) reatores e controle de temperatura, vista lateral, (b) reator e controle de temperatura, vista superior, (c) partes do reator de aço inoxidável, no exterior, e vidro na parte interior.....	78
Figura 29 -	Seções de corte radiais de três diferentes regiões da cana-de-açúcar, (i) início, (ii) meio e (iii) topo.....	79
Figura 30 -	(a) Perfil de espalhamento bidimensional, somatória radial dos “binnings”, a direção azimutal da integração é indicada pela linha amarela. (b) Representação unidimensional de $I(q)$ vs o ângulo azimutal.....	79
Figura 31 -	MEV-ambiental (a) porta-amostra no interior do microscópio com fluxo de água para controle de temperatura, (b) equipamento, (c) porta amostra, (d) detector GSED.....	80
Figura 32 -	Microscopio Raman.....	82
Figura 33 -	Formação de produtos de desidratação de açúcares em função da severidade do pré-tratamento.....	86
Figura 34-	Mudanças de coloração ocorridas com o material pré-tratado (b) em comparação com o material in natura (a)	88
Figura 35-	Correlação entre fração hemicelulósica solubilizada e o fator de severidade do pré-tratamento hidrotérmico.....	91
Figura 36-	Correlação entre fração de celulose solubilizada e o fator de severidade do pré-tratamento hidrotérmico.....	92
Figura 37-	Correlação entre fração de lignina solubilizada e o fator de severidade do pré-tratamento hidrotérmico.....	93
Figura 38-	Correlações entre severidade, pH e conteúdo de lignina no material pré-tratado	93
Figura 39-	Razão de lignina solúvel/insolúvel em função da severidade do pré-tratamento.....	94
Figura 40-	Difratogramas obtidos para as amostras de bagaço de cana in natura e pré-tratadas hidrotermicamente.....	95
Figura 41-	Correlação entre a perda de cristalinidade da celulose e a severidade do pré-tratamento.....	97
Figura 42-	Microscopias eletrônicas de varredura dos materiais in natura (IN) e pré-tratados nas condições R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9 e R10, evidenciando as modificações nos feixes vasculares (F) e nas células de parênquima (P). Barra de escala em 100 μm	99

Figura 43-	Microscopia eletrônica de varredura da seção transversal do (a) material in natura (IN) e (b) pré-tratado na condição R2. Barra de escala em 100 μm	100
Figura 44-	(a) Curvas TG para o bagaço in natura e pré-tratado em diferentes condições de reação, (b) Curvas de DTG dos materiais in natura e pré-tratados.....	100
Figura 45-	Correlação linear obtida entre a energia de ativação da queima do bagaço e a severidade do pré-tratamento hidrotérmico.....	101
Figura 46-	Mudanças de coloração ocorridas com o material pré-tratado (b), deslignificado (c) em comparação com o material in natura (a).....	102
Figura 47-	Difratogramas das amostras pré-tratadas submetidas à deslignificação alcalina.....	105
Figura 48-	(a) Curvas TG para o bagaço in natura e deslignificado em diferentes condições de reação, (b) Curvas de DTG dos materiais in natura e deslignificados.....	107
Figura 49-	Micrografias do bagaço de cana de açúcar IN e após pré-tratamento hidrotérmico, seguido de deslignificação alcalina. Barra de escala em 100 μm	108
Figura 50-	Gráfico de $\log I(q) \times \log (q)$, mostrando as diferenças de raio de giro e modelagem das diferentes ligninas analisadas por SAXS.....	115
Figura 51-	Correlação da formação dos produtos de degradação de açúcares (ácido acético, furfural e HMF) em função da severidade do pré-tratamento.....	118
Figura 52-	Mudanças morfológicas ocorridas com a palha de cana após o pré-tratamento hidrotérmico.....	118
Figura 53-	Correlação linear entre a solubilização de hemicelulose, reportada como perda de hemicelulose (%) em função da severidade do pré-tratamento.....	121
Figura 54-	Correlação linear entre a solubilização de celulose, reportada como perda de celulose (%) em função da severidade do pré-tratamento.....	121
Figura 55-	Correlação polinomial entre a solubilização de lignina, reportada como perda de lignina (%) em função da severidade do pré-tratamento.....	122
Figura 56-	Difratogramas obtidos para a palha de cana in natura e após o pré-tratamento hidrotérmico evidenciando os picos I_{am} (contribuição amorfa) e I_{002} (contribuição de celulose cristalina).....	123
Figura 57-	Correlação linear estabelecida entre a diminuição da cristalinidade da celulose em função da severidade do pré-tratamento.....	124

Figura 58-	Microscopias da palha de cana in natura e após o pré-tratamento hidrotérmico em diferentes condições. Barra de escala em 100 μm	125
Figura 59-	Difratogramas da palha de cana in natura, deslignificada e pré-tratada seguida de deslignificação alcalina.....	129
Figura 60-	Microscopias da palha de cana in natura (InP), deslignificada (InPD) e após o pré-tratamento hidrotérmico em diferentes condições seguida de deslignificação alcalina(RP). Barra de escala em 100 μm	131
Figura 61-	Comparativo das microscopias de bagaço e palha de cana in natura e após pré-tratamento hidrotérmico na mesma condição de reação a 180C por 50 min. Barra de escala em 100 μm	137
Figura 62-	Comparativo das microscopias de bagaço e palha de cana in natura e após pré-tratamento hidrotérmico na mesma condição de reação a 180C por 50 min., seguido de deslignificação alcalina. Barra de escala em 100 μm	139
Figura 63-	Microscopias dos feixes vasculares ao longo do crescimento, na região da medula e da casca do colmo da cana. À esquerda em condições úmidas e à direita as mesmas células, porém secas. Magnitude 600X (barra de escala de 100 μm).....	142
Figura 64-	Microscopias das células de parênquima ao longo do crescimento, na região da medula e casca do colmo da cana. À esquerda em condições úmidas e à direita as mesmas células, porém secas. Magnitude 600X (barra de escala de 100 μm).....	143
Figura 65-	Microscopias feixes vasculares, após pré-tratamento, ao longo do crescimento, na região da medula e da casca do colmo da cana. À esquerda em condições úmidas e à direita as mesmas células, porém secas. Magnitude 600X (barra de escala de 100 μm).....	145
Figura 66-	Microscopias das células de parênquima, após pré-tratamento, ao longo do crescimento, na região da medula e casca do colmo da cana. À esquerda em condições úmidas e à direita as mesmas células, porém secas. Magnitude 600X (barra de escala de 100 μm).....	146
Figura 67-	Microscopias dos feixes vasculares, após deslignificação, ao longo do crescimento, na região da medula e da casca do colmo da cana. À esquerda em condições úmidas e à direita as mesmas células, porém secas. Magnitude 600X (barra de escala de 100 μm).....	147
Figura 68-	Microscopias das células de parênquima, após deslignificação, ao longo do crescimento, na região da medula e casca do colmo da cana. À esquerda em condições úmidas e à direita as mesmas células, porém secas. Magnitude 600x (barra de escala de 100 μm).....	148
Figura 69-	Imagem gerada a partir do espectro Raman contendo todas as contribuições de carboidratos, lignina e orientação de celulose.....	149

Figura 70-	Imagem gerada a partir da integração do espectro Raman. Em vermelho, integração referente a carboidratos, em amarelo integração referente a orientação de celulose e em verde à lignina.....	149
Figura 71-	Espectros das regiões de crescimento (inicial, intermediária e topo) de amostras não tratadas.....	150
Figura 72-	Espectros das regiões de crescimento de amostras pré- tratadas.....	152
Figura 73-	Espectros das regiões de crescimento de amostras deslignificadas.....	153
Figura 74-	Imagem gerada a partir da integração do espectro Raman. Em vermelho, integração referente a carboidratos, em amarelo integração referente a orientação de celulose e em verde à lignina.....	153
Figura 75-	Imagem gerada a partir do espectro contendo a contribuição dos componentes lignocelulósicos, e separação das diferentes camadas da parede celular.....	154
Figura 76-	Espectros das diferentes camadas da parte inicial do colmo de amostras não tratadas.....	155
Figura 77-	Espectros das diferentes camadas da parte intermediária do colmo de amostras não tratadas.....	156
Figura 78-	Espectros das diferentes camadas da parte do topo do colmo de amostras não tratadas.....	157
Figura 79-	Espectros das diferentes camadas da parte inicial, intermediária e do topo do colmo de amostras pré- tratadas.....	158
Figura 80-	Espectros das diferentes camadas da parte inicial do colmo de amostras deslignificadas.....	159
Figura 81-	Padrões de espalhamento bidimensionais de: parênquima, região inicial, “casca” (a, superior); parênquima, região inicial, “casca” (a, inferior), os padrões de integração azimutais são mostrados respectivamente à direita e em triplicata para as regiões “casca e medula”.....	161
Figura 82-	Padrões de espalhamento bidimensionais da região de: fibras vasculares, região topo, “casca” (a, superior); fibras vasculares, região inicial, “casca” (a, inferior), os padrões de integração azimutais são mostrados respectivamente a direita e em triplicata para as regiões “casca e medula”.....	162
Figura 83-	Variação da porosidade dos feixes vasculares e células do parênquima nas regiões de crescimento inicial, intermediária e topo do colmo da cana.....	163
Figura 84-	Variação da porosidade das células do parênquima nas regiões de crescimento inicial, intermediária e topo do colmo da cana, antes (IN) e após o pré-tratamento hidrotérmico (PT).....	164
Figura 85-	Variação da porosidade dos feixes vasculares nas regiões de crescimento inicial, intermediária e topo do colmo da cana, antes (IN), após o pré-tratamento hidrotérmico (PT) e deslignificação (D).....	164

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Condições de pré-tratamento hidrotérmico de bagaço e palha de cana-de-açúcar.....	61
Tabela 2 -	Descrição das ligninas em solução analisadas por SAXS.....	69
Tabela 3 -	Composição do hidrolisado bruto obtido do pré-tratamento hidrotérmico de bagaço.....	84
Tabela 4 -	Composição do hidrolisado após etapa adicional de hidrólise ácida para completa clivagem dos oligômeros de hemicelulose e celulose.....	85
Tabela 5 -	Diminuição da concentração de açúcares, ácido acético, furfural e HMF. Dados apresentados em porcentagem.....	87
Tabela 6 -	Composição química dos materiais pré-tratados.....	89
Tabela 7 -	Porcentagem de Solubilização dos componentes lignocelulósicos, corrigidas pelo rendimento de reação.....	90
Tabela 8 -	Comparativo de resultados de índice de cristalinidade e cristalinidade absoluta de bagaço de cana in natura e pré-tratado.....	96
Tabela 9 -	Diferenças entre índice de cristalinidade medido e o esperado, para obtenção do parâmetro de diminuição da cristalinidade da celulose.....	96
Tabela 10 -	Parâmetros cinéticos de combustão dos materiais in natura e pré-tratados.....	101
Tabela 11 -	Composição química dos componentes lignocelulósicos de bagaço de cana após deslignificação alcalina	101
Tabela 12 -	Frações lignocelulósicas solubilizadas após deslignificação, corrigidas pelo rendimento.....	104
Tabela 13 -	Diferenças entre índice de cristalinidade medido e o esperado, para obtenção do parâmetro de diminuição da cristalinidade da celulose de bagaço deslignificado.....	106
Tabela 14 -	Parâmetros cinéticos obtidos para as amostras in natura e pré-tratadas ambas submetidas à deslignificação.....	107
Tabela 15 -	Análise global de perdas, considerando o pré-tratamento e a deslignificação alcalina.....	109
Tabela 16 -	Conversão enzimática o bagaço in natura e pré-tratados/deslignificados.....	111

Tabela 17 -	Valores do raio de giro (Rg) das ligninas em solução (em nm).....	113
Tabela 18 -	Análise do coeficiente angular da curva obtida da lei de potencia para caracterização da natureza fractal das ligninas.....	114
Tabela 19 -	Parâmetros de ligninas de bagaço e palha de cana obtida por diferentes métodos de extração.....	115
Tabela 20 -	Caracterização do licor bruto obtido do pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana.....	117
Tabela 21 -	Caracterização química da palha de cana in natura e pré-tratada hidrotérmicamente em diferentes condições de reação.....	119
Tabela 22 -	Solubilização dos componentes lignocelulósicos (%), corrigidas pelo rendimento de reação.....	120
Tabela 23 -	Diminuição da cristalinidade de celulose de palha pré-tratada obtida pela diferença de cristalinidade medida pela cristalinidade esperada.....	123
Tabela 24 -	Composição química da palha submetida à combinação de pré-tratamento seguida de deslignificação.....	127
Tabela 25 -	Porcentagem de solubilização dos componentes lignocelulósicos de palha de cana.....	128
Tabela 26 -	Diminuição da cristalinidade de polpa de palha de cana.....	130
Tabela 27 -	Análise global de perdas dos componentes lignocelulósicos da palha de cana e diminuição da cristalinidade da celulose (dados em %)	132
Tabela 28 -	Digestibilidade de celulose de palha de cana obtida após pré-tratamento e combinação de pré-tratamento e deslignificação.....	133
Tabela 29 -	Comparação dos licores obtidos após pré-tratamento hidrotérmico de bagaço (R1, R2, R3, R4 e R5) e palha (R6P, R7P, R8P, R9P e R10P).....	135
Tabela 30 -	Comparativo de porcentagem de solubilização dos componentes lignocelulósicos de bagaço e palha sob as mesmas condições de pré-tratamento.....	136
Tabela 31 -	Resultados comparativos de solubilização dos componentes lignocelulósicos de bagaço e palha de cana após combinação de pré-tratamento e deslignificação.....	138

Tabela 32 - Conversão enzimática das polpas de bagaço e palha de cana.....	140
Tabela 33 - Diferença no diâmetro dos feixes da região da medula e da casca ao longo do crescimento do colmo da cana.....	142
Tabela 34 - Diferença no diâmetro do parênquima da medula e casca ao longo do crescimento.....	144

LISTA DE SIGLAS

CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
EPE	Empresa de Pesquisa Energética
MEV	Microscopia eletrônica de Varredura
MEV- ambiental	Microscopia Eletrônica de varredura ambiental
TGA	Análise Termogravimétrica
Rg	Raio de giro
SAXS	Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (do inglês: small angle X-ray scattering)
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
TP	Termoporometria
TP-DSC	Termoporometria e calorimetria diferencial
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
GCBM	Grupo de Conversão de Biomassa Vegetal, Modelagem Matemática e Simulação.
CTBE	Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol

Sumário

1. INTRODUÇÃO	23
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
2.1 Petróleo: impactos na segurança energética e sustentabilidade	24
2.2 Cana-de-açúcar: processamento e geração de resíduos agrícolas	26
2.3 Estrutura morfológica e anatômica da cana-de-açúcar	28
2.4 Composição química e morfológica da parede celular da palha e do bagaço de cana-de-açúcar	30
2.4.1 Celulose.....	31
2.4.2 Hemicelulose	32
2.4.3 Lignina	33
2.5 Produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos	34
2.5.1 Pré-tratamento: princípios e considerações.....	36
2.5.1.1 Pré-tratamento hidrotérmico	38
2.5.2 Hidrólise enzimática	41
2.6 Estudos de topoquímica.....	43
2.6.1 Análise termogravimétrica (TGA)	45
2.6.2 Difração de Raios X	46
2.6.3 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)	46
2.6.3.1. Análises das curvas de SAXS -Obtenção do Raio de giro de macromoléculas	47
2.6.3.2 Análise de natureza fractal de macromoléculas polidispersas	48
2.6.3.3 Análises morfológicas da parede celular vegetal.....	51
2.6.3.4 Orientação das fibrilas elementares de celulose	52
2.6.4 Microscopias	54
2.6.4.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	54
2.6.4.2 Microscopia eletrônica de varredura ambiental (MEV-ambiental)	55
2.6.4.3 Microscopia Raman.....	56
2.6.5 Termoporometria.....	58
3. OBJETIVOS.....	60
4. 4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	61
4.1 Pré-tratamento hidrotérmico do bagaço e palha de cana-de-açúcar	61
4.2 Deslignificação alcalina	63
4.3 Rendimento de reação e perdas de componentes macromoleculares	64
4.4 Hidrólise Enzimática	64
4.5 Análises Químicas.....	65
4.5.1 Composição Química do Material Lignocelulósico	65
4.5.2 Determinação de carboidratos e ácidos orgânicos por CLAE	66
4.5.3 Determinação de lignina insolúvel em meio ácido	67
4.5.4 Determinação do teor de cinzas	67
4.5.5 Determinação da lignina solúvel	67

4.5.6 Determinação de furfural e hidroximetilfurfural	68
4.6 Caracterizações espectroscópicas e microscópicas	68
4.6.1 Espalhamento de Raios-X a baixo ângulo (SAXS) para análise de ligninas	68
4.6.2 Difração de raios-X.....	70
4.6.2.1 Interpretação do índice de cristalinidade para materiais lignocelulósicos	71
4.6.3 Microscopia eletrônica de varredura	73
4.6.4 Termogravimetria	74
4.6.4.1 Determinação dos Parâmetros cinéticos da combustão.....	74
4.7 Caracterização do colmo cana-de-açúcar	75
4.7.1 Remoção dos açúcares do colmo da cana-de-açúcar.....	76
4.7.2 Cortes dos entre-nós do colmo da cana para análises e reações.....	76
4.7.3 Pré-tratamento e deslignificação dos entre-nós da cana-de-açúcar	77
4.7.4 Análises de orientação de celulose por SAXS.....	79
4.7.5 Microscopia eletrônica de varredura ambiental (MEV-ambiental)	80
4.7.6 Microscopia Raman.....	81
4.7.7 Termoporometria e sorção	82
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	84
5.1 Bagaço de cana-de-açúcar	84
5.1.1 Análises do Hidrolisado do pré-tratamento hidrotérmico	84
5.1.2 Águas de lavagem.....	87
5.1.3 Composição química do material obtido após o pré-tratamento hidrotérmico	88
5.1.4 Difração de Raios-X do bagaço pré-tratado hidrotérmicamente.....	95
5.1.5 Microscopia eletrônica de varredura do bagaço pré-tratado	98
5.1.6 Análise termogravimétrica.....	100
5.1.7 Composição química do material obtido após deslignificação	102
5.1.8 Difração de Raios-X do material deslignificado	105
5.1.9 Análise termogravimétrica (TGA) do bagaço deslignificado	106
5.1.10 Microscopia eletrônica de varredura do bagaço deslignificado	108
5.1.11 Análise global de solubilização dos componentes lignocelulósicos e diminuição da cristalinidade.....	109
5.1.12 Hidrólise enzimática	111
5.2 SAXS aplicado a líquidos- análise de ligninas.....	112
5.3 Palha de cana-de-açúcar	117
5.3.1 Análises do Hidrolisado do pré-tratamento hidrotérmico	117
5.3.2 Composição química da palha pré-tratada	118
5.3.3 Difração de raios-X da palha pré-tratada	122
5.3.4 Microscopia eletrônica de varredura da palha de cana pré-tratada	124
5.3.5 Deslignificação alcalina da palha de cana	126
5.3.6 Difração de raios-X da celulose de palha de cana deslignificada	129
5.3.7 Microscopia eletrônica de varredura da palha de cana após a deslignificação.....	130
5.3.8 Análise global do processamento da palha de cana	132

5.3.9 Hidrólise enzimática da palha de cana	133
5.4 Análise comparativa do bagaço e palha de cana-de-açúcar para produção de etanol.....	134
5.5 Caracterização do colmo da cana-de-açúcar	141
5.5.1 Microscopia eletrônica de varredura ambiental de cana-de-açúcar	141
5.5.2 Microscopia confocal Raman	148
5.5.3 Análises de SAXS	160
5.5.4 Análises de termoporometria das diferentes regiões do colmo da cana	163
6. CONCLUSÕES.....	166

1. INTRODUÇÃO

Devido ao grande interesse sobre o aquecimento global e à crescente desproporcionalidade entre aumento de procura e diminuição de descoberta de novos poços de petróleo; a busca por fontes de energias renováveis se transforma em um tópico de fundamental importância (de OLIVERIA MED; RYKIEL, 2005). Neste contexto, a importância da biomassa se evidenciou pela utilização de seus derivados como álcool, gás de madeira, biogás e óleos vegetais nos motores de combustão.

Os resíduos lignocelulósicos provenientes da exploração florestal e agrícola constituem a biomassa mais abundante disponível na Terra. No Brasil, a cana-de-açúcar é uma das maiores monoculturas agrícolas, fornecendo uma enorme quantidade de subprodutos, sendo os principais o bagaço e a palha.

Estima-se que durante o processamento da cana são gerados aproximadamente 47 milhões de toneladas de bagaço e palha. A transformação destes resíduos em produtos com maior valor agregado torna-se interessante considerando o baixo custo de matéria-prima e o desenvolvimento sustentável. Vários aspectos se verificam para a transformação desses resíduos em álcool, aumentando a produção de etanol em até 100% com a mesma área agrícola utilizada para a cultura da cana.

A viabilização de obtenção de etanol a partir de biomassa está intimamente relacionada em obter as condições otimizadas de processamento. Muitos estudos de variações de parâmetros de processo vêm sendo realizados, porém todos eles encontram dificuldades na compreensão do que ocorre com o material lignocelulósico durante as reações e condições adotadas. Esta deficiência dificulta a escolha dos parâmetros ideais de processamento.

Os estudos topoquímicos tornam-se neste caso uma ferramenta de grande importância para elucidar estes mecanismos. Com estes estudos é possível monitorar o que ocorre com os materiais e suas interações ao longo de todo o processo, e isto é feito correlacionando-se caracterizações químicas com monitoramento através de técnicas microscópicas e espectroscópicas de análises.

Com base nesses aspectos, este trabalho visa à otimização e comparação de condições de pré-tratamento hidrotérmico, com base nos rendimentos de hidrólise enzimática de bagaço e palha de cana-de-açúcar. E, a partir da condição otimizada caracterizar a parede celular da cana-de-açúcar e suas modificações após o pré-tratamento e deslignificação alcalina dentro do processo de obtenção de etanol celulósico.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Petróleo: impactos na segurança energética e sustentabilidade

O valor do mercado de energia mundial gira em torno de 1,5 trilhões de dólares, e deste montante as fontes de energia de origem fóssil ainda são dominantes (GOLDEMBERG, 2006; WEO, 2009). Porém a continuidade e a predominância do uso de energia fóssil trarão impactos negativos tanto a segurança energética como a questões relacionadas à sustentabilidade.

A demanda de energia em todo o mundo tem aumentado rapidamente devido ao crescimento e a propagação da industrialização. Esse crescimento da demanda levou a degradação ambiental e climática causada pelas emissões de gases do efeito estufa e poluentes (PARK et al, 2010 apud UNFCCC, 2005).

A energia de fonte fóssil é utilizada em sua grande parte como combustível, principalmente no setor de transporte. A queima destes combustíveis é responsável por 73% das emissões de dióxido de carbono (CO₂), um dos principais gases relacionados com o efeito estufa (HOEL; KVERNDOKK, 1996 e WILDENBORG; LOKHRORST, 2005). Segundo dados da International Energy Agency (IEA, 2009), em 14 anos houve um aumento de aproximadamente 54% nas emissões de gases estufas relacionados com o uso de combustíveis fósseis, o que torna o uso destes combustíveis, cada vez mais insustentável.

O petróleo e suas frações representam 90% da energia fóssil utilizada atualmente, sendo os 10% restantes atribuídos ao carvão mineral e gás natural. Além dos impactos negativos relacionados à sustentabilidade, outro agravante no uso do petróleo e suas frações estão relacionados com a segurança energética.

A segurança energética é comumente definida como fornecimento confiável e adequado de energia a preços razoáveis. Este fornecimento confiável e adequado está relacionado com um fornecimento ininterrupto que satisfaça plenamente as necessidades da economia global. A interpretação dos preços razoáveis, em geral, é baseada nos custos e determinada pelo mercado com base em necessidades de abastecimento e demanda.

Uma vez que estes saldos podem oscilar em qualquer direção, as preocupações de segurança também podem estar relacionadas a uma oferta ou demanda insuficiente. Neste contexto, uma crise do petróleo equivale a uma

interrupção no fornecimento em uma escala que é grande o suficiente para afetar significativamente os mercados internacionais do petróleo (BIELECKI, 2002).

Atualmente o interesse em segurança energética tem aumentado significativamente devido as tensões geopolíticas de abastecimento, que provoca uma instabilidade dos preços do petróleo, gás natural e carvão, e, principalmente pela progressiva e significativa elevação do preço dos mesmos, no período até 2008, conforme mostrado na Figura 1. Um dos motivos para a alta dos preços é atribuída diretamente ao esgotamento das reservas petrolíferas (KRUYT et al., 2009), que contribui para uma diminuição da oferta com uma crescente demanda.

Figura 1: Média histórica de preços de combustíveis fósseis de 1950 a 2008 (SHAFIEE; TOPAL, 2010)

Devido aos problemas apresentados pela utilização de combustíveis de fontes não renováveis, há uma necessidade crescente em encontrar alternativas de substituições destes combustíveis principalmente por combustíveis oriundos de fontes renováveis. Dentro deste contexto a utilização da biomassa torna-se interessante por diversas razões, como, redução nas emissões de CO₂, estabilidade energética, viabilidade econômica e benefícios sociais e ambientais (HALL, 1997). Além disso, a bioenergia pode contribuir para o desenvolvimento sustentável da região que a utiliza já que os recursos estão frequentemente disponíveis no próprio local e o investimento de capital para a conversão em energia, é relativamente, baixo (MONIQUE et al., 2003).

Para um país tropical como o Brasil, o substituto natural do petróleo será o etanol. De acordo com Schuchardt; Ribeiro; Gonçalves, (2001), o etanol pode ser utilizado na preparação de diversos compostos petroquímicos (etileno, propileno, buteno e butadieno) através de reações de síntese orgânica.

2.2 Cana-de-açúcar: processamento e geração de resíduos agrícolas

No Brasil o etanol é produzido a partir do processamento da cana-de-açúcar. A produção nacional de cana-de-açúcar destinada à indústria sucroalcooleira, na safra 2012/2013, foi de 595,13 milhões de toneladas, das quais 51,07% (303,93 milhões de toneladas) serão para a fabricação de álcool e 48,93% (291,2 milhões de toneladas) são para a produção de açúcar (CONAB, 2012).

Apesar do constante crescimento da produção de etanol no Brasil, as projeções indicam que a demanda total por este produto (considerando seu uso como combustível, exportações, dentre outros) será maior do que a capacidade de produção (EPE, 2008), conforme demonstrado na Figura 2:

Figura 2: Projeções de produção de etanol (EPE, 2008)

O aumento de produção implica em aumento na geração de resíduos, já que durante o processamento da cana, para obtenção de açúcar e álcool, são gerados materiais como a palha, o bagaço, a vinhaça e águas residuárias. Para cada tonelada de cana produzida são gerados aproximadamente 140 kg de bagaço seco e também 140 kg de palha seca (SEABRA, 2008 e DIAS et al., 2009).

Grande parte desse bagaço é aproveitada como fonte energética dentro da própria usina. Atualmente, estas usinas são autosuficientes em energia e algumas delas possuem o sistema de cogeração (pela qual é possível obter energia elétrica e térmica). Segundo o balanço energético nacional de 2008 (TOMALSQUIM, 2008), a cogeração de energia pela queima do bagaço de cana é responsável por 3,7% da

oferta total de energia elétrica, que corresponde à segunda posição na matriz da eletricidade nacional. . Porém ainda assim, há um excedente de 30% em usinas com caldeiras mais modernas de alta pressão (maior que 20 atm). Assim, um grande volume de bagaço é acumulado nos pátios das usinas, gerando vários problemas, como a disposição do material e o risco de incêndio (DANTAS FILHO, 2009).

Outro resíduo gerado em grande quantidade na colheita é a palha de cana. A palha é um subproduto da cana-de-açúcar e, geralmente, é queimada no campo. Porém, segundo especialistas, a queima da palha da cana-de-açúcar leva para a atmosfera gases tóxicos, como gás carbônico, ozônio, gases de nitrogênio e de enxofre, e material particulado, que contribuem para a poluição ambiental. Além disso, a fuligem que é gerada com essa queimada apresenta substâncias cancerígenas. Frente a este problema, o decreto nº 47.700, regulamentou a Lei nº 11.241, de 19 de setembro de 2002, que dispõe sobre a eliminação gradativa da queima da palha de cana-de-açúcar sendo que até 2021 toda a área mecanizável terá 100% da queima eliminada e até 2031, toda a área não mecanizável terá 100% da queima eliminada.

Dados estatísticos evidenciam que com a erradicação da prática de queima da palha, disponibilizará no meio ambiente um excedente de biomassa que em longo prazo pode provocar outros problemas como mudanças no estoque de carbono no solo. Parte da palha de cana necessariamente deve permanecer nas áreas de plantações, pois é utilizada na prevenção de erosão do solo, porém aproximadamente 60% da palha gerada na colheita devem ser retiradas do campo, para que não haja formação do chamado colchão de palha, que promove em longo prazo infertilidade do solo e aumento do estoque de carbono (adaptado de CERRI, 2009).

Levando-se em conta a necessidade de aumento de produção para suprir a demanda futura de etanol, e a disponibilidade de bagaço e de palha nas usinas sucroalcooleiras, vários grupos de pesquisa procuram desenvolver tecnologias que garantam um aproveitamento racional dessas duas fontes de biomassa para a produção de etanol, visando aumentar a produtividade do setor em até 100%.

Para compreender como o bagaço e a palha podem ser utilizados para produção de etanol, é necessário um conhecimento mais detalhado da cana-de-

açúcar e seus subprodutos sobre características químicas, físicas e morfológicas, as quais serão vistas a seguir.

2.3 Estrutura morfológica e anatômica da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar enquadra-se no grupo botânico das monocotiledôneas, o qual possui uma grande variedade de plantas. Uma das diferenças principais entre monocotiledôneas e dicotiledôneas deve-se a estrutura anatômica do caule ou talo.

O talo da cana-de-açúcar é composto por nós e entrenós. Os nós são menores e mais finos que os entrenós e, formam um limite entre estes (AUSTRALIAN GOVERNMENT, 2008), conforme Figura 3:

Figura 3: Representação esquemática da morfologia da cana-de-açúcar (GRASSES, 2012) e microscopia de luz evidenciando as características morfológicas do nó e entrenó

Tanto os nós como os entrenós possuem uma anatomia complexa e variável dependente da região ao longo do crescimento da planta como, próximo à raiz, região intermediária e topo da cana.

Diferentemente da madeira, que apresenta um crescimento contínuo no diâmetro devido ao cambium, as monocotiledoneas não o possuem e são compostas por vários feixes vasculares espalhados em tecidos parenquimáticos, rodeados por uma epiderme forte e densa. Os feixes vasculares são formados a

partir da raiz, e nenhum tecido extra de condução é formado com a idade da planta, portanto não há crescimento e aumento do diâmetro do talo (NTNU, 2005).

Os feixes vasculares apresentam-se em maior quantidade, porém menores em tamanho na parte mais externa da cana denominada “rind ou casca” enquanto na parte mais interna, o “pith ou medula”, apresenta feixes vasculares maiores e em menor quantidade, sendo majoritariamente composto por células de parênquima, cuja função é armazenamento de açúcar. Apesar do conhecimento sobre as diferenças e heterogeneidade das células componentes da cana-de-açúcar, uma análise semi-quantitativa destas diferenças, que contribui para caracterização da cana assim como facilita os estudos envolvendo processamento desta biomassa, ainda não foi explorada (MOORE, 1987).

Anatomicamente, a região vascularizada, da casca e da medula da cana, é composta de xilema cuja função é transporte de água e solutos; floema, com função essencialmente de condução de produtos fotossintéticos, envolta por células de esclerênquima; metaxilema considerado o principal sistema de condução, é composto de dois vasos largos e maiores que os demais feixes vasculares, com perfuração simples; e finalmente o protoxilema que possui uma parede secundária densa e lignificada, dispostas como anéis anulares ou sob a forma de uma espiral; assim, eles são capazes de alongamento, conforme mostrado na Figura 4:

Figura 4: Disposição anatômica dos diferentes tecidos vegetais (obtida por microscopia ótica) e nomenclatura estabelecida por Van Dillewijn, 1951.

Os diferentes tecidos que compõe a cana-de-açúcar apresentam uma parede celular lignocelulósica, cuja distribuição e quantidade de componentes variam com a sazonalidade, região da cana, interna ou externa, como também em

relação ao sentido de crescimento; isso torna a cana-de-açúcar um material lignocelulósico de alta complexidade e heterogeneidade.

2.4 Composição química e morfológica da parede celular da palha e do bagaço de cana-de-açúcar

A palha e o bagaço de cana-de-açúcar são materiais lignocelulósicos, que possuem em sua composição química celulose, hemicelulose, lignina, e outros materiais presentes em menor quantidade que correspondem aos extrativos, amido, proteínas, cinzas inorgânicas e ácidos graxos. Conforme descrito acima, a proporção de cada um destes materiais varia de acordo com a espécie, disposição e sazonalidade da planta.

A celulose, hemicelulose e lignina se organizam, na parede celular, formando diferentes camadas denominadas parede primária (P), secundária (S_1 , S_2 e S_3) e terciária (T) (Figura 5).

Figura 5: Estrutura morfológica da parede celular vegetal (adaptado de STICKLEN, 2008)

As diferentes células encontram-se separadas pela lamela média (ML), que é uma camada fina que mantém as células coesas e é responsável pela integridade estrutural do tecido vegetal. A parede primária é a primeira camada a ser depositada durante o desenvolvimento da célula, seguida da formação das paredes secundárias S_1 , S_2 e S_3 . Nestas regiões as microfibrilas de celulose possuem distintas orientações em relação ao eixo longitudinal da célula. A parede mais espessa é a S_2 , na qual as microfibrilas de celulose estão orientadas de forma quase paralela ao eixo axial da célula. As fibrilas de celulose próximas ao lúmen da célula correspondem à camada terciária e estão orientadas quase perpendicularmente ao eixo da célula (FENGEL; WEGENER, 1989).

A deposição da lignina ocorre durante o espessamento da parede celular secundária e sempre precedida pela deposição de carboidratos, e iniciada pela região da lamela média e parede primária. Quando a formação dos polissacarídeos da matriz da camada S_2 é concluída, inicia a lignificação da parede secundária. A maior parte da lignina é depositada quando a celulose e a hemicelulose são depositadas na camada S_3 , e é encontrada, em maior quantidade na camada S_2 , porém na lamela média ela se encontra em maior concentração (SAKA; GORING, 1985; BAUCHER et al., 1998; DONALDSON, 2001).

A matriz amorfa de hemicelulose e lignina, que envolve a celulose, (Figura 6) agem como uma barreira natural ao ataque de microrganismos e/ou enzimas e torna esses materiais estruturalmente rígidos e poucos reativos (FENGEL; WEGENER, 1989).

Figura 6: Representação esquemática da disposição da celulose, hemicelulose e lignina na parede celular (adaptado de STICKLEN, 2008).

Portanto para que se possa utilizar o bagaço e a palha de cana-de-açúcar para fabricação de etanol são necessárias etapas de separação destes constituintes lignocelulósicos.

2.4.1 Celulose

A celulose é o componente presente em maior quantidade nos materiais lignocelulósicos. Cerca de 40-60% do peso seco do bagaço e da palha de cana é constituído de celulose (BIOETANOL, 2008).

A celulose é um homopolímero, linear, formado por unidades de celobiose (produto da desidratação de duas glicoses). Em uma molécula de celulose pode haver mais de 15.000 unidades de glicose e as cadeias de celulose se encontram agregadas paralelamente para formar as fibrilas elementares que são insolúveis em água e apresentam regiões cristalinas e amorfas (FENGEL; WEGENER, 1989).

Apesar de composta por regiões amorfas, as ligações de hidrogênio inter-e intramoleculares são responsáveis pela manutenção das regiões cristalinas e aumentam a resistência da celulose à hidrólise ácida, alcalina ou enzimática (WOOD; SADDLER, 1988; CONVERSE; WARE, 1994).

Figura 7: Composição e distribuição da molécula de celulose na parede celular (CHEMICAL, 2012).

2.4.2 Hemicelulose

As hemiceluloses representam 20-40% do peso seco do bagaço e da palha de cana (BIOETANOL, 2008).

As hemiceluloses são polissacarídeos que compõe a parede das células vegetais, e encontram-se intercaladas às microfibrilas de celulose conferindo elasticidade. As hemiceluloses referem-se a uma mistura de polímeros de hexoses, pentoses e ácidos urônicos, que podem ser lineares ou ramificados, são amorfos e possuem peso molecular relativamente baixo. Sua classificação é feita de acordo com os açúcares presentes na cadeia principal do polímero: xilanas, glucomananas e galactanas (FENGEL; WEGENER, 1989).

No caso de bagaço e palha de cana a hemicelulose principal é a xilana. A composição de xilanas de gramíneas foi estudada por vários autores, entre eles McDOUGALL et al. (1993). Uma representação esquemática de uma xilana típica de gramíneas se encontra na Figura 8.

Figura 8: Representação esquemática de uma xilana de gramínea mostrando alguns grupos substituintes. Xyl = D-xilopiranose; Ara = L-arabinofuranose; (4-Me)-GlcA = ácido (4-O-metil)-D-glicopiranurônico; Ac = acetil; FA = ácido ferúlico; DDFA = ácido desidroferúlico (McDOUGALL et al., 1993).

2.4.3 Lignina

A lignina representa 10- 25% do bagaço e da palha de cana (BIOETANOL, 2008), e é uma macromolécula complexa formada por unidades de fenilpropano. Os principais precursores da lignina são: ácido cumarílico, coniferílico e sinapílico (Figura 9).

Na lignina estes monômeros encontram-se ligados entre si por dois tipos de ligações: ligações éter através do oxigênio do grupo hidroxila do anel fenólico e ligações diretas carbono-carbono (C-C), ditas de condensação. A maior parte das ligações encontradas na lignina é do tipo éter, nomeadamente β -O-4 e α -O-4 (BOERJAN; RALPH; BAUCHER, 2003). As ligações do tipo éter permitem uma estrutura mais “aberta” à lignina, enquanto as ligações C-C aproximam mais os monômeros entre si, tornando a lignina mais condensada. A maior ou menor condensação da lignina afeta muito a sua reatividade, principalmente quando se deseja a degradação da macromolécula e a sua solubilização, como no caso do processo de obtenção de etanol.

Uma das principais funções da lignina é conferir rigidez, impermeabilidade e resistência a ataques microbiológicos e mecânico aos tecidos vegetais.

Figura 9: Esquema estrutural de lignina (adaptado de PLANT, 2012)

2.5 Produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos

Para a produção de etanol a partir de biomassa é necessário, primeiramente, separar as frações lignocelulósicas, em lignina, celulose e hemicelulose. Uma das vantagens da bioconversão de lignocelulósicos para obtenção de etanol é a oportunidade de se criar biorrefinarias (BALAT; BALAT; CAHIDE, 2008).

A biorrefinaria é uma integração dos processos de conversão de biomassa e equipamentos para produzir combustíveis, energia e produtos químicos a partir da biomassa. O conceito de biorrefinaria é análogo à de refinarias de petróleo, que produzem combustíveis múltiplos e produtos provenientes do petróleo (NREL, 2009).

Ao produzir múltiplos produtos, uma biorrefinaria pode tirar vantagem dos diferentes componentes da biomassa e produtos intermediários e maximizar o valor derivado da matéria-prima da biomassa. A biorrefinaria pode, por exemplo, fornecer um ou vários produtos de baixo volume, mas de alto valor agregado, produtos de baixo valor, mas de alto volume como, por exemplo, combustível líquido, geração de eletricidade e calor de processo para seu próprio uso. Os produtos de alto valor contribuem para aumentar os lucros, e os de baixo valor, como os combustíveis satisfazem as necessidades energéticas nacionais, a produção de energia e reduzem custos (NREL, 2009).

De acordo com Luo; Voet; Huppés (2010) mesmo em uma biorrefinaria que produz somente etanol, ácido succínico, ácido acético e eletricidade, apresenta um

potencial econômico bastante favorável em relação à produção única de etanol (usinas convencionais) mesmo quando o preço de ácido succínico é reduzido ou a necessidade de investimento de capital é dobrada. Em termos de eco-eficiência, a biorrefinaria demonstra melhor desempenho ambiental, principalmente no potencial de aquecimento global, devido à fixação do CO₂ durante a fermentação ácida.

A Figura 10 representa um modelo esquemático de uma biorrefinaria da cana-de-açúcar.

Figura 10: Representação esquemática de aproveitamento integral da cana-de-açúcar

O processamento de lignocelulósicos a etanol, dentro do Grupo de Conversão de Biomassa Vegetal, Modelagem Matemática e Simulação (GCBM) consiste basicamente em quatro operações principais:

1. pré-tratamento combinado com deslignificação;
2. hidrólise (química ou enzimática);
3. fermentação;
4. destilação e separação de produtos.

Estas operações são realizadas conforme esquema abaixo:

Figura 11: Fluxo de um possível processo de obtenção de bioetanol (adaptado de GRAF, OREGON, 2000)

Esta configuração é adotada pelo grupo com o objetivo de produzir diferentes produtos como polpa branqueada (GONÇALVES et al, 2008), compósitos reforçados com polipropileno (LUZ; GONÇALVES; DEL'ARCO JUNIOR, 2007 e MILEO et al., 2011) e lignina modificada para obtenção de produtos de valor agregado (LABAT; GONÇALVES, 2008).

A etapa de pré-tratamento ainda é considerada a etapa crucial para desencadear a produção de etanol a partir de biomassa. Já para a conversão de celulose a glicose, a via de conversão ácida é a mais rápida, porém apresentam grandes limitações incluindo a corrosão dos equipamentos, a formação de subprodutos tóxicos, a dificuldade em separar o ácido do hidrolisado e o baixo rendimento comparado à hidrólise enzimática (KELLER, 1996).

Dessa forma, o foco das pesquisas está voltado à hidrólise enzimática, devido à maior seletividade e especificidade das enzimas, que aumentam o rendimento da conversão quando comparada a via ácida (ASADA; NAKAMURA; KOBAYASHI, 2005; CARA et al., 2006; LIN; TANAKA, 2006; KAAR; GUITERREZ; KINOSHITA, 1998; MARTÍN et al., 2002; MONIRUZZAMAN, 1996; SENDELIUS, 2005). A hidrólise enzimática tem a flexibilidade de ser executada simultaneamente ou não com a etapa de fermentação, conforme mostrado na Figura 11.

2.5.1 Pré-tratamento: princípios e considerações

O pré-tratamento é a primeira etapa da bioconversão de lignocelulósicos a etanol. A finalidade do pré-tratamento é alterar e remover os componentes responsáveis por dificultar o acesso da enzima, na etapa de hidrólise, ao substrato, neste caso a celulose (adaptado de GRAF; OREGON, 2000). Como consequência há um aumento do rendimento da hidrólise enzimática e da quantidade de açúcares fermentáveis (MOSIER et al., 2005a).

Portanto, o pré-tratamento promove a quebra da matriz lignocelulósica para facilitar a hidrólise, conforme indicado na Figura 12.

Figura 12: Efeito do pré-tratamento em materiais lignocelulósicos (adaptado de MOSIER et al., 2005a).

Estudos têm mostrado que o pré-tratamento é a etapa de maior significância, e determinante para viabilizar a tecnologia de obtenção de bioetanol a partir de lignocelulósicos, isto porque esta etapa define o rendimento e o custo o qual os carboidratos de celulose e hemicelulose podem ser convertidos a etanol (BALAT; BALAT; CAHIDE, 2008).

O pré-tratamento pode ser conduzido de diferentes formas: pré-tratamento mecânico (RIVERS; EMERT, 1987), explosão com amônia (ALIZADEH et.al, 2005 e INDACOECHEA, et.al, 2006), tratamento com CO₂ supercrítico (KIM; HONG, 2001), álcali/ácido (SILVERSTEIN et al., 2007 e CHAMPAGNE, 2007), pré-tratamento com ozônio (INDACOECHEA et al., 2006), explosão a vapor (BROWNELL; SADDLER, 1987 e ZHANG et al., 2007), pré-tratamento por ultra-som (LIU et al., 2007 e NICKOLIC et al., 2010) e pré-tratamentos hidrotérmico (LASER et al., 2002 e PETERSEN; LARSEN; THOMSEN, 2009).

Alguns parâmetros são de extrema importância, e devem ser avaliados para atingir uma eficiência adequada na etapa de pré-tratamento, tais como: materiais pré-tratados altamente digestíveis para a etapa de hidrólise enzimática, mínima degradação de açúcares e formação de produtos inibidores, não necessitar de moagem prévia ao pré-tratamento, custo moderados dos reatores, baixa produção de resíduos e mínima necessidade aquecimento e energia (YANG; WYMAN, 2007).

2.5.1.1 Pré-tratamento hidrotérmico

O pré-tratamento hidrotérmico consiste na aplicação de água e temperatura para provocar mudanças estruturais na biomassa. Este tipo de pré-tratamento apresenta algumas vantagens já não requer descompressão súbita do reator ao termino da reação, não utiliza reagentes químicos e catalisadores, e consequentemente não provoca corrosão do reator, não necessita de redução de tamanho prévio da biomassa, diferentemente de outros pré-tratamentos (LASER et al, 2002; ALVIRA et.al, 2010). Estas características o tornam um dos pré-tratamentos mais atrativos para obtenção de etanol em escala industrial.

O principal objetivo do pré-tratamento hidrotérmico é solubilizar, principalmente, as hemiceluloses, tornando a celulose mais acessível para a hidrólise enzimática.

Dos componentes macromoleculares dos materiais lignocelulósicos, as hemiceluloses apresentam maior sensibilidade química e térmica (LEVAN; ROSS; WINANDY, 1990; WINANDY, 1995) e por isso à temperatura de 180°C ou superior em condições neutras, inicialmente, ocorre à solubilização das hemiceluloses seguida de pequenas frações de lignina (BOBLETER, 1994; GARROTE; DOMINGUEZ; PARAJO, 1999). Durante a reação exotérmica de solubilização das hemiceluloses ocorre a formação de ácidos, que auto catalisam a reação de hidrólise das hemiceluloses. Caso ocorra a degradação catalítica dos açúcares (monômeros) formados durante a hidrólise, uma série de reações de difícil controle é desencadeada, formando produtos secundários que possuem efeitos inibitórios para as etapas subsequentes (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). Esta é outra vantagem do pré-tratamento hidrotérmico; já que há liberação de uma grande quantidade destes produtos de degradação, porém em concentrações bastantes baixas devido à quantidade de água envolvida no processo, diferentemente do pré-tratamento de explosão a vapor onde há uma concentração alta destes produtos de degradação (BOBLETER, 1994).

Para minimizar a formação destes produtos secundários é necessário manter o pH da reação de pré-tratamento entre 4 e 7, já que nesta faixa de pH a forma oligomérica é mantida e então a formação dos açúcares é minimizada MOSIER et al., 2005b.

Outro aspecto importante a ser avaliado durante o pré-tratamento hidrotérmico são os parâmetros operacionais de reação. Vários parâmetros influenciam na qualidade do material processado e na formação de subprodutos. Os mais importantes são: temperatura (T), tempo de residência (t) e acidez. Outros fatores que provavelmente também influenciam são: volume do reator, pureza dos reagentes, umidade do material a ser processado e pressão do sistema (SENDELIUS, 2005). Com o objetivo de facilitar a comparação de diferentes condições de pré-tratamento, Overend; Chornet (1987) combinaram os parâmetros temperatura (T) e tempo (t) em uma única grandeza, chamada fator de severidade (definido como R_o), e considerando que a cinética da reação seja de primeira ordem, desenvolveram a Equação a seguir:

$$\log(R_o) = \log \left[t \cdot \exp \left(\frac{(T - 100)}{14,75} \right) \right] \quad (1)$$

O emprego desta equação permite identificar o quão severo é o pré-tratamento e como estas condições podem alterar, por exemplo, a despolimerização da celulose. Além disso, Chum; Johnson; Black (1990) evidenciou a importância da acidez do meio, sobre a severidade do pré-tratamento, e adicionaram a variável pH a equação (1) e denominaram a Equação (2) de severidade combinada (CS- combined severity), conforme mostrado abaixo:

$$CS = \log(R_o) - pH \quad (2)$$

A inserção do termo pH a fórmula da severidade possui um papel importante uma vez que permite a comparação de diferentes pré-tratamentos com uma maior representatividade. Por exemplo, utilizando mesmos parâmetros de temperatura e tempo de processo, porém utilizando ácido diluído, com pH aproximadamente 2, e outro apenas água, com pH em torno de 6, sabe-se que o resultado final entre ambos será diferente, isso porque devido à presença de ácido, primeiro caso, há uma aceleração da clivagem de açúcares e também de formação de produtos de desidratação uma vez que a presença de ácido catalisa estas reações. Considerando-se apenas a Equação 1, ambos os pré-tratamentos apresentariam a mesma severidade, porém subtraindo o valor de pH observa-se que o pré-tratamento ácido é mais severo que o hidrotérmico, nas mesmas condições de tempo e temperatura.

Heitz et al. (1989) demonstraram que a celulose resiste até uma severidade de $\log R_o = 3,8$ e despolimeriza rapidamente após este valor, o que limita a severidade do pré-tratamento a valores próximos de 3 para evitar a despolimerização da celulose, que é um fenômeno indesejável, pois diminui o rendimento final em etanol.

Durante o pré-tratamento há despolimerização parcial da lignina, porém apenas o pré-tratamento hidrotérmico não é capaz de remover a lignina da biomassa, pois ocorre recondensação dos componentes solúveis da lignina durante a reação (ALVIRA et al., 2010). Como as frações de lignina degradada são os principais compostos inibidores da hidrólise enzimática e da fermentação, uma etapa adicional de extração de lignina do material pré-tratado pode ser requerida (LIN; TANAKA, 2006; MOSIER et al., 2005b; HONGZHANG; LIYING, 2007). Para isso, a extração alcalina, a oxidação com peróxido de hidrogênio, a extração com solventes e o uso de enzimas ligninolíticas podem ser empregados.

A extração alcalina é o método convencional utilizado para remoção de ligninas de materiais lignocelulósicos; este método oferece um baixo custo de produção quando comparado a outros métodos de extração, por exemplo, extração alcalina/solventes, já que oferece os mesmos rendimentos durante o processo.

A remoção de lignina em temperaturas menores que $140\text{ }^{\circ}\text{C}$ induz a clivagem das ligações ésteres presentes nos ácidos fenólicos através da substituição nucleofílica do acil éster feita pelo sal alcalino, geralmente hidróxido de sódio. Como produto da reação tem-se um sal carboxílico e um álcool a temperatura ambiente, reação conhecida como saponificação. Já as ligações éter dos lignóis só podem ser clivadas a altas temperaturas.

Recentemente a combinação de pré-tratamento e deslignificação alcalina vem sendo estudada por diversos autores. Rocha et al. (2012) avaliaram a reprodução em escala piloto da combinação de pré-tratamento por explosão a vapor seguido de deslignificação alcalina e obtiveram boa reprodutibilidade comparada a escala de laboratório. Rezende et al. (2011) utilizaram uma combinação de pré-tratamento ácido diluído e diferentes concentrações de NaOH na deslignificação alcalina e verificaram que acima de 1%(m/v) NaOH há um aumento pouco significativo no rendimento da hidrólise enzimática.

2.5.2 Hidrólise enzimática

Após o pré-tratamento e extração alcalina do material lignocelulósico é necessária uma etapa de hidrólise da celulose para se obter açúcares fermentáveis. Vários processos para hidrolisar a celulose em glicose têm sido desenvolvidos ao longo dos últimos anos. Os dois processos mais usuais utilizam enzimas celulolíticas ou então ácido sulfúrico (MOSIER et al., 2005a). Ao contrário da hidrólise ácida, a hidrólise enzimática possui alta especificidade, atuando somente no material lignocelulósico e não gera subprodutos que interferem na fermentação dos açúcares (GREEG; BOUSSAID; SADDLER, 1998).

A hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósicos que não sofrem pré-tratamento e extração alcalina, possui uma baixa velocidade e rendimento de conversão, isto ocorre devido ao impedimento causado pela recalcitrância do substrato. Portanto alguns parâmetros como: acessibilidade à celulose, conteúdo de lignina e hemicelulose presentes, área superficial e cristalinidade da celulose, influenciam diretamente no rendimento da hidrólise enzimática (PAN; GILKES; SADDLER, 2006).

A hidrólise da celulose é feita por complexo enzimático, conhecido e referenciado na literatura como celulasas (PAULO, 1995). As celulasas são constituídas estruturalmente por dois "domínios", um denominado catalítico e o outro "domínio de ligação" à celulose, os quais estão ligados entre si por um polipeptídeo designado por "linker" (Figura 13).

Figura 13: Representação esquemática da conformação das celulasas (adaptado de PAULO, 1995).

No centro ativo do domínio tridimensional catalítico processa-se a cisão hidrolítica das cadeias da celulose (Figura 13). A catálise das ligações glicosídicas 1-4 β -D, pode estar essencialmente relacionada à presença de aminoácidos com grupo lateral ácido, como o aspartato ou glutamato (REINIKAINEN, 1994).

Para hidrólise total da celulose, é necessário utilizar complexos enzimáticos contendo endocelulase, celobio-hidrolases e β -glicosidase (MANDELS;

ANDREOTT; ROCHE, 1976). O mecanismo para a hidrólise enzimática envolve uma ação sinérgica das enzimas constituintes do complexo enzimático de celulases (ZHANG; LYND, 2004; HOWARD et al., 2003), como mostrado na Figura 14. Pode-se considerar como efeito sinérgico, quando a atividade enzimática obtida por uma mistura de componentes é maior do que a atividade obtida para estes componentes individualmente (WOOD; McCRAE, 1979). Reese; Siu; Levinson, (1950) propuseram que as celobiohidrolases promovem o rompimento na ligação de hidrogênio da celulose, seguida pela hidrólise da celulose acessível com as endocelulases. As endocelulases desempenham um papel importante na hidrólise, pois clivam as cadeias de celulose randomicamente promovendo uma forte degradação (OYEKOLA, 2004). Esta clivagem gera novas pontas as quais serão clivadas pelas celobio-hidrolases I (que irão atuar a partir de extremidades redutoras) e celobio-hidrolases II (que atuam a partir de extremidades não redutoras) que conseqüentemente produzirão celobiose. As moléculas de celobiose geradas no meio serão hidrolisadas pelas β -glicosidases produzindo finalmente glicose. A atuação das β -glicosidases tem como objetivo formar glicose e conseqüentemente evitar a inibição das celobio-hidrolases pela quantidade de celobiose no meio (ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006).

Figura 14: Sistema celulolítico de *T. reesei*. (MURAD; AZZAZ, 2010 apud MALHERB; CLOETE, 2003)

Embora uma extensa quantidade de microrganismos produza celulases, somente alguns destes produzem uma quantidade significativa destas enzimas, capazes de hidrolisar completamente celulose *in vitro*. A maioria das celulases exploradas para aplicações industriais são obtidas de fungos filamentosos, tais como *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Humicola* e *Phanerochaete* (GUSAKOV et al., 2007). O *Trichoderma reesei* é um dos mais potentes produtores de celulase com maior capacidade de degradação de celulose cristalina (SALAS-HERMANDEZ et al., 2009). Este fungo produz duas celobiohidrolases e duas endocelulases numa proporção aproximada de 60:20:10:10 (LYND et al., 2002) que juntos representam até 90% do coquetel enzimático enquanto sete β -glucosidases secretadas por esse fungo normalmente representam menos de 1% (SINGHANIA et al., 2010 apud ARO et al., 2005).

Uma das enzimas comerciais que podem ser utilizadas para conversão de celulose a glicose é a Accellerase 1500, produzida pela Genencor.

Esta enzima é produzida com uma cepa geneticamente modificada de *Trichoderma reesei*. O complexo enzimático contém uma potente combinação de enzimas que, efetivamente, modificam e digerem o material lignocelulósico

A Accellerase 1500 possui maior nível da atividade de beta-glicosidase comparado a outros complexos enzimáticos comerciais, que garantem a quase completa conversão de celobiose a glicose, e consequentemente aumenta o rendimento á etanol (GENENCOR, 2009).

Di Risio et al. (2011) descreveram uma melhor performance em rendimento em glicose da Accellerase 1500 quando comparada a outras enzimas comerciais. CHOUDHARY et al., 2012 utilizaram Accellerase 1500 em estudos de bagaço de sorgo pré-tratado por micro-ondas e descreveu consideráveis rendimentos em glicose.

2.6 Estudos de topoquímica

As tecnologias de conversão de biomassa são principalmente desenvolvidas de forma empírica, baseadas na compreensão limitada das propriedades biológicas e químicas da biomassa. Muitos estudos de variações de parâmetros dos processos de modificação da biomassa vêm sendo realizados, porém todos eles encontram dificuldades na compreensão do que ocorre com o material lignocelulósico durante as reações e como se dá a interação deste material com os

reagentes, enzimas e condições adotadas. Esta deficiência dificulta a escolha dos parâmetros ideais de processamento.

Além disso, um maior conhecimento da arquitetura da parede celular vegetal é necessário para melhorar as propriedades da matéria-prima lignocelulósica. A arquitetura molecular da parede celular da planta é ainda pouco explorada. A pouca compreensão da estrutura dos sistemas, é devido principalmente, a falta de ferramentas para acessar as informações em escala nanométrica, por meio não destrutivo (TETARD et.al, 2010).

Para alcançar a meta de produção de biocombustíveis, a partir da biomassa, com custo competitivo, o desenvolvimento de novas técnicas de imagem e interpretação de dados serão de grande importância para caracterizar a topografia química da parede celular em escala nanométrica (adaptado de HIMMEL et al., 2007).

Os estudos topoquímicos tornam-se neste caso uma ferramenta de grande importância para elucidar estes mecanismos. Com estes estudos é possível caracterizar a distribuição de lignina e suas interações com a celulose, monitorar o que ocorre com os materiais e suas interações ao longo de todo o processo assim como caracterizar mudanças na parede celular vegetal durante o processamento da biomassa; e isto é feito corroborando caracterizações químicas com monitoramento por técnicas de luz síncrotron, microscópicas e espectroscópicas de análises, como por exemplo, análise termogravimétrica (TGA), termoporometria e sorção, difração de raios-X, espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS), dentre outras técnicas como, microscopia confocal Raman, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e ambiental (MEV-ambiental) e (Figura 15).

Figura 15: Utilização de técnicas físicas para caracterização de biomassa em diferentes escalas (TETARD et.al. 2010).

2.6.1 Análise termogravimétrica (TGA)

A termogravimetria é definida como a técnica na qual a massa de uma substância é medida em função da temperatura, enquanto a substância é submetida a uma programação controlada de temperatura (IONASHIRO; GIOLITO, 1980). A Termogravimetria Derivada (DTG) fornece a derivada primeira da curva termogravimétrica em função do tempo ou da temperatura. Os resultados da TG e DTG são apresentados nas curvas TG e curvas DTG respectivamente. As variáveis da amostra que afetam as curvas TG são: gases desprendidos da amostra, quantidade de amostra, tamanho e geometria das partículas, empacotamento, condutividade térmica, capacidade calorífica e natureza da amostra.

Técnicas de análise térmica têm sido amplamente utilizadas, pois se apresentam como uma rápida metodologia para análise quantitativa de processos em condições isotérmicas ou não isotérmicas e permitem a estimativa dos parâmetros cinéticos de decomposição de várias reações (SEO et al., 2010).

Esta técnica pode ser utilizada para caracterização de diferentes tipos de biomassa in natura ou submetida a tratamentos, e análise de como estes tratamentos alteram seus constituintes lignocelulósicos e como estas modificações correlacionam-se com as possíveis alterações na decomposição térmica da biomassa. Yang et al., (2010) analisaram como o biopretratamento com fungos de decomposição branca de “corn stover” influenciava na decomposição térmica da biomassa, e verificaram através de estudos cinéticos, que o biotratamento diminuiu consideravelmente a energia de ativação da combustão. Mansaray e Ghaly (1999) utilizaram os mesmos princípios para caracterização térmica e cinética de casca de diferentes tipos de arroz.

Além disso, a análise termogravimétrica vem sendo utilizada como uma técnica complementar a outras de diferentes naturezas, como raios-X, infravermelho e cromatografia gasosa para avaliar as características de biomassa de cana-de-açúcar para produção de bioetanol. Ouensanga (1988) avaliou a degradação térmica de bagaço de cana em diferentes atmosferas de análise. Já Chen et al. (2010) estudou a influência do pré-tratamento ácido sobre a estrutura do bagaço de cana para a produção de bioetanol utilizando, além de outras técnicas, a análise termogravimétrica. Porém todos os trabalhos relacionados com caracterização de bagaço de cana, não reportaram estudos cinéticos de decomposição deste material. Neste trabalho a termogravimetria será utilizada para

avaliar a influência das diferentes condições de pré-tratamento e deslignificação sobre a estrutura da biomassa, e também será proposta uma correlação entre os parâmetros cinéticos de combustão e a severidade do processo de pré-tratamento.

2.6.2 Difração de Raios X

O grau ou índice de cristalinidade dos polímeros (I_c) expressa a porção de regiões cristalinas presentes na molécula com relação às não cristalinas, e pode ser avaliado pelo método de difração de raios-X. A difração baseia-se no fato dos comprimentos de onda dos raios-X serem comparáveis às distâncias interatômicas dos cristais. Efeitos de interferência ocorrem através da interação radiação-matéria. Quando a estrutura é ordenada, possuindo certa regularidade, como no caso dos cristalitos, as interferências são acentuadas, podendo-se distinguir essas estruturas das desordenadas (RAMOS, 2005).

O grau de polimerização e cristalinidade da celulose foram considerados fatores importantes na determinação da hidrólise de substratos celulósicos (ALVIRA et al., 2010 apud Chang e Holtzaple, 2000). Segundo, Mansfield; Mooney, Saddler (1999), foi observado que o pré-tratamento de lignocelulósicos melhora sua acessibilidade, mas em alguns casos aumenta o grau de cristalinidade da fração de celulose. Este fato é explicado devido à celulose amorfa ser facilmente hidrolisada durante determinados pré-tratamentos (KUMAR; WYMAN, 2009). Porém, o aumento da cristalinidade não é um fator desejável quando se pretende utilizar a biomassa para produção de etanol, já que este aumento influencia diretamente a etapa de hidrólise enzimática, com consequente diminuição do rendimento de conversão a etanol no processo global.

Por esta razão as análises de difração de raios-X se tornam uma ferramenta importante para avaliar a influência do pré-tratamento e deslignificação sobre a cristalinidade da celulose.

2.6.3 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)

Resolver a estrutura de macromoléculas é importante para prever suas propriedades, e em alguns casos a estrutura determina a função do composto no meio. O uso de raios-X em caracterização estrutural de materiais explora essencialmente suas interações através de elétrons de átomos e moléculas (OLIVEIRA NETO et al., 2008).

As ondas eletromagnéticas associadas aos raios X incidentes provocam oscilações dos elétrons dos átomos componentes da amostra irradiada. Em função da energia dos fótons incidentes ser bem maior que a energia de ligação dos elétrons, estes elétrons comportam-se como se fossem livres. Em uma solução de partículas diluídas, o espalhamento da macromolécula é promediada para todas as orientações, de forma a termos acesso experimental a média esférica para todas as orientações da macromolécula.

SAXS fornece informações estruturais de heterogeneidades de densidade eletrônica com dimensões características de 1 a 100 nm (GLATTER; KRATKY, 1982). Esta ferramenta aliada a outros métodos físicos de análises permitirá, por exemplo, elucidar mecanismos de adsorção de enzimas bem como mudanças de superfície exposta ao solvente que podem ocorrer com a lignina em solução quando o material lignocelulósico é submetido a diferentes condições de reação (MAZIERO et al., 2010). Consequentemente é possível prever, com análises submoleculares, quais os melhores parâmetros de processos levando-se em conta a degradação do material bem como aproveitamento racional de reagentes e enzimas envolvidos nas reações.

Outra abordagem relevante e pouco explorada de SAXS está relacionada a estudos de orientação de microfibrilas de celulose.

Para utilizar SAXS na elucidação destes mecanismos é necessário compreender os tipos de informações que podem ser obtidas através das curvas de espalhamento.

2.6.3.1. Análises das curvas de SAXS - Obtenção do Raio de giro de macromoléculas

Para análise de uma curva de SAXS, é conveniente distinguir os parâmetros que podem ser obtidos a partir da curva de espalhamento. Na região dos ângulos próximos de zero, pode-se determinar o raio de giração R_g para as maiores partículas da solução em análise, outras regiões de Guinier podem ser verificadas para sistemas que possuam diferentes populações (distribuição de massa molecular) (FEIGIN; SVERGUN, 1987).

Assumindo o caso ideal, de partículas esféricas não interagentes em solução, Guinier mostrou que para $q \rightarrow 0$, a curva de intensidade pode ser descrita como uma função exponencial (GUINIER; FOURNET, 1955):

$$I(q) = I(0)e^{\frac{-q^2 R_g^2}{3}} \quad (3)$$

Onde R_g é o raio de giração correspondente a distância média quadrática dos elétrons da partícula até o seu centro de gravidade. Analogamente, o R_g pode ser visto com o raio de inércia na mecânica clássica. Aproximações similares são consideradas para partículas alongadas e achatadas. Para um sistema monodisperso, o gráfico de Guinier, $\ln I(q) \times q^2$ resulta uma linha reta com intercepto $I(0)$, com inclinação proporcional a R_g , conforme mostrado na Figura 16. Contudo, deve-se ter em mente que a aproximação de Guinier é válida somente para os ângulos próximos de 0, respeitando a equação $q < 1,3/R_g$ (GUINIER et.al, 1955).

Figura 16: Gráfico de $\ln(I) \times q^2$, utilizado para cálculo de raio de giro (R_g)

2.6.3.2 Análise de natureza fractal de macromoléculas polidispersas

Uma maneira de caracterizar a morfologia e agregação de materiais é determinar sua dimensão fractal (VAINIO et al., 2004).

O termo “fractal” foi introduzido na década de 70 pelo matemático Benôit Mandelbrot, para designar objetos e estruturas complexas dotadas da propriedade de auto similaridade (CHAVES, 1989), conforme mostrado na Figura 17. Estruturas auto-similares apresentam detalhes (ramificações, poros ou rugosidades) em certa faixa de escala de comprimento, cuja forma é a mesma em diferentes escalas. Assim, se parte da estrutura for ampliada terá a mesma forma do todo (MANDELBROT, 1983).

Figura 17: Exemplos de estruturas fractais

Uma característica particular importante dos sistemas fractais é que muitas propriedades destes sistemas podem muitas vezes, ser descritas pelas quantidades que são proporcionais a uma potência de outra quantidade. Esta relação é freqüentemente chamada de lei de potência (SCHMIDT, 1991). Em particular, para espalhamento de raios-X a baixo ângulo a lei da potência é expressa por:

$$I(q) = I(0) * q^{-\alpha} \quad (4)$$

O coeficiente α está relacionado com a dimensão fractal e esse valor é uma medida da proporção do espaço realmente ocupado por um sistema desordenado, podendo refletir a conformação das partículas que o constituem (HARRISON, 1992).

Objetos compactos no espaço euclidiano (não-fractais), possuem valores inteiros de α . Já nos conjuntos fractais, são encontrados, geralmente, valores fracionários. Tais conjuntos com $\alpha < d$ podem ser objetos ramificados ou porosos. As estruturas fractais ramificadas (como uma árvore) e porosas (como uma esponja) são ditas fractais de massa (D_m) e de poros (D_p), respectivamente. Por outro lado, existem conjuntos cujos interiores são compactos ($\alpha = d$) e apenas suas superfícies são fragmentadas e irregulares, caso em que são ditos fractais de superfície (D_s) (SILVA et al., 2000).

Linearizando a equação 3 é possível obter uma equação de reta, onde o valor encontrado para o coeficiente angular α define o tipo de dimensão fractal. Se $\alpha < 3$ tem-se um material de massa fractal, enquanto se $3 < \alpha < 4$ tem-se materiais chamados de fractal de superfície (SILVA et al, 2000, VAINIO et al, 2004). Para

sistemas caracterizados por distribuição de tamanho de moléculas, como as ligninas, pode ser utilizada uma abordagem descrita por Beaucage (1996), de uma equação unificada que descreve um material com uma gama de tamanhos, em termos de níveis estruturais. Sendo que um nível pertence a um regime de Guinier, descrevendo uma média de tamanho estrutural, e o outro regime estrutural pertencente à lei de potência, descrevendo um fractal de massa ou superfície. Conforme mostrado na Figura 18, descrita por Norgren; Edlund; Wageberg (2002), a lignina em solução alcalina apresenta formação de agregados fractais a partir de partículas coloidais.

Figura 18: Descrição do comportamento de ligninas. Composta de um sistema polidisperso as ligninas apresentam partículas coloidais e agregados fractais em solução.

De forma generalizada a equação de Beaucage em dois níveis estruturais pode descrever as características destes dois tipos de estrutura de ligninas em solução conforme descrito na Equação 5:

$$I(q) \cong \underbrace{G e^{\left(\frac{q^2 R g^2}{3}\right)}}_{\text{Guinier prefactor}} + \underbrace{B e^{\left(\frac{q^2 R_{\text{sub}}^2}{3}\right)} \left(\frac{1}{q^*}\right)^P}_{\text{Power-law dependent}} + \underbrace{G_s e^{\left(\frac{q^2 R s^2}{3}\right)}}_{\text{Guinier prefactor}} + \underbrace{B_s \left(\frac{1}{q^* s}\right)^P}_{\text{Power-law dependent}} \quad (5)$$
$$q^* = q / \left[\text{erf} \left(\frac{q k R g}{\sqrt{6}} \right) \right]^3$$

Sendo que a o primeiro termo da equação descreve a lignina de maior escala, ou seja, os agregados fractais, e o termo subsequente relacionam-se com as características estruturais das partículas coloidais.

Utilizando esta abordagem é possível obter uma análise das características estruturais das ligninas de forma detalhada.

2.6.3.3 Análises morfológicas da parede celular vegetal

Além das análises de sistemas em solução, a técnica de SAXS pode ser utilizada para caracterização morfológica de sistemas sólidos, como por exemplo, a parede celular vegetal.

De acordo com o modelo de parede celular descrito por Fengel; Wegener, (1984), a parede secundária S_2 é a camada mais representativa em termos de espessura, e contém um sistema de fibrilas de celulose muito longas, finas e paralelas, embebidas numa matriz de hemicelulose e lignina. A orientação das fibrilas em S_2 é dada por um ângulo espiral α a partir da direção longitudinal do lúmen, sendo usualmente as fibrilas orientadas quase que paralelamente a direção principal de crescimento. A segunda maior camada da parede celular, chamada S_1 , por outro lado, possui fibrilas em direção praticamente perpendicular aquelas presentes em S_2 . Todas as outras camadas componentes da parede celular possuem largura muito menor comparadas com as parcelas descritas acima e suas contribuições em SAXS certamente serão desconsideradas.

Em um experimento de SAXS aplicado a biomassa, podemos distinguir basicamente três regiões com notável diferença de densidade eletrônica: as fibrilas de celulose elementar (p_f), a matriz lignocelulósica (densidade eletrônica média p_m) envolvendo as fibrilas, e o vazio (lúmen), onde a densidade eletrônica é igual a zero. Visto que o diâmetro do lúmen ($\approx 30 \mu\text{m}$) possui uma grandeza maior daquelas observadas nas regiões acessíveis ao SAXS (0,5 a 100 nm), podemos simplificar a análise considerando apenas duas diferentes densidades eletrônicas. Assim, desconsiderando o espalhamento do lúmen, a intensidade de espalhamento observada em SAXS será dada pela Equação 6.

$$I(q) = V(p_f - p_m)^2 \left| \int_V \chi_f(x) e^{iqx} d^3x \right|^2 \quad (6)$$

onde $\chi_f(x)$ é a função índice, com um valor igual a 1 ou 0, se x está em uma região de fibra ou matriz respectivamente e $q=4\pi\sin\theta/\lambda$, com 2θ , sendo o ângulo de espalhamento entre os feixes incidente e espalhado. Esta equação depende do quadrado da diferença de densidade eletrônica (contraste) das duas componentes, quão bem da transformada de Fourier da função $\chi_f(x)$.

Levando em conta a composição química e a densidade dos componentes majoritários da parede celular, podemos considerar as densidades das duas fases como sendo $p_f \approx 5 \cdot 10^{23} \text{ cm}^{-3}$ e $p_m \approx 4.6 \cdot 10^{23} \text{ cm}^{-3}$, dando o contraste para produzir um espalhamento observável.

2.6.3.4 Orientação das fibrilas elementares de celulose

A informação sobre a orientação de todas as fibras de celulose nas diferentes camadas S_1 e S_2 da parede celular está contida no padrão de espalhamento de SAXS. A Figura 19 mostra um típico padrão de seção radial (R) de “earlywood”. (JAKOB; FRATZL; TSCHEGG, 1994). Medidas de seção tangencial (T) dão resultados similares, mas os padrões da seção de corte (Q) são bem diferentes, como mostrado na Figura 19e.

Para avaliar o atual arranjo das fibrilas na parede celular é, feito o espalhamento de uma única fibrila e, assumindo-se uma simetria cilíndrica para simplificação das análises (cilindro preto na Figura 19a). O padrão de espalhamento de um cilindro longo é bem conhecido por possuir a forma de um disco perpendicular ao cilindro (GUINIER; FOURNET, 1955; GLATTER; KRATKY, 1982; FEIGIN; SVERGUN, 1987). Se todas as fibrilas pertencentes à camada S_2 da parede celular são supostamente paralelas ao eixo longitudinal da planta (direção vertical na Figura 19), então todos os discos no padrão de espalhamento se superpõem perfeitamente. Agora, considerando as fibrilas pertencentes à parede S_1 , suas orientações poderiam ser perpendiculares às fibrilas em S_2 (cilindros pretos na Figura 19b). Cada cilindro produz um padrão de espalhamento na forma de disco, mas já que as fibrilas em S_1 possuem diferentes possíveis orientações (todas perpendiculares ao eixo de crescimento da planta), a superposição de suas contribuições forma uma curva sólida, como mostrada na Figura 19b. Somando-se os padrões das Figuras 19a e 19b, a intensidade total será como a da forma apresentada na Figura 19c. A seção ao longo do plano chamado Q será desta forma como um padrão de disco (Figura 19e). A seção ao longo de qualquer plano perpendicular a Q (seções radial ou tangencial) mostrará uma linha perpendicular

as fibrilas em S_2 (Figura 19a). Adicionalmente, existe também uma linha muito menor na direção longitudinal devido principalmente ao espalhamento das fibrilas em S_1 (Figura 19b).

Figura 19: Visualização dos padrões tridimensionais de SAXS, esperados para medidas de fibrilas. (a) Espalhamento em forma de disco de uma fibrila de celulose (cilindro preto) orientada ao longo da direção na camada S_2 . (b) Espalhamento da superposição de muitas fibrilas de celulose (pequenos cilindros pretos) perpendiculares a direção vertical que estão presentes em S_1 . (c) Superposição dos padrões de espalhamento (a) e (b). Q indica o plano correspondente a seção de corte e R ou T o plano correspondente respectivamente às seções radial e tangencial. (d) Padrão de SAXS de uma seção radial de *Picea abies*, “earlywood” num detector bidimensional, a uma distância de 1 m. (e) O mesmo para seção de corte da amostra.

2.6.4 Microscopias

Para se obter uma otimização do processamento da biomassa a etanol, é necessária uma compreensão da morfologia e estrutura da biomassa, bem como sua composição química em micro e nano-escala.

As microscopias surgem como uma poderosa abordagem para uma compreensão mais ampla da arquitetura molecular da parede celular, que podem auxiliar no desafio de produção eficiente do etanol celulósico (TETARD et al., 2010).

Dentro deste contexto, as técnicas de microscopias podem ser aplicadas para avaliar as mudanças estruturais que ocorrem durante o processamento da biomassa, e, além disso, pode ser utilizada para uma avaliação instantânea da distribuição dos componentes lignocelulósicos nas diferentes regiões da parede celular.

Dentre as técnicas microscópicas que podem ser utilizadas em estudos envolvendo processamento de biomassa pode-se ressaltar a microscopia eletrônica de varredura (MEV), ambiental (MEV-ambiental) e microscopia Raman. Deve-se destacar que essas técnicas são complementares e cada uma delas tem seu campo específico de aplicação.

2.6.4.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Uma das vantagens apresentadas pelo MEV é a combinação de análises microestruturais que contribuem para o amplo uso desta técnica.

O MEV apresenta uma resolução da ordem de 2 a 5 nm, que permite o estudo da morfologia e superfície da amostra (TANIMOTO, 2006).

Na microscopia eletrônica de varredura um feixe de elétrons de até 40 keV incide na amostra, e então vários sinais são gerados como resultado do impacto dos elétrons com a amostra, que são coletadas para formar uma imagem e analisar a superfície da amostra (BOGNER et al., 2007).

No MEV os sinais de maior interesse para formação da imagem são os elétrons secundários e os retroespalhados (BOGNER et al, 2007, TANIMOTO apud Maliska, 2005 e BARBAROTO, 2010). O número de elétrons secundários emitidos varia de acordo com a geometria e outras propriedades da amostra. Os elétrons

secundários são coletados por um detector, produzindo imagem. Os elétrons retroespalhados e fótons emitidos pela amostra, pela ação do feixe de elétrons, podem também ser usados para produzir imagens.

A microscopia de varredura para caracterização de biomassa é amplamente utilizada principalmente para avaliar mudanças na superfície da amostra após um determinado tratamento. Zhao et al., (2007) utilizaram MEV, conjuntamente a outras técnicas físicas, para avaliar a influência da hidrólise ácida nas fibras de algodão. Cosgrove, (2005) apresentou o progresso de estudos envolvidos na compreensão do crescimento da parede celular, utilizando MEV para determinação estrutural de biomassa. Guimarães et al., (2009), utilizou a microscopia como ferramenta de comparação e diferenciação da morfologia de diferentes biomassas brasileiras, como banana, bucha vegetal e bagaço de cana-de-açúcar.

2.6.4.2 Microscopia eletrônica de varredura ambiental (MEV-ambiental)

O MEV-ambiental é uma extensão natural do MEV convencional. A origem do MEV-ambiental está diretamente relacionada à necessidade de analisar amostras mais próximas do seu estado natural, incluindo-se amostras em condições úmidas. Para isso seria necessário introduzir alto vácuo a microscopia eletrônica, porém a introdução de gás a microscopia eletrônica é completamente oposta às ideias geralmente estabelecidas para o alto vácuo, o qual estaria em um ambiente gasoso que promoveria a deterioração da resolução da imagem por um alargamento dos feixes de elétrons e excluiria o modo de detecção de imagens por elétrons secundários (BOGNER, 2007).

O ambiente gasoso possui várias funções na microscopia ambiental, já que atua como um “meio ambiental”, como meio de dissipação de carga e como meio de detecção. O gás ionizado pelo feixe de elétrons transforma-se em um bom condutor e libera vários sinais e evita a necessidade de revestimentos condutores ou químicos na amostra. Ao acompanhar as interações do sinal do gás podem-se obter imagens e análises (DANILATOS, 1994).

A introdução de um dispositivo de detecção gasoso dos feixes de elétrons viabilizou a microscopia ambiental e é o principal diferencial comparado ao MEV convencional. Neste modo de detecção, potenciais positivos de 300-500V são aplicados (diferentemente do detector convencional do MEV onde são usados 10-12 kV, o que resultaria em “arco” na presença de gás). Elétrons secundários de baixa energia são seletivamente acelerados em um pequeno campo elétrico entre a

amostra e o detector. Então, colisões ionizantes com as moléculas de gás geram elétrons secundários adicionais, causando uma “cascata” de elétrons. Assim, o sinal é amplificado antes de alcançar o detector. Os íons positivos resultantes desde processo em cascata são características primordiais e essenciais do MEV-ambiental, já que estes íons tendem para a superfície da amostra e compensam a carga negativa (STOKES, 2003).

Um MEV-ambiental ideal integra uma coluna ótica de elétron e sistemas de detecção com uma câmara coletora que permite a transição de um ambiente de alta pressão de gás, na câmara da amostra, para um regime de alto vácuo na câmara de canhão de elétrons. O sistema é otimizado quando o gradiente de pressão ao longo do caminho do feixe ocorre com as mínimas perdas devido a dispersão de elétrons pelas moléculas de gás, sem comprometer a sonda e a eficiência do detector.

O MEV-ambiental é uma técnica ainda pouco difundida em análise de biomassa, sendo que dentro deste contexto sua principal abordagem está relacionada a estudos envolvendo propriedades mecânicas de madeira.

Karlsson et al. (1998) avaliaram o efeito de inchamento de fibras regeneradas de Rayon utilizando diferentes técnicas, dentre elas MEV-ambiental. Donald et al. (2003) descrevam o uso de MEV-ambiental em estudos de fratura de tecidos e parede celular de plantas. Eder; Stanzl-Tschegg; Burgert (2008) utilizaram MEV-ambiental em testes de tensão de *Picea abies* em três diferentes fibras, earlywood, transition wood e latewood, in situ, e em condições hidratadas.

Em estudos de caracterização de cana-de-açúcar, para o processamento a etanol, esta técnica apresenta-se como promissora para avaliação e comparação de absorção e perda de água na parede celular da cana em diferentes condições de tratamento. Análises semi-quantitativa das imagens podem fornecer informações importantes sobre a difusão de água e reagentes utilizados na modificação da parede celular.

2.6.4.3 Microscopia Confocal Raman

Avanços na microscopia confocal Raman proporcionam a difusão desta técnica principalmente como método de análise composicional e estrutural in situ com alta resolução espacial (RICHTER; MUSSIG; GIERLINGER, 2011).

Em combinação com a microscopia, a espectroscopia Raman possui como vantagem a obtenção de espectro e imagens, de maneira não evasiva, com alta resolução utilizando amostra em meio aquoso, com certa espessura (porém não opaca) (GIERLINGER; SCHWANNINGER, 2006).

Ao contrário de um microscópio convencional, onde todo o campo, onde contém a amostra é iluminado, as medidas do sistema confocal é dada pela luz refletida ou transmitida por uma área muito pequena da amostra. A reconstituição de uma imagem bidimensional é realizada por meio de dados numéricos, tratamento dos sinais fotoelétricos resultantes de uma análise sequencial por uma varredura em XY do campo da amostra (TURRELL; DHAMELIN COURT, 1996).

Espectroscopia Raman é baseada no espalhamento inelástico de luz monocromática quando a frequência dos fótons muda após a interação com uma amostra. Os fótons do laser são absorvidos pela amostra e, subsequentemente, reemitidos, então, a frequência dos fótons reemitidos é deslocada para cima ou para baixo em comparação com a frequência original monocromática, que é conhecido como o efeito de Raman. A mudança Raman fornece informações sobre energias vibracional e rotacional de ligações moleculares (TURRELL; DHAMELIN COURT, 1996; PRINCETON INSTRUMENTS, 2012).

Uma vantagem única da espectroscopia de Raman é que pode ser utilizada para, seletivamente, excitar uma porção da molécula, alterando o comprimento de onda de excitação. Além disso, as bandas de água são geralmente pequenas e facilmente subtraídas, e espectros Raman geralmente contêm bandas nítidas que são características das ligações moleculares específicas na amostra. A intensidade das bandas em um espectro de Raman é proporcional à concentração das moléculas correspondentes e assim pode ser usado para a análise quantitativa (TURRELL; DHAMELIN COURT, 1996).

Vantagens claras da microscopia confocal Raman garantiram a sua proliferação generalizada em várias áreas da indústria e pesquisa acadêmica. Parcialmente, isso aconteceu devido ao crescimento significativo da nanociência, e principalmente pela relativa facilidade de caracterização química, in situ, de nano-sistemas heterogêneos. Este tipo de análise não pode ser feita com outras técnicas microscópicas de análises como MEV e MET (PRINCETON INSTRUMENTS).

A microscopia confocal é uma técnica, já difundida, em estudos relacionados à biomassa. Além da informação composicional, esta técnica também indica a

distribuição dos componentes macromoleculares, divididos em carboidratos e lignina, bem como informações da orientação da celulose na parede celular vegetal. A seletividade desta técnica permite também obter dados desta distribuição dos componentes nas diferentes camadas da parede celular. Edwards; Farwell; Webster, (1997) utilizaram microscopia Raman em estudos de identificação de diferentes espécies vegetais, como juta, rami, algodão, sisal e fibra de côco. SAAR et al. (2010) demonstraram, in situ, a distribuição de lignina durante a deslignificação de “corn stover”, utilizando microscopia Raman estimulada. Já Richter; Mussig; Gierlinger, (2011) diferenciou a distribuição de lignocelulósicos nos diferentes tipos de células que compõe a parede celular da monocotiledonea *Phormium tenax*. Gierlinger; Schawanninger, (2006) evidenciou as diferenças de *Populus nigra* e *Populus deltoids* quanto à composição química entre a lamela média, parede primária e secundária; e analisou a orientação da celulose destas paredes.

Apesar da utilização desta técnica nesses estudos, a caracterização da cana-de-açúcar bem como a comparação da distribuição dos componentes na parede celular, após seu processamento, ou seja, nos processos de pré-tratamento e deslignificação, apresenta-se como uma análise inédita. Isso ocorre principalmente devido à dificuldade e necessidade de adaptação das técnicas de corte, para obtenção das amostras na espessura ideal para análise, que neste caso, diferentemente da madeira, são bastante frágeis.

2.6.5 Termoporometria

A termoporometria, (TP) também denominada crioporometria mede os deslocamentos de temperatura das transições de fase sólido-líquido em nanoescala. As transições podem ser medidas por ressonância magnética nuclear, bem como por calorimetria de varredura diferencial (DSC). As análises de termoporometria são adequadas para as medidas de porosidade em nanoescala de materiais lignocelulósicos. Alguns grupos de pesquisa tem utilizado tal técnica para materiais lignocelulosicos após o processamento, porém a utilização da técnica para análise da cana integral ainda é inexplorada. A TP-DSC distingue três tipos de água nas células: (i) água livre, (ii) a água congelada não ligada (em inglês non-freezing water bound- NFW), e (iii) água congelada ligada (do inglês Freezing bound water – FBW). A água livre é o excesso de água adicionada durante a preparação da amostra (não é uma propriedade intrínseca do material), que é medida a partir de fusão de gelo a 0 ° C. Já NFW é a água intimamente associada

a superfícies sólidas, que é calculada, com uma certa incerteza, como a diferença entre a água total da amostra e a água de congelamento total. FBW é o resultado majoritário da TP-DSC. FBW é a água confinada pelo sólido de uma forma que promove o deslocamento das transições de fase de gelo-água, que é medida a partir de fusão de gelo abaixo de 0 ° C. Uma vez que os diâmetros de poro associados ao FBW são da ordem dos nanómetros, FBW é atribuída principalmente a ser confinada dentro das paredes das células, e não nos volumes micrométricos da célula, como o lúmen e os espaços intercelulares. Driemeier, Mendes e Oliveira, 2012 descreveram e adaptaram a teoria da termoporometria para determinação de água em diferentes tipos de celuloses. Mihranyan et al. (2004) utilizaram esta técnica como ferramenta para demonstrar os efeitos da hidratação e secagem da água sobre a ultraestrutura da celulose.

Além da cristalinidade, a porosidade pode ser outro parâmetro primordial para aumentar a digestibilidade na etapa de hidrólise enzimática, isso porque, o aumento da porosidade pode permitir um maior contato entre a enzima e o substrato, portanto quanto maior o tamanho e a quantidade dos poros maior a superfície de contato entre a celulose e a enzima e conseqüentemente maior a digestibilidade deste componente. Neste trabalho a termoporometria terá fundamental importância na avaliação da mudança da porosidade das diferentes células que compõe a cana de açúcar após seu processamento

3. OBJETIVOS

Geral

O trabalho tem por objetivo otimizar e comparar as condições de pré-tratamento hidrotérmico, com base nos rendimentos de hidrólise enzimática de bagaço e palha de cana-de-açúcar. E, a partir da condição otimizada caracterizar a parede celular da cana-de-açúcar e suas modificações após o pré-tratamento e deslignificação alcalina, a fim de se compreender os mecanismos de reação do material lignocelulósico com as condições adotadas no processamento da cana a etanol celulósico.

Específicos

1. Realizar pré-tratamento hidrotérmico, deslignificação alcalina e hidrólise enzimática do bagaço e da palha de cana-de-açúcar em diferentes condições de processo;
2. Caracterizar quimicamente cada uma das biomassas vegetais em sua forma “in natura”, bem como caracterizar as frações obtidas após cada processo de pré-tratamento, deslignificação e hidrólise enzimática.
3. Monitoramento por microscopia eletrônica de varredura de todas as etapas de processamento, e corroborar com os dados de caracterização química a fim de se obter uma condição otimizada de pré-tratamento;
4. A partir da condição otimizada, utilizar a cana-de-açúcar, in natura, hidrotérmicamente pré-tratada e deslignificada, e caracterizar cada etapa por MEV-ambiental, microscopia confocal Raman e SAXS a fim de se compreender a influência do processamento na parede celular vegetal.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Pré-tratamento hidrotérmico do bagaço e palha de cana-de-açúcar

Os pré-tratamentos foram realizados em colaboração com o Laboratório de Processos Biotecnológicos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). O reator utilizado foi do tipo autoclave eletrônica REG MED modelo AU/E-20 com capacidade de 20 L, conforme Figura 20.

Figura 20: Reator REG MED modelo AU/E-20 utilizado para os testes de pré-tratamento de bagaço e palha de cana-de-açúcar

Foram realizadas 10 reações em diferentes condições de tempo e temperatura, conforme tabela 1.

Tabela 1: Condições de pré-tratamento hidrotérmico de bagaço e palha de cana-de-açúcar.

	REAÇÕES	TEMPO (min.)	TEMPERATURA (°C)
BAGAÇO	R1	10	180
	R2	20	180
	R3	30	180
	R4	40	180
	R5	50	180
	R6	10	190
	R7	20	190
	R8	30	190
	R9	40	190
	R10	50	190

	REAÇÕES	TEMPO (min.)	TEMPERATURA (°C)
PALHA	R1P	10	160
	R2P	20	160
	R3P	30	160
	R4P	40	160
	R5P	50	160
	R6P	10	180
	R7P	20	180
	R8P	30	180
	R9P	40	180
	R10P	50	180

Para todas as condições acima descritas foi utilizada uma relação sólido/líquido de 1:10 (m/v), sendo o reator carregado com 1 kg de bagaço ou palha de cana-de-açúcar juntamente com 10 L de água destilada. Em seguida o reator foi hermeticamente fechado, e a camisa de aquecimento foi ligada e a temperatura e o tempo de reação foram monitorados. Com estes dados foi possível obter as rampas de aquecimento e de resfriamento de cada reação, conforme Figura 21. Os patamares em cada gráfico representam o tempo de residência do bagaço e da palha na temperatura de reação.

Figura 21: Rampas de aquecimento e resfriamento para as diferentes condições de reação de pré-tratamento hidrotérmico (a) bagaço, (b) palha de cana-de-açúcar.

Ao término da reação, o vapor gerado foi liberado gradualmente até a reação atingir a temperatura de 100°C. Em seguida, o reator foi descarregado e foi feita a separação do material sólido (celulose e lignina) do material líquido (hidrolisado hemicelulósico). O bagaço e a palha de cana pré-tratados foram lavados com aproximadamente 80L de água a 70°C, até atingir pH neutro; este procedimento foi adotado para remoção de quantidades residuais do hidrolisado hemicelulósico. Para verificar se a quantidade de água utilizada na lavagem foi suficiente para remoção do hidrolisado residual, foi feita coleta de alíquotas de 20 em 20L destas águas de lavagem para as reações, com bagaço de cana, R3 e R8. Para as demais condições de reação, foi obtida uma alíquota após lavagem com 80L de água. Posteriormente essas águas de lavagem e o hidrolisado foram caracterizados por cromatografia líquida de alta eficiência, conforme item 4.5.2.

4.2 Deslignificação alcalina

O processo de deslignificação alcalina do material in natura e obtido após pré-tratamento em diferentes condições, foi realizado em balão de vidro de 3 bocas, utilizando-se uma relação sólido:líquido 1:10 (m/v), NaOH 1% (m/v) e temperatura de 100°C por 1h sob agitação de 50 rpm.

Ao término da reação o resíduo sólido do processo de deslignificação foi filtrado a vácuo, recolhendo-se o licor concentrado de lignina.

A fração sólida foi lavada com água destilada a 70°C para remoção da lignina residual contida na polpa bruta, até pH neutro. Após este procedimento, a polpa bruta foi seca à temperatura ambiente, até uma umidade de aproximadamente 10% e posteriormente mensurada quanto ao rendimento do processo (Equação 7). Uma fração de cada material deslignificado foi utilizada para caracterização química e análises microscópicas enquanto a outra fração foi submetida a ensaio de conversão enzimática.

Já o licor concentrado de lignina foi caracterizado por SAXS, conforme descrito no item 4.6.1.

4.3 Rendimento de reação e perdas de componentes macromoleculares

A massa pré-tratada e deslignificada obtida foi mensurada para calcular o rendimento do pré-tratamento e deslignificação, respectivamente, conforme equação a seguir:

$$R = \frac{m_{final}}{m_{inicial}} \times 100 \quad (7)$$

Onde:

R : rendimento mássico da etapa.

$m_{inicial}$: massa inicial seca de material lignocelulósico (g);

m_{final} : massa final seca de material lignocelulósico (g);

Já as perdas dos componentes macromoleculares (celulose, hemicelulose e lignina) foram calculadas pela seguinte equação:

$$P = 100 \times \left(1 - R \frac{y_f}{y_i} \right) \quad (8)$$

onde:

P: perda do componente macromolecular (%);

y_i : teor do componente macromolecular no material lignocelulósico “in natura”;

y_f : teor do componente macromolecular no material lignocelulósico pré-tratado;

4.4 Hidrólise Enzimática

Os ensaios de conversão enzimática foram realizados utilizando-se o complexo enzimático comercial Accellerase 1500 gentilmente doado pela Empresa Genencor –A Danisco Division.

A hidrólise enzimática foi realizada, em shaker, utilizando-se tampão citrato de sódio 0,05 mol.L⁻¹, pH 4,8, sob agitação de 100 rpm a temperatura de 50 °C por 72 h e relação sólido:líquido 1:10 (m/v). Foi utilizada uma carga enzimática de 0,25

mL extrato enzimático/g de material lignocelulósico seco, conforme descrito pelo fabricante e teste preliminar de dosagem realizado. Este protocolo foi escolhido para comparar o material pré-tratado e deslignificado quanto à melhor condição de pré-tratamento.

Após o término da reação enzimática os hidrolisados foram fervidos por 5 min, filtrados em papel de filtro Whatmann nº1 e analisados por cromatografia líquida de alta eficiência, conforme descrito no item 4.5.2. Os resíduos da hidrólise enzimática, de bagaço de cana submetido à pré-tratamento seguido de deslignificação, foram submetidos à caracterização química e análises de MEV (conforme metodologia descrita no item 4.6.3).

A conversão enzimática da celulose foi calculada pela Equação 9:

$$CC = \frac{m_{glicose} \times f_h}{m_{inicial} \times y_i} \times 100 \quad (9)$$

onde: CC: conversão enzimática da celulose;
 $m_{glicose}$: massa de glicose presente no hidrolisado (g);
 $m_{inicial}$: massa seca de material lignocelulósico, antes da etapa de hidrólise enzimática (g);
 y_i : teor de celulose no material lignocelulósico;
 f_h : fator de hidrólise da celulose (correspondente a 0,88)

4.5 Análises Químicas

4.5.1 Composição Química do Material Lignocelulósico

Foi feita a caracterização química dos materiais obtidos nas etapas de pré-tratamento hidrotérmico, deslignificação alcalina e hidrólise enzimática, para o bagaço pré-tratado e deslignificado, conforme metodologia analítica desenvolvida por Rocha et al. (1997) e validada por Gouveia et al. (2009).

Para as amostras “in natura” primeiramente foi feita a remoção alcoólica de extrativos utilizando o aparato de Soxhlet, por 1 ciclo de 8 horas. Após a extração o material sólido foi seco em estufa até peso constante; e pela diferença do peso inicial foi feita a quantificação destes extrativos. Em seguida a amostra in natura,

sem extrativos, foi submetida ao mesmo procedimento de caracterização química das demais amostras.

Amostras de 2g de material lignocelulósico (moído a 30 mesh), pesados com precisão de 0,1 mg, foram transferidos para um béquer de 100 mL e tratados com 10 mL de H_2SO_4 72% (m/m), sob vigorosa agitação, em um banho termostatizado a $45,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por 7 min. A reação foi interrompida com a adição de 50 mL de água destilada, sendo a amostra transferida quantitativamente para um frasco erlenmeyer de 500 mL, elevando-se o volume final a 275 mL de água, e consequente diluição do ácido para aproximadamente 4% (m/v). Para uma hidrólise completa dos oligômeros restantes, o erlenmeyer foi fechado com papel alumínio e autoclavado por 30 min a uma pressão de 1,05 bar, acima da pressão atmosférica, a 121°C .

Após a descompressão da autoclave, o erlenmeyer foi retirado, resfriado a temperatura ambiente, sendo a mistura reacional filtrada e transferida para um balão volumétrico de 500 mL utilizando-se a água de lavagem do material retido no filtro. O balão volumétrico que contém o hidrolisado foi submetido à análise de carboidratos, ácidos orgânicos, furfural, hidroximetilfurfural e lignina solúvel. Enquanto o material sólido retido no filtro foi submetido a análise de lignina insolúvel e teor de cinzas.

4.5.2 Determinação de carboidratos e ácidos orgânicos por CLAE

Os hidrolisados e as águas de lavagem obtidas do pré-tratamento hidrotérmico, bem como os hidrolisados da metodologia de caracterização do material lignocelulósico (item 4.5.1) e da hidrólise enzimática (item 4.4) foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando uma coluna Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm, Bio-Rad Laboratories Ltd) em um cromatógrafo Shimadzu LC-10AD, utilizando como fase móvel H_2SO_4 $0,005 \text{ mol.L}^{-1}$ com fluxo de $0,6 \text{ mL.min}^{-1}$, a 45°C . Os compostos foram monitorados com um detector de índice de refração Shimadzu RID-6 A.

Previamente à injeção das amostras na coluna, o pH das amostras de hidrolisado foi ajustado para a faixa de 1 a 3 e os compostos fenólicos presentes nas amostras foram removidos por cartuchos de extração sólida Sep-Pak C_{18} (Waters)..

Os cromatogramas das amostras foram comparados com os padrões dos açúcares e ácidos orgânicos a serem analisados, sendo a quantificação feita por curvas de calibração de cada composto.

4.5.3 Determinação de lignina insolúvel em meio ácido

O material insolúvel retido no papel de filtro obtido no item 4.5.1 foi lavado com aproximadamente 1,5 L de água destilada, para remoção de ácido residual (até pH próximo de 7) e seco em estufa a 105°C até massa constante. A percentagem de lignina insolúvel em meio ácido foi calculada em relação à massa de material lignocelulósico seco; e a massa real de lignina insolúvel foi calculada pela diferença entre a massa obtida nesta etapa e a massa obtida da determinação de cinzas (item 4.5.4).

4.5.4 Determinação do teor de cinzas

Os materiais resultantes do item 4.5.3 foram colocados em cadinhos de porcelana previamente calcinados e tarados. Esses materiais foram inicialmente pré-calcinados a temperatura de 400°C, por aproximadamente 1 h, com os cadinhos tampados, e em seguida, removeu-se a tampa e calcinou-se o material por 2 h a 800°C. Após a calcinação, o cadinho foi resfriado em dessecador e a massa de cinzas determinada.

4.5.5 Determinação da lignina solúvel

A quantidade de lignina solúvel foi determinada pela medida de absorbância a 280 nm em um espectrofotômetro UV-visível Perkin Elmer modelo Lambda 25. Foram colocados 5 mL dos hidrolisados e águas de lavagem do item 4.1, e do item 4.5.1 em um balão volumétrico de 100 mL, juntamente com 50 mL de água destilada e 2 mL de NaOH 6,5 M.

Após agitação, a mistura resultante, foi analisada em espectrofotômetro. A equação abaixo foi utilizada para determinar a concentração de lignina solúvel no hidrolisado.

$$C_{Lig} = \frac{(A_{280nm} - \epsilon_{HMF} \cdot C_{HMF} - \epsilon_{Furf} \cdot C_{Furf} - 0,045650)}{\epsilon_{lig}} \quad (10)$$

onde:

C_{lig} : Concentração de lignina solúvel no hidrolisado (g/L);

$A_{280\text{nm}}$: Absorbância do hidrolisado em 280 nm;

ϵ_{HMF} : Absortividade do hidroximetilfurfural (114 L.g^{-1});

$\epsilon_{\text{Furfural}}$: Absortividade do furfural ($146,85 \text{ L.g}^{-1}$);

C_{HMF} : Concentração de hidroximetilfurfural no hidrolisado (g/L);

C_{Furfural} : Concentração de furfural no hidrolisado (g/L)

E_{lig} = absortividade da lignina (L/g) Determinado por ROCHA et al.(1997)

4.5.6 Determinação de furfural e hidroximetilfurfural

Furfural e hidroximetilfurfural foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em uma coluna LiChrospher 100 RP-18 ($5 \mu\text{m}$) de $125 \times 4 \text{ mm}$ (Hewlett-Packard), utilizando-se acetonitrila/água 1:8 (v/v) com 1% de ácido acético como fase móvel, a uma vazão de $0,8 \text{ mL.min}^{-1}$, a temperatura de 25°C .

Os hidrolisados e águas de lavagem do item 4.1, bem como hidrolisados do item 4.5.1 foram filtrados em membrana de diâmetro de poro de $0,47 \mu\text{m}$ (Milipore), para total remoção de partículas sólidas das amostras. As amostras foram injetadas com uma válvula Rheodyne equipada com alça de injeção de $20 \mu\text{L}$. Os compostos foram detectados em 276 nm por um detector UV-visível Shimadzu SPD-10. As concentrações de furfural e hidroximetilfurfural foram determinadas a partir das curvas de calibração obtidas a partir dos compostos puros.

4.6 Caracterizações espectroscópicas e microscópicas

Diferentes técnicas físicas de análises foram estudadas para uma maior compreensão das mudanças estruturais que ocorrem com os materiais lignocelulósicos durante seu processamento. Algumas metodologias descritas são amplamente exploradas e aplicadas para análises de materiais diferentes dos utilizados neste trabalho (bagaço e palha de cana-de-açúcar), e, portanto foram adaptadas e modificadas a fim de se obter resultados satisfatórios da interpretação dos dados obtidos.

4.6.1 Espalhamento de Raios-X a baixo ângulo (SAXS) para análise de ligninas

As medidas de SAXS das ligninas obtidas após deslignificação alcalina conforme descrito no item 4.2, foram realizadas no Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS). Além das ligninas obtidas neste trabalho, foi feito um estudo de caracterização, por esta técnica, de ligninas extraídas de diferentes formas de reação dentro do Grupo de Conversão de Biomassa, Modelagem matemática e

Simulação (GCBM). A descrição destas ligninas analisadas encontra-se na Tabela 2:

Figura 22: (a) Laboratório Nacional de Luz Sincrotron, (b) linha de SAXS utilizada para coleta de dados de ligninas em solução

Tabela 2: Descrição das ligninas em solução analisadas por SAXS

Amostra	Descrição das amostras
LBA	Lignina de bagaço de cana pré-tratada com 1%(m/V) H_2SO_4 , 120°C por 1h, e deslignificada com 1% (m/v) NaOH a 100°C por 1h.
LBS	Lignina de bagaço de cana pré-tratada por explosão a vapor a 200 °C por 15min., e deslignificada com 1% (m/v) NaOH a 100°C por 1h.
LBH	Lignina de bagaço de cana pré-tratada hidrotermicamente a 160 °C por 15min., e deslignificada com 1% (m/v) NaOH a 100°C por 1h.
LPAN	Lignina de palha de cana pré-tratada com 1%(m/V) H_2SO_4 , 120°C por 1h, e deslignificada com 1% (m/v) NaOH a 100°C por 1h.
LPANAQ	Lignina de palha de cana pré-tratada com 1%(m/V) H_2SO_4 , 120°C por 1h, e deslignificada com 1% (m/v) NaOH e antraquinona, a 100°C por 1h.
LPS180	Lignina de palha de cana pré-tratada por explosão a vapor a 180 °C por 15min., e deslignificada com 1% (m/v) NaOH a 100°C por 1h.
LPS190	Lignina de palha de cana pré-tratada por explosão a vapor a 190 °C por 15min., e deslignificada com 1% (m/v) NaOH a 100°C por 1h.
LPS200	Lignina de palha de cana pré-tratada por explosão a vapor a 200 °C por 15min., e deslignificada com 1% (m/v) NaOH a 100°C por 1h.

A intensidade dos raios-X espalhados foi coletada utilizando um feixe de raios-X monocromático com comprimento de onda de 1,488 Å. Os padrões de espalhamento de raios-X foram coletados com um detector bidimensional Pilatus, utilizando distância amostra-detector de 1500 mm, resultando em um intervalo de espalhamento de $0,007 < q < 0,17 \text{ Å}^{-1}$, onde q é a magnitude do vetor de espalhamento definida por $q = 4\pi \sin\theta / \lambda$ (2θ é o ângulo de espalhamento). Conforme os resultados obtidos com ligninas em estudo anterior (MAZIERO et al., 2012), a solução de lignina foi diluída a uma concentração de 5g/L e preparada uma semana antes da realização dos experimentos, para garantir a estabilidade da solução e reprodutibilidade dos dados.

O tratamento dos dados obtidos foi realizado utilizando-se os softwares SASfit2D e Origin 8.0. Os padrões de SAXS foram escalonados pela intensidade do feixe incidente e pela absorção da amostra. O espalhamento causado por janelas e fendas, característicos do equipamento foram subtraídos do espalhamento da amostra.

4.6.2 Difração de raios-X

Com o propósito de avaliar a redução de cristalinidade dos materiais lignocelulósicos após as etapas de pré-tratamento e deslignificação, as amostras foram moídas e devidamente secas. A análise de difração de raios-X foi realizada, no Instituto de Física de São Carlos – USP, utilizando-se um difratômetro de raios X da marca Rigaku com um anodo rotatório de cobre ($\lambda = 1,5418 \text{ Å}$), filamento de tungstênio e monocromador de grafite no intervalo angular de 5° a 80° (ângulo de Bragg – 2θ), passo angular de $0,05^\circ$ e tempo de exposição de 1s por ângulo.

O índice de cristalinidade dos materiais lignocelulósicos foi calculado pela equação abaixo (CAO; TAN, 2002):

$$I_c = \frac{(I_{002} - I_{am})}{I_{002}} \times 100 \quad (11)$$

onde:

I_c : Índice de cristalinidade (%);

I_{002} : Intensidade do pico no plano cristalino 002 ($2\theta = 22,6^\circ$);

I_{am} : Intensidade do pico na fase amorfa ($2\theta = 19,0^\circ$).

Para fins comparativos, de metodologias de cálculo de cristalinidade, as amostras de bagaço de cana pré-tratado e deslignificado foram submetidas à difração de raios-X e também analisadas conforme metodologia estabelecida por Driemeier; Calligaris, (2012). As análises foram realizadas em um anodo rotatório no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em colaboração com o Dr. Carlos Eduardo Driemeier do Centro de Tecnologia do Bioetanol (CTBE)- Campinas Brasil. As amostras foram analisadas a umidade ambiente em capilares de 2 mm de diâmetro. Durante as medidas as amostras foram rotacionadas 360° em torno do seu eixo X. O padrão de difração foi corrigido pelo ruído de fundo, geometria de espalhamento (direção preferencial da amostra), e absorção dos raios-X. Os padrões corrigidos foram analisados pelo método de Ritveld utilizando o programa MAUD.

A cristalinidade foi definida como a razão mássica entre a matéria cristalina e a massa total seca. Cada padrão de espalhamento foi calculado baseado na equação desenvolvida por Driemeier; Calligaris (2011), conforme mostrado na Equação 12 a seguir:

$$x_{cr} = \frac{Q[I'_{cr}]}{Q[I_{exp}] - \frac{T_{exp}}{T_0} Q[I_0]} \times \frac{1 + 1.2x_m + \sum \varepsilon_Z x_Z}{1 - \varepsilon_{inc}} \quad (12)$$

Onde: $Q[i]$ é a função que integra a intensidade dos raios-X em um intervalo definido. I_{cr} e I_{exp} representam a intensidade coerente do cristalino e o total do padrão isotrópico respectivamente. I_0 é a intensidade do branco (sem amostra) obtido pela medida do capilar vazio. T_{exp} e T_0 representam a intensidade dos raios-X transmitidos da amostra e do capilar vazio, respectivamente ε_{inc} relaciona-se com o espalhamento incoerente (para o Cu=0,102), x_m é a umidade da amostra. E , ε_{zxz} representam a correção pelos desvios de composição.

4.6.2.1 Interpretação do índice de cristalinidade para materiais lignocelulósicos

Durante o pré-tratamento ocorre à remoção de hemicelulose e lignina (materiais amorfos) que promove um aumento da cristalinidade devido à maior quantidade de celulose presente na fibra (etapa 1 da Figura 23). Além disso, o pré-tratamento contribui para remoção de celulose amorfa (etapa 2 da Figura 23). As

medidas de cristalinidade são importantes para se determinar quanto da celulose cristalina torna-se amorfa após o pré-tratamento. Já que espera-se um índice de cristalinidade menor devido à redução da recalcitrância do material lignocelulósico, já que a cada etapa de tratamento há um rompimento da estrutura rígida da biomassa vegetal diminuindo a barreira física ao transporte de massa (HIMMEL et al., 2007).

Figura 23: Representação esquemática da modificação dos componentes lignocelulósicos na etapa de pré-tratamento. (1) Remoção de componentes lignocelulósicos amorfos: hemicelulose e lignina). (2) Remoção de celulose amorfa

Para determinar se o pré-tratamento promove a diminuição de cristalinidade, algumas considerações devem ser abordadas.

Considerando que uma amostra de Avicel (100% celulose) possui uma cristalinidade de 83% (RAMOS, 2005) e que o bagaço in natura possui 42% de celulose com uma cristalinidade de 55,6%, pode-se dizer que o bagaço in natura possui 67% de cristalinidade em relação à Avicel. Utilizando esta informação pode-se obter a cristalinidade, relativa, esperada das amostras de bagaço após o pré-tratamento e deslignificação. A mesma relação pode ser utilizada para palha, porém utilizando-se os dados de composição química e índice de cristalinidade deste material.

Utilizando-se os dados obtidos da composição química de celulose no bagaço em cada etapa de processamento, pode-se determinar a cristalinidade esperada. A diferença entre o valor esperado e o valor obtido experimentalmente nos fornece a porcentagem de diminuição da cristalinidade da celulose, conforme indicado na equação 13 e 14:

$$Ice = CQ_{celulose} * \frac{67}{CQ_{cel.ea}} \quad (13)$$

$$Dc = Ice - Ic_{medida} \quad (14)$$

Onde:

I_{ce} = Índice de cristalinidade esperada

$CQ_{celulose}$ = composição química da celulose de bagaço ou de palha

$CQ_{cel.ea}$ = Composição química da celulose da etapa anterior (ex: para matérias pré-tratado a etapa anterior é a composição química do material in natura, para amostras deslignificadas a etapa anterior é a composição química do material pré-tratado).

Dc = diminuição da cristalinidade

$I_{c_{medida}}$ = Índice de cristalinidade calculado a partir dos dados experimentais

4.6.3 Microscopia eletrônica de varredura

As micrografias do bagaço e da palha de cana “in natura”, pré-tratada e deslignificada, foram obtidas em um microscópio FEI FE-ESEM, Quanta 600, com potencial de feixe de 5 kv a 0,75 torr. As amostras, com uma umidade relativa de aproximadamente 10% foram fixadas, com uma fita de carbono, no porta-amostra sem prévio tratamento ou recobrimento, conforme mostrado na Figura 24:

Figura 24: (a) Microscópio FEI FE-ESEM, Quanta 600, eletrônico de varredura e ambiental (MEV e MEV-ambiental), (b) amostras fixas no porta amostra, (c) Porta amostra e fitas de carbono.

4.6.4 Termogravimetria

As análises termogravimétricas foram realizadas em colaboração com a Dra. Paula Crkovic do Núcleo de Engenharia Térmica e Fluidos – Escola de Engenharia de São Carlos- USP.

Nas medidas foi utilizada uma Balança Termogravimétrica TGA – Shimadzu51H, que permite utilizar massa de amostra de até 2,0 g. A faixa de temperatura de trabalho que pode ser explorada é de 25°C à 1500°C com razão de aquecimento de 0,1 a 50,0°C min⁻¹, com uma vazão máxima do gás de arraste de 100 mL min⁻¹.

Para os ensaios, utilizaram-se amostras com massa de 10±1 mg, aplicando condições não-isotérmicas com razões de aquecimento de 10°C min⁻¹ desde a temperatura ambiente até 800 °C, e atmosfera de 100 mL min⁻¹ de ar sintético (80% de N₂ + 20% de O₂).

O processo de decomposição térmica do bagaço da cana de açúcar gera pouco resíduo (de 2 a 5%), sendo necessário utilizar massa da amostra próxima a 10 mg e fundo de escala do equipamento igual a 20 mg..

A baixa densidade do bagaço de cana dificulta a pesagem e colocação da massa no cadinho, que possui dimensões iguais 5,8 mm x 2,6 mm. Para fins comparativos da combustão e para facilitar a pesagem, todas as amostras foram moídas até uma granulometria aproximada de 230 µm.

4.6.4.1 Determinação dos Parâmetros cinéticos da combustão

O modelo matemático utilizado baseia-se na equação de Arrhenius proposto por Goldfarb et al. (1968), onde é possível determinar os parâmetros cinéticos de curvas típicas de termogravimetria, conforme demonstrado a seguir:

$$\frac{dX}{dt} = -Ae^{-\left(\frac{E}{RT}\right)} X^n \quad (15)$$

Uma forma simplificada da expressão acima linearizada é dada pela equação 16:

$$\ln \left(\frac{-1}{w_0 - w_f} \frac{dw}{dt} \right) = \ln A - \left(\frac{E}{RT} \right) + n \ln \left(\frac{w - w_f}{w_0 - w_f} \right) \quad (16)$$

Os parâmetros cinéticos podem ser determinados a partir da regressão linear múltipla da equação 16, onde:

$$y = B + Cx + Dz$$

$$y = \ln \left(\frac{-1}{w_0 - w_f} \frac{dw}{dt} \right)$$

$$x = \frac{1}{RT}$$

$$z = \ln \left(\frac{w - w_f}{w_0 - w_f} \right)$$

$$B = \ln A$$

$$C = -\frac{E}{R}$$

Esta abordagem foi utilizada para análise cinética de decomposição térmica do bagaço de cana-de-açúcar em condições in natura, pré-tratada e deslignificada, principalmente para avaliar as mudanças ocorridas no material após os diferentes processos de modificação de biomassa descrita neste trabalho.

4.7 Caracterização do colmo cana-de-açúcar

Esta segunda etapa do projeto foi realizada em colaboração com o prof. Dr. Peter Fratzl líder do grupo de biomateriais do Instituto Max Planck-Coloides e Interfaces-em Potsdam, Alemanha.

Os estudos foram baseados nas condições otimizadas para o bagaço de cana-de-açúcar, porém, devido à dificuldade de caracterização de um material bastante heterogêneo, como o bagaço, optou-se por analisar, o efeito do pré-tratamento e deslignificação em diferentes regiões de crescimento do colmo da cana sem a moagem prévia da mesma, conforme representado na Figura 25:

Figura 25: Representação esquemática das regiões de crescimento do colmo da cana

Para cada região foram utilizados dois entre-nós, sendo a região inicial, próxima a raiz, representada pelos entre-nós 2 e 3, a região intermediária os entre-nós 6 e 7, e a parte o topo do colmo, representada pelos entre-nós 9 e 10. Além disso, em cada região foram analisadas as estruturas parenquimáticas e os feixes vasculares tanto da região da medula ou também conhecida como pith localizada na parte mais interna do colmo, quanto da região da casca ou rind, mais externa do colmo. A divisão de medula e casca foi estabelecida conforme descrito por Siqueira et al. (2011) da seguinte forma: (a) primeiramente aproximadamente 0,2 cm da região mais externa foi cortado, em circunferência, que corresponde a epiderme, em seguida, (b) uma circunferência, de aproximadamente 1,1 cm, a partir do centro, foi cortada e utilizada como medula (região mais interna), (c) uma outra circunferência de aproximadamente 1 cm foi descartada por conter mistura de casca e medula, (d) a circunferência resultante, de 1 cm, foi utilizada como casca (região mais externa).

4.7.1 Remoção dos açúcares do colmo da cana-de-açúcar

Os entre-nós foram cortados transversalmente em pedaços de espessura de aproximadamente 3 cm. Estes pedaços foram submetidos à remoção de sacarose em aparato de Soxhlet por 9 ciclos de 8 horas (SLUITER, 2011). Esta condição foi determinada experimentalmente por análise de açúcares em cada ciclo, e, após 9 ciclos verificou-se que não havia concentração de açúcar detectáveis por CLAE. Após a remoção os pedaços dos entre-nós foram colocados em um frasco com água destilada e armazenados em geladeira.

4.7.2 Cortes dos entre-nós do colmo da cana para análises e reações

Após a remoção dos açúcares, os entrenós foram cortados para análises por SAXS, microscopia Raman e microscopia eletrônica de varredura ambiental, em diferentes espessuras e tamanhos dependentes da aplicação e análise.

Para as análises de SAXS os entre-nós de cada região foram cortados longitudinalmente em um micrótomo Leica RM 2255 em espessuras de 550 μm , conforme mostrado na micrografia ótica da Figura 26. A espessura foi determinada experimentalmente, conforme descrito no item 4.7.4.

Figura 26: Microscopia ótica do corte longitudinal do entre-nó da região do topo da cana (a) aumento de 3X (b) aumento de 12x

Já para as análises de microscopia ambiental e Raman, foram feitos cortes transversais de cada entre-nó (Figura 27), com espessura de 600 μm e 40 μm , respectivamente. Assim como para os cortes longitudinais de SAXS, os entre-nós para análise de MEV-ambiental foram feitos em micrótomo.

Já para as amostras de menor espessura (40 μm) os cortes foram feitos em criomicrotomo, Microm HM 560 Cryostar, Cryostat, em temperatura de -20°C , utilizando-se a resina comercial, Neg 50, protetora de superfície a base de polivinilalcool e polietilenoglicol.

Figura 27: Seção transversal do colmo da cana, na região do topo, obtido por microscopia ótica

4.7.3 Pré-tratamento e deslignificação dos entre-nós da cana-de-açúcar

A condição otimizada de pré-tratamento e deslignificação realizada para o bagaço de cana, foi utilizada para análise dos entre-nós da cana de açúcar. Neste caso foi utilizado um reator de exterior em aço inoxidável e interior em vidro com

capacidade de 20 mL, provido de controle de temperatura interno e externo, conforme Figura 28:

Figura 28: Reator utilizado no pré-tratamento e deslignificação das regiões do colmo da cana (a) reatores e controle de temperatura, vista lateral, (b) reator e controle de temperatura, vista superior, (c) partes do reator de aço inoxidável, no exterior, e vidro na parte interior.

O aquecimento do reator foi feito em forno, e para obter as mesmas condições das curvas de aquecimento e resfriamento obtidos no reator REG MED, utilizado para o bagaço de cana, foi feito um estudo de otimização da temperatura ideal do forno para se obter o mesmo tempo de exposição da amostra na reação. Portanto o forno foi aquecido à temperatura de 220°C previamente ao início do pré-tratamento.

As reações de pré-tratamento foram mantidas a 180°C (temperatura interna do reator) por 20 minutos, utilizando-se uma relação sólido líquido de 1:10 (m/v). Para as amostras de SAXS e microscopia ambiental o pré-tratamento foi realizado diretamente nos cortes longitudinais de $550\text{ }\mu\text{m}$ e transversais de $600\text{ }\mu\text{m}$ respectivamente. Já para a microscopia Raman, devido a espessura muito fina e a fragilidade da amostra, o pré-tratamento foi feito primeiramente em cortes transversais de 5 mm, que, após a reação, foram submetidos ao corte em criomicrotomo, conforme descrito no item 4.7.2. Ao término da reação os cortes foram lavados com água destilada até pH próximo da neutralidade.

Parte dos cortes pré-tratados, de cada entre-nó, foram submetidos a deslignificação alcalina, a 100°C (temperatura interna do reator), com 1% (m/v) de NaOH durante 1 hora, utilizando-se uma relação sólido/líquido de 1:10. Em seguida as amostras deslignificadas foram lavadas com água destilada até pH neutro.

Tanto os cortes in natura quanto os cortes pré-tratados e deslignificados foram colocados em água destilada e armazenados em frascos na geladeira.

4.7.4 Análises de orientação de celulose por SAXS

Experimentos de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) foram realizados utilizando seções de corte radiais de três diferentes regiões de cana-de-açúcar, início (internó 3), meio (internó 7) e topo (internó 14) (Figura 29). As diferentes regiões, (i) “medula” e (ii) “casca” foram analisadas para o parênquima e feixes vasculares.

Figura 29: Seções de corte radiais de três diferentes regiões da cana-de-açúcar, (i) início, (ii) meio e (iii) topo.

As medidas foram realizadas utilizando um equipamento Nanostar (Bruker SAXS) utilizando um comprimento de onda $\lambda = 0,154$ nm selecionado por um monocromador multicamadas. Padrões bidimensionais de espalhamento (2D) foram coletados com um detector de área sensível à posição (HiStar). A distância amostra-detector utilizada foi de 350 mm, permitindo cobrir um intervalo do vetor de transferência de momento entre $0,2 \text{ nm}^{-1} < q < 3,5 \text{ nm}^{-1}$, onde $q=4\pi\sin\theta/\lambda$, com 2θ , sendo o ângulo de espalhamento entre os feixes incidente e espalhado. As medidas foram realizadas com as amostras em condições úmidas utilizando um porta amostras composto por duas folhas de kapton paralelas.

Os padrões bidimensionais foram corrigidos pela absorção da amostra e radiação de fundo do detector e integrados azimuthalmente (Figura 30).

Figura 30: (a) Perfil de espalhamento bidimensional, somatória radial dos “binnings”, a direção azimuthal da integração é indicada pela linha amarela. (b) Representação unidimensional de $I(q)$ vs o ângulo azimuthal.

4.7.5 Microscopia eletrônica de varredura ambiental (MEV-ambiental)

Para a obtenção de uma seção transversal de superfície lisa, a fim de se evitar interferências de pedaços de células na qualidade da amostra obtida, foi feito o corte de 600 μm , conforme descrito no item 4.7.2. Neste caso, esta espessura foi utilizada devido ao limite máximo que o micrótomo poderia atingir.

As medidas de MEV-ambiental foram realizadas em um microscópio FEI FE-ESEM, Quanta 600 com um detector gasoso de elétrons secundários (GSED) e potencial de feixe de 12,5 kv (Figura 31).

Figura 31: MEV-ambiental (a) porta-amostra no interior do microscópio com fluxo de água para controle de temperatura, (b) equipamento, (c) porta amostra, (d) detector GSED.

Os cortes das amostras in natura, pré-tratada e designificada foram colocados, juntamente com gotas de água, no porta amostra, provido de controle de temperatura por fluxo de água mantido a 7°C, para evitar a secagem da amostra durante as medidas.

Inicialmente a pressão foi mantida a 8 torr e gradativamente foi diminuída para 5 torr, até revelar a seção transversal da amostra e ainda indicar a presença de água na superfície das células, para obtenção das imagens em condições úmidas. Nestas condições foram obtidas imagens das células do parênquima e feixes vasculares da região da casca e da medula, em duas magnitudes (600 e 1200x).

Para obtenção das imagens das mesmas células, porém em condições secas (análise *in situ*), as coordenadas referentes à posição da amostra foram anotadas e posteriormente utilizadas. As amostras foram secas dentro do microscópio por diminuição da pressão (secagem á vácuo) até 0,75 torr, que equivale a uma umidade de aproximadamente 10%, onde foram obtidas as mesmas imagens, porém em condições secas.

4.7.6 Microscopia Confocal Raman

Primeiramente foi realizado um teste para definir a espessura ideal da amostra, já que diferentemente da madeira o corte da cana de açúcar apresenta dificuldades principalmente devido à fragilidade das células do colmo. Por esta razão foi feito um teste da espessura mínima, sem opacidade, capaz de fornecer imagens de qualidade com superfície lisa e sem interferência de pedaços de células. Além disso, a dificuldade do corte é aumentada quando as amostras são submetidas ao pré-tratamento e deslignificação. Por isso, os testes foram realizados com o objetivo de padronizar a melhor espessura para todas as amostras. Assim, foi estabelecido o corte a 40 μm conforme protocolo de corte descrito no item 4.7.2.

Logo após o corte as amostras foram colocadas diretamente em uma lamínula de vidro, com uma gota de água e coberta com uma lamínula de plástico. As lamínulas foram seladas com esmalte de unha nas extremidades, para evitar a evaporação da água durante as medidas, conforme descrito por Gierlinger; Schwanninger, (2006).

Os espectros e as imagens foram adquiridos em um microscópio confocal Raman (CRM200 WITEC), conforme Figura 32, equipado com um digitalizador (P-500, Physik Instrument) e uma abertura objetiva do microscópio (NA) da Nikon (100x, óleo NA=1.25). Um laser polarizado (laser verde diodo bombeado, L 5 532 nm, CrystaLaser) foi focado com um tamanho de difração limitado ($0.61 \lambda / \text{NA}$) e a luz Raman foi detectada por um ar-refrigerado, CCD espectroscópio (Andor) retro – iluminado, com uma resolução de 6 cm^{-1} . O poder do laser sobre a amostra foi de aproximadamente 5 mW. Um tempo de integração de 1s e 0,17 μm foi selecionado.

Figura 32:Microscopio Raman

Para o setup das medidas e processamento das imagens foi utilizado o software ScanCtrlSpectroscopy Plus (WITEC). As imagens referentes à composição química foram obtidas utilizando-se um filtro e por integração das áreas das curvas em um comprimento de onda definido para materiais lignocelulósicos. Com os filtros é possível calcular as intensidades levando-se em conta a subtração do background e consequente correção da linha base. Utilizando-se esta abordagem é possível separar e definir a distribuição dos componentes lignocelulósicos nas diferentes camadas da parede celular.

Para obter espectros com boa qualidade, foi feita a média entre três a quatro espectros. As bandas correspondentes aos carboidratos e lignina foram definidas conforme descrito na literatura por Wiley; Atala, 1987; e Argaval; Atala, (1986).

4.7.7 Termoporometria e sorção

As análises de TP-DSC foram realizadas em colaboração com o pesquisador Dr. Carlos Driemeier do Centro de tecnologia do Bioetanol (CTBE), Campinas.

As medidas de TP-DSC foram feitas para as regiões iniciais, intermediária e topo do colmo da cana para os feixes vasculares e parênquima separadamente tanto em condições in natura, como após o pré-tratamento e deslignificação alcalina.

As medidas foram realizadas utilizando um instrumento TA Q200 com uma unidade de arrefecimento RCS90, conforme detalhado por Driemeier, Mendes e

Oliveira, (2012). As amostras (de 0,5 a 3,6 mg de massa seca), foram saturadas com água deionizada e preparadas em recipiente de alumínio que foram então selados com tampas herméticas. As análises de TP-DSC consistiram em congelar as amostras a -70°C , seguida do aumento gradual da temperatura para derreter o gelo formado. O calor da fusão do gelo foi calorimetricamente detectado e convertido em massa de gelo. O gelo derretido abaixo de 0°C , foi associado a FBW confinado nos poros. Diâmetros de poro ($\varnothing$), foram calculados a partir de diminuição da temperatura de fusão (AT), utilizando a relação de Gibbs-Thomson $\varnothing = 2 K_c / AT$, com $K_c = 19,8 \text{ nm K}$.¹⁷ O resultado de cada medição foi dado pelo FBW cumulativo (em unidades de massa de gelo por massa da amostra seca) como uma função do diâmetro dos poros $\varnothing$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Bagaço de cana-de-açúcar

5.1.1 Análises do Hidrolisado do pré-tratamento hidrotérmico

A Tabela 3 mostra a composição do hidrolisado obtido após o pré-tratamento hidrotérmico.

Tabela 3: Composição do hidrolisado bruto obtido do pré-tratamento hidrotérmico de bagaço

LICOR BRUTO									
	Celobiose	Ac. glucorônico	Glicose	Xilose	Arabinose	Ac. fórmico	Ac. acético	Furfural	HMF
R1	ND	4,622	0,357	4,964	1,41	ND	ND	0,0015	0,0044
R2	ND	6,147	0,453	8,29	1,316	ND	ND	0,0027	0,0086
R3	3,856	6,652	0,605	8,836	1,439	ND	ND	0,0031	0,0095
R4	3,059	6,124	0,724	10,922	1,427	ND	ND	0,0044	0,0116
R5	2,281	4,922	0,914	10,908	1,309	ND	ND	0,0055	0,0151
R6	2,532	5,164	0,766	10,496	1,302	ND	2,562	0,0053	0,0154
R7	0,652	2,27	0,908	9,97	ND	ND	ND	0,0055	0,0134
R8	0,911	1,061	1,397	9,039	ND	ND	ND	0,0091	0,0204
R9	0,34	0,111	1,495	4,915	ND	ND	ND	0,0137	0,0295
R10	0,38	ND	1,576	4,263	ND	ND	ND	0,015	0,0261

*ND= não detectado

Conforme descrito na literatura, o pré-tratamento hidrotérmico baseia-se na utilização de água, como agente de fracionamento, para extrair uma mistura rica em oligômeros, monômeros, açúcares e ácidos orgânicos (CAPARRÓS; LOPÉZ, DÍAS, 2007). O fracionamento dos carboidratos em oligômeros é bastante expressivo neste tipo de pré-tratamento, e devido à dificuldade de padrões destes oligômeros para uma análise completa, uma pós hidrólise do licor nos fornece resultados mais significativos e facilita a compreensão de quais componentes possuem maior susceptibilidade à solubilização neste tipo de pré-tratamento.

A Tabela 4 mostra as diferenças no hidrolisado após a hidrólise completa do licor bruto obtido nas diferentes condições de pré-tratamento hidrotérmico.

Tabela 4: Composição do hidrolisado após etapa adicional de hidrólise ácida para completa clivagem dos oligômeros de hemicelulose e celulose

LICOR HIDROLISADO									
	Celobiose	Ac. glucorônico	Glicose	Xilose	Arabinose	Ac. fórmico	Ac. acetico	Furfural	HMF
R1	0,383	ND	1,34	18,084	1,331	ND	2,34	0,2387	1,256
R2	0,402	0,219	1,584	23,846	1,486	ND	2,67	0,3952	1,411
R3	0,157	ND	0,885	9,386	0,632	ND	1,598	0,2076	0,777
R4	0,248	ND	1,572	15,865	1,01	0,349	2,566	0,5281	2,322
R5	0,06	ND	1,5	9,871	0,651	0,338	2,06	0,4441	2,166
R6	0,012	ND	0,497	4,163	0,271	ND	0,957	0,1805	0,562
R7	0,101	ND	0,728	5,976	0,13	ND	1,316	0,3352	0,878
R8	0,097	ND	0,817	3,765	ND	ND	1,374	0,5202	1,011
R9	0,099	ND	0,801	3,723	ND	ND	1,341	0,5742	0,585
R10	0,012	ND	0,479	1,136	ND	ND	1,044	1,0966	0,916

*ND= não detectado

As Tabelas 3 e 4 mostram que o processo de pós hidrólise reduziu significativamente a quantidade de celobiose e proporcionou um aumento da quantidade de glicose e outros monômeros no meio. Além disso, verifica-se um aumento expressivo na concentração de xilose no licor hidrolisado. Comparando-se as condições de pré-tratamento estudadas, observa-se que a maior concentração de xilose e glicose é encontrada para a condição de temperatura mais baixa evidenciando que este parâmetro possui uma maior influência sobre a solubilização destes componentes, quando comparada ao tempo de reação.

Em relação aos produtos de degradação dos açúcares é possível estabelecer uma correlação direta com o fator de severidade do pré-tratamento, conforme mostrado no gráfico da Figura 33:

Figura 33: Formação de produtos de desidratação de açúcares em função da severidade do pré-tratamento

Observa-se que o aumento da severidade impacta diretamente na formação de furfural, hidroximetilfurfural (HMF) e ácido acético. Os dados mostram que a formação de ácido acético é mais acentuada que a formação de HMF e furfural respectivamente. Os hidrolisados apresentaram uma baixa concentração de furfural, e conforme já descrito na literatura, esta é uma característica do pré-tratamento hidrotérmico, onde é gerada significativa quantidade deste composto, porém em uma baixa concentração devido à quantidade de água usada nas reações (BOBLETER, 1994).

A perda de celulose durante o pré-tratamento é evidenciada pela formação de hidroximetilfurfural (HMF), via reação de desidratação da celulose, celobiose e glicose. Pode-se perceber que o tempo de reação, nas duas temperaturas estudadas, favorece, de forma mais pronunciada, o aumento da concentração de hidroximetilfurfural, diferentemente do que ocorre com o furfural, onde a temperatura mostra-se como parâmetro de maior relevância para a formação deste composto.

Quando se deseja utilizar o hidrolisado para fermentação de açúcares de cinco carbonos e obtenção de diversos produtos de aplicabilidade industrial, é preferível utilizar uma temperatura mais baixa e tempos menores de pré-tratamento, como por exemplo, 180°C, 20 minutos, já que nestas condições há minimização da formação de furfural e HMF, os quais, de forma geral, são inibidores da

fermentação, e, além disso, é possível obter uma maior concentração de xilose, um dos principais açúcares de cinco carbonos presentes no hidrolisado.

5.1.2 Águas de lavagem

As análises das águas de lavagem recolhidas após o pré-tratamento revelam que a quantidade de água utilizada, de 80L/kg de biomassa seca, foi eficiente para remoção de hidrolisado residual da celulignina. A Tabela 5 mostra a porcentagem de diminuição da concentração de açúcares, ácido orgânico e produtos de desidratação após o procedimento de lavagem. Para as amostras R3 e R8 foram feitas análises da concentração destes componentes após lavagem com diferentes volumes de água, e pode-se verificar um comportamento similar das amostras onde houve uma diminuição gradativa da concentração de açúcares e ácidos com o aumento da quantidade de água utilizada. Pode-se afirmar que o ácido acético, furfural e HMF são mais facilmente removidos que os açúcares, sendo necessários 40L de água para completa remoção destes produtos. Além disso, verifica-se, pelas amostras R3 e R8, que a quantidade de água na lavagem pode ser reduzida para 60L/kg de biomassa seca, sem perda de eficiência na remoção de açúcares, ácidos e inibidores.

Tabela 5: Diminuição da concentração de açúcares, ácido acético, furfural e HMF. Dados apresentados em porcentagem.

	Glicose	Xilose	Arabinose	Ac. acético	Furfural	HMF
R1 (80L)	100,00	100,00	100,00	100,00	99,79	99,82
R2 (80L)	100,00	100,00	100,00	100,00	99,87	99,85
R3 (20L)	48,90	49,36	71,29	42,79	99,75	99,72
R3 (40L)	91,92	91,85	100,00	100,00	99,76	99,72
R3 (60L)	100,00	98,69	100,00	100,00	99,74	99,72
R3 (80L)	100,00	100,00	100,00	100,00	99,76	99,73
R4 (80L)	100,00	100,00	100,00	100,00	99,90	99,90
R5 (80L)	100,00	100,00	100,00	100,00	99,87	99,90
R6 (80L)	100,00	100,00	100,00	100,00	99,72	99,63
R7 (80L)	100,00	99,42	100,00	100,00	99,84	99,76
R8 (20L)	60,81	62,74	100,00	100,00	99,84	99,65
R8 (40L)	90,31	91,41	100,00	100,00	99,90	99,77
R8 (60L)	100,00	100,00	100,00	100,00	99,90	99,79
R8 (80L)	100,00	100,00	100,00	100,00	99,78	99,65
R9 (80L)	100,00	100,00	100,00	100,00	99,89	99,57
R10 (80L)	100,00	100,00	100,00	100,00	99,95	99,76

5.1.3 Composição química do material obtido após o pré-tratamento hidrotérmico

O material pré-tratado (celulignina) (Figura 34) apresentou um escurecimento da cor em relação ao material “in natura”, analogamente ao encontrado por Curreli et al. (2002) que relataram o escurecimento da palha de trigo pré-tratada com ácido sulfúrico. Este fenômeno pode estar associado à catálise ácida das ligações do complexo lignina-carboidrato, bem como pela formação de produtos da degradação de carboidratos.

Figura 34: Mudanças de coloração ocorridas com o material pré-tratado (b) em comparação com o material in natura (a).

Os rendimentos dos pré-tratamentos, bem como a composição química do material obtido estão expostos na Tabela 6:

Tabela 6: Composição química dos materiais pré-tratados

	In natura	R1	R1*	R2	R2*	R3	R3*	R4	R4*	R5	R5*	R6	R6*	R7	R7*	R8	R8*	R9	R9*	R10	R10*
<i>Rendimento</i>	-	-	71.19	-	68.02	-	63.28	-	66.87	-	65.41	-	64.48	-	66.24	-	65.38	-	63.40	-	63.14
<i>Celulose</i>	46,51	59,20	42,14	62,41	42.45	61,81	39.11	64,69	43.26	62,23	40.70	63,57	40.99	64,06	42.43	63,19	41.31	62,70	39.75	60,82	38.40
<i>Hemicelulose</i>	24,22	9,05	6, 44	7,24	4.92	6,35	4.01	6, 12	4.09	5,38	3,51	5,10	3,29	4,40	2,91	3,76	2,46	3,18	2.02	2,96	1,87
<i>Lignina</i>	22,72	29,42	20.94	29,70	20,20	29,19	18.47	31,14	20.82	30,82	20.15	30,61	19.74	30,55	20.24	32.40	21.18	33.51	21.25	34,19	21,59
<i>Cinzas</i>	1,10	2.07	1.47	1.35	0.92	1,84	1,16	1,24	0.83	1,59	1.04	1,28	0,83	1,09	0,70	1,98	1,30	1,67	1.06	2,29	1,45
<i>Extrativos</i>	5,82	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Total</i>	100,4 ± 0,20	99.7 +0,51	-	100.7 ±0,13	-	99,2 ±0,22	-	103.2 ±0,63	-	100.0 ±0,21	-	100,6 ±0,11	-	100,1 ±0,28	-	101.3 ±0,32	-	101,1 ±0,21	-	100,3±0,40	-

* Correção pelo rendimento: (composição do componente lignocelulósico * rendimento da reação, ex: para celulose da reação R1 59,20*0,7119=42,14)

Para as reações a 180°C observa-se uma diminuição do rendimento em função do tempo de reação, diferentemente ao observado nas reações a 190°C onde o rendimento, com exceção a amostra R6, independente do tempo de reação, não apresentou significativa variação.

Além disso, a Tabela 6 mostra que a quantidade de celulose e lignina do bagaço de cana pré-tratado aumentou em relação ao bagaço de cana “in natura”, indicando um aumento proporcional destas frações devido à solubilização da fração hemicelulósica. Porém é importante ressaltar que há um rendimento específico determinado para cada condição de reação, que deve ser considerado na composição química final de cada componente lignocelulósico, como mostrado na Tabela 6 nas colunas com asterisco (*).

Para fins comparativos a Tabela 7 mostra os resultados das frações macromoleculares solubilizadas, corrigidas pelo rendimento de reação, bem como a severidade dos pré-tratamentos estudados e o pH do hidrolisado ao final da reação,.

Tabela 7: Porcentagem de Solubilização dos componentes lignocelulósicos, corrigidas pelo rendimento de reação

	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Severidade	pH
R1	9,4	73,4	7,8	3,36	3.47
R2	8,7	79,7	11,1	3,66	3.44
R3	15,9	83,4	18,7	3,83	3.40
R4	7,0	83,1	8,4	3,96	3.42
R5	12,5	85,5	11,3	4,05	3.39
R6	11,9	86,4	13,1	3,65	3.32
R7	8,8	88,0	10,9	3,95	3.28
R8	11,2	89,8	6,8	4,13	3.28
R9	14,5	91,7	6,5	4,25	3.2
R10	17,4	92,3	5,0	4,35	3.28

A partir dos dados apresentados na Tabela 7, pode-se afirmar que ocorre um gradativo aumento da severidade, devido ao efeito pronunciado do aumento da temperatura e tempo de reação.

Pode-se verificar uma alta eficiência da solubilização das hemiceluloses, com valores próximos ao descrito na literatura (ALVIRA et al, 2010). Isso ocorre principalmente devido ao caráter relativamente amorfo, grande polidispersidade e grau de polimerização bastante inferior ao da celulose nativa (geralmente não ultrapassando o valor médio de 200 unidades de açúcar), fazendo com que esta fração se torne mais susceptível ao pré-tratamento do que a fração celulósica (FENGEL; WEGENER 1989).

Comparando-se os resultados da Tabela 7, para a hemicelulose, verifica-se um aumento da solubilização com o tempo de reação, porém a solubilização é mais pronunciada considerando mesmos tempos de reação em temperaturas diferentes.

Correlacionando a severidade com o percentual de hemicelulose removida durante o pré-tratamento, obtemos o gráfico da Figura 35:

Figura 35: Correlação entre fração hemicelulósica solubilizada e o fator de severidade do pré-tratamento hidrotérmico

Esta correlação indica que a severidade está proporcionalmente relacionada com a quantidade de hemicelulose removida no pré-tratamento hidrotérmico, indicando que quanto maior a severidade do processo maior a solubilização da hemicelulose.

A utilização desta correlação nos permite comparar, quantitativamente, diferentes métodos de pré-tratamento, através do valor de coeficiente angular da reta encontrada, e prever comparativamente a eficiência de um pré-tratamento em relação a outros. Porém para uma comparação completa com outros pré-tratamentos o pH é um parâmetro que deve ser levado em conta e portanto para fins comparativos deve ser considerada a abordagem de severidade combinada descrita no item 2.5.1.1.

Quanto à celulose pode-se afirmar que tanto o tempo quanto a temperatura de reação influenciam diretamente na solubilização deste componente. Uma baixa perda de celulose é encontrada para as condições R1, R2 e R6, devido principalmente à baixa severidade do processo quando comparada as demais condições de pré-tratamento. Resultados semelhantes, com baixa perda de celulose, para o pré-tratamento hidrotérmico em diferentes condições de temperatura e tempo de reação foram reportados na literatura por Allen et al, (1996); Pérez et.al, (2007); Cara et.al, (2007).

A severidade está intrinsecamente relacionada com a perda de celulose. Pelos resultados obtidos e correlacionados na Figura 36, observa-se que em severidades abaixo de 3,7 (como no caso das reações R1, R2 e R6) a despolimerização e consequente perda de celulose é baixa, ao passo que em severidades acima deste valor verifica-se uma perda significativa deste componente, que pode quadruplicar em relação a condições de mais baixa severidade; estes dados corroboram com os resultados apresentados por Heitz et al.,(1991).

Figura 36: Correlação entre fração de celulose solubilizada e o fator de severidade do pré-tratamento hidrotérmico

Já para a lignina observa-se uma solubilização relativamente baixa, indicando que o bagaço pré-tratado contém uma alta quantidade deste componente, sendo necessária a inserção de uma etapa de deslignificação do material previamente a etapa de hidrólise enzimática, para minimizar o efeito de inibição da enzima pela lignina. Similarmente a celulose observa-se um comportamento polinomial entre a solubilização deste componente e a severidade do processo conforme mostrado na Figura 37:

Figura 37: Correlação entre fração de lignina solubilizada e o fator de severidade do pré-tratamento hidrotérmico

Verifica-se que contrariamente ao que ocorre com a celulose em severidades maiores que 3,8 há uma menor solubilização da lignina. Além da severidade, outro parâmetro importante para a sua solubilização é o pH do meio.

Outra correlação pode ser estabelecida entre a severidade, pH e conteúdo de lignina no material, conforme mostrado na Figura 38:

Figura 38: Correlações entre severidade, pH e conteúdo de lignina no material pré-tratado

A figura mostra que o pH do pré-tratamento decresce com o aumento da severidade, este fator favorece a solubilização das hemiceluloses, devido as reações de auto hidrólise que ocorrem durante o pré-tratamento. Porém quando avaliado o efeito deste parâmetro sobre a lignina verifica-se que a diminuição do pH promove um aumento do conteúdo de lignina no material devido à sua baixa solubilidade em meio ácido, que

promove sua redeposição durante o pré-tratamento, provavelmente na forma de pseudo-lignina (SAAD, 2010). Assim como verificado para a celulose, em severidade maior que 3,8 verifica-se uma expressiva diminuição do pH e também uma menor solubilização da lignina, podendo ser considerada uma severidade crítica para o pré-tratamento.

Além disso, a análise do tipo de lignina residual na fibra indica que o aumento da severidade dificulta a solubilização da lignina. A partir do material pré-tratado é possível obter a porcentagem, em massa, de lignina solúvel, mais facilmente removida e lignina insolúvel, constituídas de frações de peso moleculares maiores que a lignina solúvel e que provavelmente encontra-se condensada, composta por ligações de difícil quebra. Uma razão entre lignina solúvel por lignina insolúvel (Sol/Insol) nos fornece informações sobre a susceptibilidade de remoção da lignina presente no material pré-tratado, em etapas posteriores de tratamento, como por exemplo, a deslignificação.

É possível estabelecer uma correlação entre a lignina Sol/Insol em função da severidade do pré-tratamento, conforme mostrado na Figura 39:

Figura 39: Razão de lignina solúvel/insolúvel em função da severidade do pré-tratamento

O gráfico evidencia que o aumento da severidade dificulta a remoção de lignina, já que é observado que em altas severidades tem-se uma maior quantidade de lignina insolúvel. Em severidades mais baixa, apesar de o material pré-tratado apresentar lignina em sua composição, esta lignina residual é majoritariamente composta por lignina solúvel, constituída de pequenas frações ou ligações mais facilmente cliváveis.

5.1.4 Difração de Raios-X do bagaço pré-tratado hidrotermicamente

Muitos estudos mostram que o índice de cristalinidade dos materiais lignocelulósicos aumenta após as etapas de pré-tratamento, justificado pela remoção da hemicelulose e lignina, as quais são estruturas amorfas (CAO; TAN, 2002). Estudos de difração de raios-X foram realizados, e os resultados são mostrados nos difratogramas na Figura 40.

Figura 40: Difratogramas obtidos para as amostras de bagaço de cana in natura e pré-tratadas hidrotermicamente

Conforme citado no item 4.6.2, foi feita uma comparação dos resultados obtidos por duas metodologias e, os resultados são mostrados na Tabela 8:

Tabela 8: Comparativo de resultados de índice de cristalinidade e cristalinidade absoluta de bagaço de cana in natura e pré-tratado

	Índice de cristalinidade (*)	Cristalinidade absoluta (**)	Diferença (%)
IN	55,40	55,6	0,359712
R1	61,30	63,5	3,464567
R2	58,60	64,9	9,707242
R3	49,20	64,4	23,60248
R4	65,80	63,4	-3,78549
R5	58,50	62,7	6,698565
R6	57,20	65,3	12,40429
R7	63,40	65,5	3,206107
R8	60,80	64,5	5,736434
R9	59,60	66,1	9,833585
R10	55,70	66,9	16,74141

*conforme definido por CAO;TAN, 2002;

** conforme definido por DRIEMEIER; CALLIGARIS, 2011

Os resultados mostram que a medida de cristalinidade absoluta apresenta valores maiores do que o índice de cristalinidade. Nesta metodologia todas as possíveis interferências, tais como, direção preferencial das fibras, umidade da amostra, contribuição do porta amostra, dentre outras, são consideradas, e portanto fornecem um resultado mais refinado quando comparado ao índice de cristalinidade. Porém de uma forma geral observa-se que há uma diferença menor que 10% entre os métodos. Desta forma, optou-se por analisar as amostras subsequentes pelo índice de cristalinidade para fins comparativos com o maior volume de amostras obtidas e reportadas na literatura.

A partir do índice de cristalinidade foi calculada a diminuição da cristalinidade da celulose através da interpretação reportada no item 4.6.2.1. Os dados de cristalinidade medida, cristalinidade esperada bem como a diferença entre elas encontram-se na Tabela 9:

Tabela 9: Diferenças entre índice de cristalinidade medido e o esperado, para obtenção do parâmetro de diminuição da cristalinidade da celulose.

	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
Cristalinidade medida	63,5	64,9	64,4	63,4	62,7	65,3	65,5	64,5	66,1	66,9
Cristalinidade esperada	85,3	89,9	89,1	93,2	89,7	91,6	92,3	91,1	90,3	87,6
Diminuição da cristalinidade	21,7	25,0	24,7	29,8	27,0	26,3	26,8	26,6	24,2	20,7

Pode-se observar que para todas as condições de pré-tratamento adotadas ocorreu uma diminuição de pelo menos 20% da cristalinidade da celulose. Para as reações a 180°C verifica-se uma acentuada diminuição de até 29% da cristalinidade. Já

para as reações a 190°C (R6, R7 e R8) observa-se que não houve variação significativa no valor de diminuição da cristalinidade, e para as reações R9 e R10 verifica-se uma diminuição menos expressiva da cristalinidade.

A abordagem de cálculo apresentada no item 4.6.2.1 foi fruto de extensa discussão e não foi encontrada similaridade na literatura e expressa mais apropriadamente os resultados obtidos (MAZIERO, 2010).

Correlacionando-se os dados de diminuição da cristalinidade com a severidade do processo têm-se o seguinte gráfico:

Figura 41: Correlação entre a perda de cristalinidade da celulose e a severidade do pré-tratamento

O comportamento polinomial da Figura 41 demonstra que existe uma faixa de severidade do processo onde é possível se obter uma máxima diminuição da cristalinidade, e o aumento da severidade pode ocasionar em baixa transformação de celulose cristalina à amorfa. Observa-se uma diminuição máxima da cristalinidade de celulose em severidade de 3,8, e assim como para a lignina e celulose, esta mostra-se como uma severidade crítica, já que a celulose remanescente no material é mais cristalina e conseqüentemente mais dificilmente hidrolisada.

5.1.5 Microscopia eletrônica de varredura do bagaço pré-tratado

A Figura 42 apresenta as microscopias do bagaço in natura e submetido às diferentes condições de pré-tratamento.

Conforme observado, o bagaço in natura (IN) apresenta uma estrutura mais compacta, e comparativamente aos materiais pré-tratados observa-se uma significativa mudança morfológica do material.

Corroborando as análises químicas com as microscopias obtidas pode-se afirmar que a solubilização das hemiceluloses promove uma abertura das fibras tornando-as mais expostas e susceptíveis a hidrólise enzimática, esta característica é observada para todas as condições de pré-tratamento estudadas. Pode-se observar, principalmente, para as amostras obtidas a temperatura de 180°C que as fibras que constituem os feixes vasculares (F) são mais abertas quando comparados os mesmos tempos de reação, porém à 190°C. Analisando os dados de solubilização de lignina pode-se propor que as fibras encontram-se menos expostas nesta temperatura principalmente devido a maior conteúdo de lignina no material. Quando comparamos as condições R5 e R10, onde são utilizados mesmos tempos de reação, porém a 180°C e 190°C, respectivamente, observa-se que há uma diminuição da solubilização da lignina para a amostra R10, e pela micrografia pode-se observar também uma estrutura menos modificada quando comparada a condição R5, com maior solubilização de lignina e abertura das fibras. Além disso, verifica-se que após o pré-tratamento há uma predominância de estrutura de feixes vasculares pouco danificadas quando comparada ao parênquima (P) evidenciando a fragilidade deste tipo de célula.

Figura 42: Microscopias eletrônica de varredura dos materiais in natura (IN) e pré-tratados nas condições R1,R2,R3,R4,R5,R6,R7,R8,R9,e R10, evidenciando as modificações nos feixes vasculares (F) e nas células de parênquima (P). Barra de escala em 100 μm

Uma análise dos cortes transversais do bagaço de cana in natura (Figura 43a) e pré-tratado na condição R2 (Figura 43b) evidenciam que a estrutura dos feixes vasculares é preservada, com poucas deformações após o pré-tratamento, diferentemente das células de parênquima que, majoritariamente, perdem suas características estruturais e morfológicas.

Figura 43: Microscopia eletrônica de varredura da seção transversal do (a) material in natura (IN) e (b) pré-tratado na condição R2. Barra de escala em 100 µm.

5.1.6 Análise termogravimétrica

Comparando-se as curvas TG/DTG (Figura 44a e 44b) de degradação térmica do bagaço *in natura* (IN) com todas as amostras de bagaço pré-tratado, nota-se que a principal diferença, está relacionada com o desaparecimento do pico referente à degradação da hemicelulose. Na Figura 44a, pode-se observar na curva TG da amostra in natura que há uma região de perda de massa entre 203°C e 329°C, enquanto que para todas as outras amostras o início da degradação ocorre em temperaturas mais altas. Pelas curvas DTG (Figura 44b) nota-se também que há um deslocamento da temperatura de degradação da lignina para todas as amostras pré-tratadas. O pico da DTG do bagaço in natura encontra-se em 404°C e para as demais amostras o pico da DTG está acima de 435°C, evidenciando que o processo de pré-tratamento pode causar modificações na estrutura da lignina.

Figura 44: (a) Curvas TG para o bagaço in natura e pré-tratado em diferentes condições de reação, (b) Curvas de DTG dos materiais in natura e pré-tratados

Para cada uma das amostras foram determinadas a energia de ativação e o fator pré-exponencial. Estes valores estão apresentados na Tabela 10:

Tabela 10: Parâmetros cinéticos de combustão dos materiais in natura e pré- tratados

amostra	Ea (Kj/mol)	A (min ⁻¹)	R quad.
IN	88782.459	3.12E+05	0.9718
R1	120357.484	1.13E+08	0.8835
R2	134588.244	1.88E+09	0.8050
R3	163147.725	7.39E+11	0.8220
R4	158540.740	2.29E+11	0.8325
R5	112012.367	1.15E+07	0.8695
R6	121996.968	7.60E+07	0.9222
R7	178367.723	1.47E+13	0.4220
R8	124551.054	1.58E+08	0.9359
R9	225023.975	1.76E+17	0.8507
R10	245832.446	1.53E+19	0.8605

Observa-se na Tabela 10 que todas as amostras pré-tratadas apresentaram fator pré-exponencial e energia de ativação superior à In natura. Correlacionando-se este parâmetro com a severidade do processo de pré-tratamento é possível obter uma relação linear, conforme mostrado na Figura 45:

Figura 45: Correlação linear obtida entre a energia de ativação e a severidade do pré-tratamento hidrotérmico

Observa-se pelo gráfico, que quanto mais severa é a condição de pré-tratamento maior é a energia de ativação da reação de queima do material. Esta característica corrobora com os dados de solubilização de hemicelulose em função do aumento da severidade, demonstrando que a maior remoção deste componente aumenta a quantidade dos demais componentes lignocelulósicos no material pré-tratado, os quais

são degradados em temperaturas mais elevadas. Apesar do aumento da energia de ativação pode-se afirmar que o material pré-tratado pode fornecer maior energia que o material in natura; quando compara-se o poder calorífico superior do bagaço de cana in natura com o material pré-tratado observa-se que há um aumento no valor. Esta análise foi feita para a amostra R8, onde, comparado ao bagaço in natura o poder calorífico superior aumentou de 16990 J/g para 17918 J/g. O valor encontrado de PCS para o material in natura corrobora com o valor descrito na literatura por Cortez; Lora; Gómez, 2008 apud Jetkins, 1990.

5.1.7 Composição química do material obtido após deslignificação

Ao contrário do que ocorre com o material após o pré-tratamento, a deslignificação promoveu um clareamento da polpa obtida (Figura 46). Este clareamento está associado à grande quantidade de lignina removida na etapa de deslignificação (MUSSATO et al., 2006), que neste caso alcançou aproximadamente 78% (Tabela 12).

Figura 46: Mudanças de coloração ocorridas com o material pré-tratado (b), deslignificado (c) em comparação com o material in natura (a).

Na Tabela 11 encontram-se os dados de composição química dos materiais deslignificados juntamente com sua composição corrigida pelo rendimento (coluna indicada com um asterisco *)

Tabela 11: Composição química dos componentes lignocelulósicos de bagaço de cana após deslignificação alcalina

	InD #	R1	R1*	R2	R2*	R3	R3*	R4	R4*	R5	R5*	R6	R6*	R7	R7*	R8	R8*	R9	R9*	R10	R10*
Rendimento	56,56	-	56,64	-	56,87	-	46,29	-	54,23	-	50,38	-	53,31	-	51,76	-	55,21	-	46,9	-	46,96
Celulose	34,90	79,76	45,17	79,31	45,10	76,26	35,30	79,54	43,13	76,77	38,7	84,12	44,85	83,53	43,23	82,78	45,70	85,22	39,97	80,71	37,90
Hemicelulose	16,35	4,80	2,72	3,77	2,14	3,41	1,58	3,29	1,78	3,02	1,67	3,14	1,68	2,90	1,50	1,91	1,06	2,03	0,95	1,86	0,87
Lignina	6,72	13,84	7,84	15,24	8,66	15,73	7,28	15,61	8,47	20,44	10,3	11,89	6,34	11,59	6,00	13,49	7,45	12,65	5,94	15,82	7,43
Cinzas	0,28	1,01	0,57	1,02	0,59	4,25	1,97	1,27	0,69	1,44	0,73	1,23	0,65	1,25	0,64	2,23	1,23	1,38	0,65	2,10	0,99
Total	-	99,4 ±0,21	-	99,3 ±0,10	-	99,7 ±0,05	-	99,7 ±0,13	-	101,7 ±0,22	-	100,4 ±0,11	-	99,3 ±0,23	-	100,3 ±0,31	-	101,3 ±0,10	-	100,5±0,18	-

* Correção pelo rendimento: (composição do componente lignocelulósico * rendimento da reação, ex: para celulose da reação R1P 79,76*0,5664=45,17)

InD: bagaço in natura deslignificado

A Tabela 12 mostra o percentual das frações lignocelulósicas solubilizadas durante a deslignificação:

Tabela 12: Frações lignocelulósicas solubilizadas após deslignificação, corrigidas pelo rendimento

	Celulose	Hemicelulose	Lignina
R1	23,7	70,0	73,4
R2	27,7	70,4	70,8
R3	42,9	75,1	75,1
R4	33,3	70,8	72,8
R5	37,8	71,7	66,6
R6	29,5	67,2	79,3
R7	32,5	65,9	80,4
R8	27,7	72,0	77,0
R9	36,3	70,1	82,3
R10	33,7	68,6	76,9
In D	24,01	34,25	70,67

O rendimento médio das reações de deslignificação (Tabela 11) foi em torno de 55%, e diferentemente do que ocorre no pré-tratamento nota-se uma aleatoriedade dos rendimentos obtidos, já que todas as reações de deslignificação foram realizadas nas mesmas condições; e, isto indica que as condições de pré-tratamento adotadas não influenciam diretamente no rendimento da deslignificação.

Pelos resultados da Tabela 12 pode-se afirmar que a deslignificação foi eficiente, solubilizando em média 75% da lignina da polpa que será submetida à hidrólise enzimática. Além disso, verifica-se que a deslignificação teve atuação similar independente do material pré-tratado, já que ao final do processo o percentual de lignina na polpa foi muito próximo (em torno de 7-9%) e as polpas obtidas apresentaram baixo teor de hemicelulose (em torno de 2%). Para a amostra de bagaço in natura deslignificado observa-se que o teor de lignina na polpa é menor do que nas amostras pré-tratadas. Como não houve uma etapa prévia de pré-tratamento, a lignina não sofreu reações de condensação e, portanto neste caso a remoção é facilitada. Porém há uma quantidade significativa de hemiceluloses (15%) que não foram removidas na deslignificação e que podem prejudicar a etapa subsequente de hidrólise enzimática.

Um aspecto negativo observado na deslignificação é a significativa solubilização da celulose independente da condição de pré-tratamento. Isso ocorre,

devido à hidrólise alcalina e reações de peeling, as quais promovem a cisão da cadeia polimérica, decrescendo drasticamente seu comprimento médio; e nas reações de peeling, as unidades de açúcar com extremidades redutoras das cadeias de polissacarídeos são removidas e, além da perda de açúcares, os carboidratos removidos são convertidos em diversos ácidos orgânicos hidroxilados, os quais reduzem a concentração de álcali efetivo no licor de cozimento (BERGGREN et al., 2003; KNILL; KENNEDY, 2003). Portanto para minimizar a perda deste componente, as condições de deslignificação adotadas devem ser otimizadas.

5.1.8 Difração de Raios-X do material deslignificado

Os materiais in natura e pré-tratados/deslignificados foram submetidos a análises de raios-X, e na Figura 47 encontram-se os difratogramas obtidos:

Figura 47: Difratogramas das amostras pré-tratadas submetidas à deslignificação alcalina

Analogamente as amostras pré-tratadas foi obtido o índice de cristalinidade e através da interpretação deste dado foram obtidos os resultados da Tabela 13:

Tabela 13: Diferenças entre índice de cristalinidade medido e o esperado, para obtenção do parâmetro de diminuição da cristalinidade da celulose de bagaço deslignificado

	R1D	R2D	R3D	R4D	R5D	R6D	R7D	R8D	R9D	R10D	IND
Cristalinidade medida	73,0	75,0	74,2	72,9	74,7	77,3	76,5	76,5	76,5	76,5	67,0
Cristalinidade esperada	103,2	99,3	95,7	93,9	93,2	96,7	98,5	101,8	106,1	107,0	82,0
Diminuição da cristalinidade	30,2	24,3	21,5	21,0	18,5	19,4	22,0	25,3	29,6	30,5	15,0

Observa-se pela Tabela 13 que a deslignificação promove uma diminuição da cristalinidade, que torna-se mais acentuada para as amostras pré-tratadas a 190°C. Como para todas as amostras a 190°C a solubilização da celulose foi bastante expressiva (em torno de 40%), pode-se dizer que os 60% de celulose restante na fibra sofreu significativa transformação de cristalina para amorfa, diferentemente ao que ocorreu com as amostras pré-tratadas a 180°C. Neste caso podemos afirmar que apesar da deslignificação ter sido realizada nas mesmas condições para todas as amostras, a temperatura de pré-tratamento adotada teve influência direta na diminuição da cristalinidade ocorrida na etapa de deslignificação.

5.1.9 Análise termogravimétrica (TGA) do bagaço deslignificado

A principal diferença entre o bagaço *in natura* deslignificado com as demais amostras, está relacionada com o desaparecimento do pico referente à degradação da hemicelulose. Na Figura 48a, pode-se observar na curva TG da amostra *in natura* que há uma região de perda de massa entre 273°C e 329°C, enquanto que para todas as outras amostras o início da degradação ocorre em temperaturas mais altas. Pelas curvas DTG (Figura 48b) nota-se uma similaridade da temperatura de degradação da lignina para todas as amostras, o que demonstra que o processo de deslignificação ocorreu de forma similar tanto para o bagaço *in natura* quanto para materiais pré-tratados.

Figura 48: (a) Curvas TG para o bagaço in natura e deslignificado em diferentes condições de reação, (b) Curvas de DTG dos materiais in natura e deslignificados

Para cada uma das amostras foram determinados a energia de ativação e o fator pré-exponencial. Estes valores estão apresentados na Tabela 14:

Tabela 14: Parâmetros cinéticos obtidos para as amostras in natura e pré-tratadas ambas submetidas à deslignificação.

amostras	Ea (Kj/mol)	A (min ⁻¹)	R quad.
IND	125747	5.74E+08	0.925898
R1D	126523	3.88E+08	0.868133
R2D	147737	2.37E+10	0.836049
R3D	165805	1.41E+12	0.817367
R4D	174990	6.55E+12	0.822229
R5D	101107	1.26E+06	0.919848
R6D	194554	2.53E+14	0.838714
R7D	188082	1.03E+14	0.835649
R8D	162036	5.28E+11	0.841634
R9D	151223	5.97E+10	0.791209
R10D	181674	2.48E+13	0.819729

Assim como encontrado para os materiais pré-tratados observa-se que a energia de ativação e o fator pré-exponencial aumentam em relação ao material in natura deslignificado. Similarmente aos materiais pré-tratados, isso ocorre devido à solubilização das hemiceluloses e modificações das ligações da lignina. Neste caso, diferentemente ao encontrado para o bagaço pré-tratado na condição R8, o poder calorífico desta mesma amostra deslignificada é menor que o encontrado para o bagaço in natura, sendo de 15800 J/g. A diminuição do poder calorífico está associada a remoção de lignina, que dentre os componentes lignocelulósicos apresenta o maior quantidade de carbono e menor quantidade de oxigênio, e consequentemente maior poder calorífico (SANTOS et al, 2011).

5.1.10 Microscopia eletrônica de varredura do bagaço deslignificado

A análise das microscopias (Figura 49) revela diferenças morfológicas apresentadas pelo bagaço de cana após o processo de deslignificação.

Comparando-se as microscopias do bagaço pré-tratado com o bagaço apenas deslignificado observa-se que o processo de deslignificação pode promover além de uma maior abertura das fibras uma redução considerável no tamanho da mesma.

De uma forma geral nota-se que os pré-tratamentos realizados a 180°C apresentaram uma maior modificação em relação a abertura das fibras e diminuição das partículas.

Além disso, observam-se apenas feixes vasculares indicando que as células de parênquima perderam completamente suas características morfológicas.

Figura 49: Micrografias do bagaço de cana de açúcar IN e após pré-tratamento hidrotérmico, seguido de deslignificação alcalina (continua). Barra de escala em 100 μm

Figura 49 (Continuação): Micrografias do bagaço de cana de açúcar IN e após pré-tratamento hidrotérmico, seguido de deslignificação alcalina. Barra de escala em 100 μm

5.1.11 Análise global de solubilização dos componentes lignocelulósicos e diminuição da cristalinidade

Foi feita uma análise de perdas totais dos componentes macromoleculares, bem como uma análise da diminuição da cristalinidade da celulose, levando-se em conta as duas etapas (pré-tratamento e deslignificação) realizadas previamente a hidrólise enzimática. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 15:

Tabela 15: Análise global de perdas, considerando o pré-tratamento e a deslignificação alcalina

	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Diminuição da cristalinidade
R1	31,6	92,1	76,2	51,91
R2	31,1	93,7	73,5	49,38
R3	52,5	95,9	80,4	46,19
R4	33,7	94,7	73,9	50,81
R5	50,3	96,2	73,5	45,46
R6	37,8	95,5	82,4	45,70
R7	38,6	95,9	82,9	48,81
R8	35,1	97,1	78,8	51,84
R9	45,8	97,5	83,9	53,81
R10	49,0	97,7	80,0	51,19
In D	31,6	92,1	76,2	15,00

A solubilização dos componentes macromoleculares após o pré-tratamento seguido de deslignificação alcalina, revelam uma efetiva remoção de hemicelulose e lignina. Em geral 95% da hemicelulose e 75% da lignina presentes no material foram removidos após a combinação de tratamentos. Isso indica que o material remanescente apresenta majoritariamente celulose em sua composição com mínimas quantidades de constituintes que atuam como inibidores na etapa seguinte de hidrólise enzimática. O material apenas deslignificado apresentou uma significativa remoção de lignina, porém baixa solubilização de hemicelulose. Apesar da efetiva solubilização de lignina, em torno de 70%, observa-se que este resultado é menor quando comparado ao processo integrado de pré-tratamento seguido de deslignificação, indicando que a lignina também é solubilizada, em pequenas frações, durante o pré-tratamento. Em relação à celulose, observa-se que para todas as condições analisadas houve uma significativa remoção deste componente após os tratamentos. Tal fato desfavorece o rendimento global do processo de obtenção de etanol, já que a solubilização de celulose representa perda de matéria-prima para a etapa de hidrólise enzimática e consequentemente menor obtenção de açúcar e conversão deste à etanol. Observa-se que a amostra apenas deslignificada (InD) apresentou grande perda de celulose e corroborando-se com os dados de solubilização deste componente após o pré-tratamento e após a deslignificação pode-se afirmar que o processo de deslignificação apresenta maior impacto sobre a remoção de celulose do que o pré-tratamento. Além disso, os resultados mostram que apenas o processo de deslignificação não promove uma diminuição significativa da perda de cristalinidade da celulose, sendo que a combinação de tratamentos contribui para uma diminuição de até 50% da cristalinidade da celulose em contrapartida aos 15% obtidos após o processo de deslignificação.

Os resultados mais significativos, com mínimas perdas de celulose e maior solubilização de hemicelulose e lignina, foram obtidos para a amostra R2, onde obteve-se uma perda de 29% de celulose, 93% de hemicelulose, 72% de lignina e 49% de diminuição da cristalinidade da celulose. Ou seja, esta condição de pré-tratamento seguida de deslignificação apresenta-se como promissora para obtenção de maior conversão de celulose a açúcar com maior susceptibilidade de acesso da enzima à fibra e com mínimas interferências de componentes inibidores da hidrólise enzimática.

5.1.12 Hidrólise enzimática

A conversão de celulose à glicose foi avaliada após a hidrólise enzimática dos materiais in natura, somente pré-tratado e matérias submetidos à pré-tratamento seguido de deslignificação. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 16:

Tabela 16: Conversão enzimática o bagaço in natura e pré-tratados/deslignificados

	Pré-tratado		Deslignificado	
	Conversão (%)	Conversão corrigida (%)	Conversão (%)	Conversão corrigida (%)
R1	33,21	31,47	87,44	59,78
R2	43,57	41,61	88,45	60,95
R3	33,98	29,89	90,85	43,13
R4	29,79	28,99	85,27	56,55
R5	37,72	34,55	94,96	47,17
R6	38,43	35,44	83,75	52,05
R7	40,82	38,97	83,02	50,99
R8	44,07	40,96	78,33	50,83
R9	42,44	37,95	82,21	44,59
R10	41,54	35,89	83,87	42,74
IN	8,52	8,52	48,98	37,22

Pode-se perceber que a conversão em glicose do bagaço in natura (IN) é baixa devido à recalcitrância do material e dificuldade de acesso da enzima à celulose, que está envolta na matriz com hemicelulose e lignina.

Quando o bagaço é submetido a uma deslignificação prévia à hidrólise enzimática, observa-se um aumento considerável da conversão enzimática (48,98%) devido à remoção de lignina e diminuição da cristalinidade da celulose. Porém para obtenção do valor real de conversão enzimática devem-se levar em conta as perdas de matéria-prima, neste caso, celulose, que ocorreram durante os tratamentos. Ao comparar dois resultados obtidos, como por exemplo, a condição R2 e R5, observa-se que R5 apresentou maior valor de conversão enzimática, porém considerando-se hipoteticamente 100g de celulose que foram processadas pelo pré-tratamento e deslignificação, destas condições, tem-se uma perda global de 30 e 50%, que nos fornece ao final do processo 70g e 50g de celulose respectivamente. Assim, submetendo-se esta massa de celulose a hidrólise enzimática, obtém-se conversões de 88% e 94%, as quais fornecem aproximadamente 60g e 47g de glicose. Portanto, apesar de apresentar uma maior conversão enzimática a condição R5 apresenta um rendimento real em glicose menor que a condição R2, quando consideramos as perdas globais do processo. Esta abordagem foi aplicada a todas as condições, e os resultados são mostrados na Tabela 16.

Para todas as condições avaliadas observa-se que a conversão enzimática do material pré-tratado é inferior à obtida para os mesmos materiais após o processo de deslignificação. A combinação de tratamentos pode melhorar a conversão enzimática em até 60%; e, em casos menos significativos este aumento chega a 37%, evidenciando a eficácia dos pré-tratamentos, devido principalmente a remoção de lignina e hemicelulose, obtendo-se um material remanescente com maior porcentagem mássica de celulose quando comparado ao material apenas pré-tratado. Portanto pode-se afirmar que a remoção de lignina e hemicelulose pelas etapas de pré-tratamento e deslignificação provocam uma extensa mudança na estrutura morfológica da biomassa tornando-a mais acessível às enzimas celulolíticas e proporcionando, portanto, um aumento da digestibilidade enzimática nos processos de conversão em glicose e consequentemente em etanol.

Os resultados revelam que a condição R2 apresenta maior conversão de celulose à glicose, mostrando-se, novamente, como promissora para o processamento do bagaço a etanol.

5.2 SAXS aplicado a líquidos- análise de ligninas

Visando a aplicabilidade do conceito de biorrefinaria, o licor negro, rico em lignina obtido após a deslignificação dos materiais *in natura* e pré-tratados, foi caracterizado quanto a sua natureza fractal e raio de giro.

A caracterização da macromolécula é primordial quando se pretende utilizá-la como matéria-prima em aplicações industriais. A padronização da matéria-prima é fundamental no controle da qualidade e dos sistemas que pretendam atingir a qualidade total.

Como a lignina é obtida de biomassa e pode ter composição variada de acordo com tipo de biomassa, sazonalidade, regiões da planta de onde é extraída e formas de extração, a minimização da variação de composição é desejada. No caso de obtenção de lignina através de processos integrados com a produção de etanol celulósico, uma forma de minimizar as mudanças que podem ocorrer na estrutura da macromolécula é avaliar a influência das condições do pré-tratamento e deslignificação sobre a característica intrínseca da lignina. Dentro deste contexto, a Tabela 17 apresenta alguns parâmetros característicos das ligninas obtidas da deslignificação do bagaço *in natura* e dos materiais pré-tratados.

Tabela 17: Valores do raio de giro (Rg) das ligninas em solução (em nm)

amostra	Rg (mol. Menores)	Rg (mol. Maiores)
R1D	13,80	239,03
R2D	16,44	237,97
R3D	14,03	235,42
R4D	12,33	238,09
R5D	15,62	236,50
R6D	13,70	237,29
R7D	15,57	234,92
R8D	14,44	251,79
R9D	13,40	235,75
R10D	12,55	232,05
IND	13,40	238,09

A lignina é uma macromolécula que possui polidispersidade e, devido a esta característica as curvas de Guinier das amostras, $I(q) \times q^2$ foi dividida em regiões de alto “ q ” e de baixo “ q ” para determinação do raio de giro das moléculas menores e maiores, respectivamente.

Conforme dados da Tabela 17 verifica-se que a lignina obtida após deslignificação do material in natura (IND) apresenta raio de giro de 13,4 para moléculas menores e 238,09 para moléculas maiores, evidenciando que no licor obtido temos uma expressiva distribuição de tamanho de moléculas. É possível perceber que independente do tipo de pré-tratamento adotado não há mudanças significativas no raio de giro das moléculas, com exceção a amostra R10 que apresentou os menores raios de giro, indicando que apenas pré-tratamentos com alta severidade influenciam nas características estruturais da lignina obtida após deslignificação nas condições estudadas.

Outra característica da lignina é sua natureza fractal; na Tabela 18 encontram-se os dados de coeficiente angular da lei de potência:

Tabela 18: Análise do coeficiente angular da curva obtida da lei de potencia para caracterização da natureza fractal das ligninas.

Amostra	Angular (α)
IN	2,90
R1	2,88
R2	2,85
R3	2,84
R4	2,84
R5	2,88
R6	2,87
R7	2,80
R8	2,85
R9	2,89
R10	2,76

Pelos valores de α é possível afirmar que a lignina é um fractal de massa, ou seja, é uma estrutura ramificada (semelhante a uma árvore). Pode-se verificar que há uma similaridade dos valores encontrados demonstrando que o pré-tratamento não interfere na natureza fractal das ligninas, corroborando com os dados obtidos de raio de giro. Somente a amostra R10 possui uma discrepância no resultado obtido sendo um indicativo de uma estrutura ramificada “mais aberta” do que as demais, pois quanto mais próximo de 3 o valor de α mais a amostra tende a ter um comportamento não-fractal (compacto), como um sólido (SENESI et al., 1997).

Além das ligninas obtidas das condições analisadas para o pré-tratamento hidrotérmico, foram feitas medidas de ligninas de bagaço e palha de cana-de-açúcar, obtidas em diferentes condições de extração conforme detalhado no item 4.6.1. A Figura 50 mostra os gráficos obtidos agrupados por tipo de biomassa e tratamento realizado:

Figura 50: Gráfico de $\log I(q) \times \log (q)$, mostrando as diferenças de raio de giro e modelagem das diferentes ligninas analisadas por SAXS

Os gráficos evidenciam a discrepância no comportamento das ligninas obtidas de diferentes biomassas e tratamentos. Observa-se, assim como esperado para amostras polidispersas, curvas com pelo menos dois coeficientes angulares distintos, que evidenciam a contribuição de partículas coloidais e outras maiores como os agregados.

Utilizando-se a equação de Beauce em dois níveis estruturais, foram obtidos os dados da Tabela 19, abaixo:

Tabela 19: Parâmetros de ligninas de bagaço e palha de cana obtidas por diferentes métodos de extração

Amostras	Rg (nm)	Dm	R (nm)	P2	Modelo de ajuste
LBA	17.31	2.38	x	x	Fractal (1)
LBS	46.29	2.88	1.76	2	Fractal (1) + disco (s)
LBH	48.83	2.79	2.11	2	Fractal (1) + disco(s)
LPS200	>50	3.3 /Ds = 2.7	2.2	2	Beauce dois níveis
LPS190	>50	2.57	2.6	2	Beauce dois níveis
LPS180	>50	2.57	2.3	2	Beauce dois níveis
LPAN	>50	3.2 / DS=2.8	1.8	2.8	Beauce dois níveis
LPANAQ	>50	2.9	8	2.8	Beauce dois níveis

A lignina de bagaço obtida de pré-tratamento ácido (LBA) apresenta o menor raio de giro dos agregados, apresentando a menor fragmentação comparada aos demais pré-tratamentos. O modelo que melhor descreveu os dados experimentais foi de fractal para a LBA, sendo as demais modeladas como fractal com contribuição de partículas coloidais em forma de discos, conforme confirmado por $\text{Porod} = 2$. Comparando-se a LBS com a LBH pode-se afirmar que a LBH apresentou a menor fragmentação tanto dos agregados (apresentando o maior raio de giro de 48 nm) quanto das partículas coloidais (com r_g de 2 nm).

Já as ligninas de palha obtida após pré-tratamento de explosão a vapor seguida de mesma condição de deslignificação não apresentaram mudanças significativas em relação ao raio de giro, tanto dos agregados quanto das partículas coloidais. Uma diferença marcante observada é em relação à natureza fractal, onde pode-se perceber que em uma condição mais severa de pré-tratamento os agregados de lignina apresentam-se como fractal de superfície, diferentemente das condições mais brandas de pré-tratamento onde as ligninas são fractais de massa. Pelos valores de P (Porod) podemos afirmar que as ligninas possuem uma morfologia de discos. Quando consideramos as ligninas de palha obtidas de uma mesma condição de pré-tratamento, porém diferentes métodos de deslignificação, podemos perceber que para as partículas coloidais há uma discrepância marcante no tamanho, percebe-se que a deslignificação apenas com soda libera na solução partículas aproximadamente 4 vezes menores do que na deslignificação soda antraquinona, como a antraquinona é adicionada ao meio reacional com finalidade de proteger a celulose das reações de peeling durante a deslignificação, espera-se uma menor modificação da lignina nestas condições, o que corrobora com o resultado apresentado.

Uma comparação realizada para verificar a influência da mudança do tipo de biomassa revela um resultado bastante interessante, evidenciando uma diferença marcante entre a lignina de bagaço e de palha obtidas nas mesmas condições de pré-tratamento e deslignificação. Percebe-se que os agregados de palha são maiores do que os agregados de lignina de bagaço, além disso, em ambos os tipos de pré-tratamento a lignina de palha possui uma natureza fractal diferente da lignina de bagaço, apresentando-se como fractal de superfície e a lignina de bagaço como fractal de massa.

Levando-se em conta as aplicações industriais os resultados obtidos são extremamente importantes, já que pode-se adequar os tratamentos de acordo com o tipo de lignina desejado para determinadas reações. Por exemplo, quando se deseja

utilizar a lignina para reações de oxidação para obtenção de dispersantes ou vanilina, é interessante partir de uma lignina (matéria-prima) mais fragmentada, para aumentar a reatividade e facilitar a abertura dos anéis aromáticos e consequentemente obter-se um maior rendimento de processo. Então neste caso, a melhor lignina para este fim, seria uma lignina de bagaço submetida a um pré-tratamento ácido. Mas se a aplicação for, por exemplo, lignina como membranas o ideal será utilizar uma lignina menos modificada e fragmentada, neste caso a lignina de palha obtida com pré-tratamento ácido e deslignificação soda/antraquinona.

5.3 Palha de cana-de-açúcar

5.3.1 Análises do Hidrolisado do pré-tratamento hidrotérmico

A análise do licor hidrolisado (Tabela 20) revela a maior solubilização da xilose em relação aos demais componentes, evidenciando que o pré-tratamento atua preferencialmente na solubilização da hemicelulose. Observa-se um aumento de até 2 vezes na quantidade de xilose solubilizada quando consideram-se os mesmos tempos de reação em temperaturas diferentes, corroborando-se com LASER et al. (2002) que descreve a maior propensão à degradação térmica da hemicelulose em relação a celulose e lignina.

Além disso, observa-se um aumento significativo da solubilização de glicose com o aumento de temperatura da reação, assim como a formação de produtos de desidratação deste componente.

Tabela 20: Caracterização do licor bruto obtido do pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana

LICOR HIDROLISADO									
	Celobiose	Ac. glucoronico	Glicose	Xilose	Arabinose	Ac. formico	Ac. acético	Furfural	HMF
R1	0,152	0,030	1,780	1,779	0,739	0,000	0,000	0,015	0,082
R2	0,145	0,040	0,269	1,089	0,855	0,000	0,593	0,038	0,061
R3	0,144	0,033	0,187	1,393	0,588	0,000	0,603	0,012	0,026
R4	0,158	0,125	0,217	1,893	0,782	0,000	0,666	0,068	0,023
R5	0,155	0,131	0,182	1,602	0,641	0,000	0,656	0,175	0,022
R6	0,145	0,254	0,211	2,433	0,763	0,031	0,956	0,590	0,024
R7	0,987	0,369	0,195	2,311	0,700	0,038	1,114	0,703	0,020
R8	1,255	0,547	0,203	3,831	0,838	0,026	1,124	1,005	0,024
R9	1,256	0,699	2,014	4,764	0,886	0,032	1,129	1,007	0,037
R10	1,265	0,888	2,212	4,846	0,891	0,050	1,127	1,083	0,026

A Figura 51 mostra o comportamento de solubilização de produtos de desidratação de hemicelulose e celulose em função da severidade da reação.

Figura 51: Correlação da formação dos produtos de degradação de açúcares (ácido acético, furfural e HMF) em função da severidade do pré-tratamento

Nota-se um expressivo aumento da solubilização de ácido acético e furfural em função da severidade, diferentemente ao observado para o hidroximetilfurfural, o qual não apresentou variação significativa de formação considerando o limite de severidade estudado. Pode-se afirmar que a degradação de açúcares provenientes da hemicelulose ocorre de forma mais rápida do que para os açúcares provenientes da celulose. Portanto, quando se deseja utilizar o hidrolisado como matéria-prima para obtenção de outros produtos, devem ser selecionados tratamentos com baixa severidade para minimizar perdas de açúcares e formação de compostos de desidratação dos mesmos.

5.3.2 Composição química da palha pré-tratada

A Figura 52 mostra as diferenças na coloração e na estrutura da palha após o pré-tratamento.

Figura 52: Mudanças morfológicas ocorridas com a palha de cana após o pré-tratamento hidrotérmico

Pelos dados da Tabela 21 observa-se uma diminuição do rendimento em função do aumento da temperatura e tempo de reação indicando que há uma maior solubilização dos componentes lignocelulósicos com o aumento destas duas variáveis.

Tabela 21: Caracterização química da palha de cana in natura e pré-tratada hidrotermicamente em diferentes condições de reação

	In natura	R1	R1*	R2	R2*	R3	R3*	R4	R4*	R5	R5*	R6	R6*	R7	R7*	R8	R8*	R9	R9*	R10	R10*
Rendimento	-	-	82,89	-	78,91	-	76,92	-	75,62	-	76,92	-	69,3	-	60,86	-	58,56	-	57,26	-	55,05
Celulose	39,12	39,78	32,97	41,32	32,61	41,37	31,82	42,82	32,38	42,39	32,61	46,04	31,91	50,06	30,47	50,56	29,61	53,51	30,64	51,59	28,40
Hemicelulose	27,17	27,22	22,56	27,08	21,37	26,49	20,38	27,72	20,96	26,15	20,11	19,74	13,68	17,43	10,61	13,96	8,17	9,01	5,16	7,91	4,35
Lignina	25,75	28,66	23,76	29,11	22,97	27,82	21,40	25,4	19,21	25,52	19,63	27,29	18,91	27,57	16,78	29,82	17,46	28,92	16,56	33,83	18,62
Cinzas	3,29	4,03	3,34	3,77	2,97	4	3,08	3,19	2,41	3,13	2,41	3,91	2,71	3,79	2,31	4,85	2,84	5,8	3,32	5,34	2,94
Extrativos	4,58	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	100,3 ± 0,12	99.7 +0,30	-	101,3 ±0,21	-	99,7 ±0,42	-	99,13±0,13	-	97,19 ±0,51	-	97±0,81	-	98,85 ±0,71	-	99,19 ±0,25	-	97,24±0,61	-	98,67±0,42	-

* Correção pelo rendimento: (composição do componente lignocelulósico X rendimento da reação, ex: para celulose da reação R1 39,78 *0,82,89=32,97)

Para fins comparativos a Tabela 22 mostra a fração dos componentes macromoleculares solubilizadas, corrigidas pelo rendimento das reações.

Tabela 22: Solubilização dos componentes lignocelulósicos (%), corrigidas pelo rendimento de reação.

	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Severidade	pH
R1	15,70	16,94	7,56	2,77	5,30
R2	16,66	21,35	10,60	3,07	3,35
R3	18,66	25,03	16,73	3,24	4,69
R4	17,24	25,64	25,27	3,37	4,49
R5	16,65	25,95	23,62	3,47	4,60
R6	18,44	49,66	26,41	3,36	4,25
R7	22,12	60,95	34,71	3,66	3,57
R8	24,32	69,91	32,06	3,83	3,80
R9	21,68	81,01	35,56	3,96	3,85
R10	27,41	83,98	27,54	4,05	3,94

Pode-se observar uma expressiva solubilização de hemicelulose para condições mais severas de reação. Porém nota-se que o aumento da severidade do pré-tratamento promove uma significativa remoção de celulose, que para a condição mais severa atingiu 27% de solubilização. Considerando que o pré-tratamento é a primeira etapa do processo combinado com a deslignificação alcalina pode-se dizer que, para a palha, a utilização de condições mais severas para aumentar a solubilização de hemicelulose impacta diretamente em perdas consideráveis de celulose, desfavorecendo-se assim, reações de pré-tratamento muito severas.

A correlação entre solubilização de componentes lignocelulósicos com a severidade do pré-tratamento revela que para a hemicelulose há um comportamento linear destas variáveis evidenciando que quanto maior a severidade do processo maior a solubilização deste componente (Figura 53).

Figura 53: Correlação linear entre a solubilização de hemicelulose, reportada como perda de hemicelulose (%) em função da severidade do pré-tratamento

Resultados similares foram obtidos para a solubilização de celulose em função da severidade. Observa-se novamente um perfil linear, indicando que o aumento da severidade contribui para o aumento de celulose solubilizada durante o pré-tratamento. Comparando-se os coeficientes angulares da Figura 53 e 54 nota-se que o mesmo é mais acentuado para a hemicelulose, novamente evidenciando que apesar da celulose ser removida no pré-tratamento a solubilização é mais expressiva para a hemicelulose.

Figura 54: Correlação linear entre a solubilização de celulose, reportada como perda de celulose (%) em função da severidade do pré-tratamento

Já para a lignina obtém-se um comportamento polinomial entre a solubilização deste componente com a severidade do processo (Figura 55). Observa-se que para severidade acima de 3,8 há uma diminuição da solubilização deste componente.

Figura 55: Correlação polinomial entre a solubilização de lignina, reportada como perda de lignina (%) em função da severidade do pré-tratamento

Quanto maior a remoção deste componente maior a exposição das fibras de celulose e acessibilidade das enzimas na etapa de hidrólise enzimática, logo quanto maior a quantidade de lignina removida melhor para o processamento da biomassa a etanol, neste caso, para a palha, devem-se considerar severidades menores que 3,8 onde é possível remover uma maior quantidade de lignina, e minimizar as perdas de celulose.

5.3.3 Difração de raios-X da palha pré-tratada

A figura 56 mostra os difratogramas obtidos para a palha de cana in natura e submetida às diferentes condições de pré-tratamento.

Figura 56: Difratomogramas obtidos para a palha de can in natura e após o pré-tratamento hidrotérmico evidenciando os picos I_{am} (contribuição amorfa) e I_{002} (contribuição de celulose cristalina)

Utilizando-se a abordagem descrita no item 4.6.2.1 foi calculada a diminuição da cristalinidade da celulose de palha de cana conforme resultados mostrados na tabela abaixo:

Tabela 23: Diminuição da cristalinidade de celulose de palha pré-tratada obtida pela diferença de cristalinidade medida pela cristalinidade esperada

	R1P	R2P	R3P	R4P	R5P	R6P	R7P	R8P	R9P	R10P
Cristalinidade medida	45,4	43,1	43,4	41,0	47,2	48,9	48,2	49,2	51,5	50,2
Cristalinidade esperada	68,1	70,8	70,9	73,3	72,6	78,9	85,7	86,6	91,6	88,4
Diminuição da cristalinidade	22,7	27,7	27,5	32,3	25,4	29,9	37,6	37,4	40,1	38,1

A Tabela 23 mostra a diminuição da cristalinidade da celulose de palha de cana pré-tratada. Os resultados revelam que o pré-tratamento possui influência significativa sobre a perda de cristalinidade desta biomassa. Os resultados mostram que o aumento do tempo de reação diminui a cristalinidade de forma aleatória, em contrapartida, o aumento de temperatura possui uma interferência direta sobre a diminuição da cristalinidade. Observa-se que para o mesmo tempo de reação, porém

em temperaturas maiores há uma diminuição maior da cristalinidade. Uma correlação linear pode ser estabelecida entre a diminuição da cristalinidade e a severidade do pré-tratamento conforme mostrado na Figura 57. Pode-se afirmar que a celulose de palha de cana de açúcar tem sua cristalinidade diminuída com o aumento da severidade do pré-tratamento.

Figura 57: Correlação linear estabelecida entre a diminuição da cristalinidade da celulose em função da severidade do pré-tratamento

5.3.4 Microscopia eletrônica de varredura da palha de cana pré-tratada

As microscopias da Figura 58 mostram as diferenças morfológicas apresentadas pela palha de cana após o processo de pré-tratamento. Observa-se que a palha in natura (INP) apresenta uma superfície lisa e compacta evidenciando a recalcitrância do material e pouca acessibilidade de reagentes e enzimas à matriz lignocelulósica. Para os materiais pré-tratados a temperatura de 160°C nota-se pouca modificação da estrutura morfológica. Para a reação R1 observam-se apenas fraturas na superfície da palha que pode estar mais associada ao processo de moagem do que ao pré-tratamento. Já para a condição R2P observa-se uma modificação maior da superfície com a exposição de poucas células parenquimáticas e poucas fibras isoladas. Similarmente ocorre para a condição R3P onde é possível observar tanto fibras quanto células de parênquima, além de fraturas causadas pelo processo de moagem, porém com uma superfície ainda pouco modificada. A condição R4P apresenta um isolamento das fibras e exposição de alguns feixes vasculares (F) e células de parênquima (P). A condição R5P apresenta uma exposição maior do parênquima e superfície mais modificada que as demais condições.

Figura 58: Microscopias da palha de cana in natura e após o pré-tratamento hidrotérmico em diferentes condições. Barra de escala em 100 μm

Com exceção a amostra R6P, as microscopias obtidas para as condições à 180°C apresentaram uma modificação morfológica da palha de cana evidenciando que o aumento da severidade promove uma exposição das fibras devido à remoção dos componentes lignocelulósicos, principalmente hemicelulose e lignina. Além disso, observam-se apenas feixes vasculares evidenciando a fragilidade das células de parênquima ao processo de pré-tratamento. Observa-se que a condição R8P

apresentou uma maior abertura dos feixes de fibras, que pode contribuir para as etapas subsequentes de deslignificação e aumentar a susceptibilidade das enzimas à celulose na hidrólise enzimática.

5.3.5 Deslignificação alcalina da palha de cana

A Tabela 24 mostra a composição química da palha de cana in natura e pré-tratadas submetidas à deslignificação alcalina. Os resultados mostram a influência direta do processo de pré-tratamento sobre a etapa de deslignificação. Apesar do processo de deslignificação ter sido realizado em uma condição fixa nota-se que o aumento da temperatura e tempo de pré-tratamento promoveu um aumento do rendimento mássico. Comparando-se os materiais pré-tratados com o material in natura apenas submetido à deslignificação (InPD) observa-se uma diminuição significativa de celulose e lignina.

Tabela 24: Composição química da palha submetida a combinação de pré-tratamento seguida de deslignificação

	InD	R1P	R1*	R2P	R2*	R3P	R3*	R4P	R4*	R5P	R5*	R6P	R6*	R7P	R7*	R8P	R8*	R9P	R9*	R10P	R10*
<i>Rendimento</i>	58,12	-	66,0 2	-	64,89	-	65,7	-	63,5	-	64,2	-	66,7	-	68,3	-	69,1	-	69,5	-	68,96
<i>Celulose</i>	35,45	57,2	37,7 6	58,4 2	37,91	54,6 2	35,8 9	54,3 8	34,5 3	52,9	33,96	52,9 6	35,32	68,9 7	47,1 1	69,5 3	48,0 5	70,1	48,72	69,24	47,75
<i>Hemicelulose</i>	16,80	25,2	16,6 4	24,6 1	15,97	24,7 1	16,2 3	21,5 4	13,6 8	20,9 7	13,46	14,0 8	9,39	11,3 5	7,75	9,56	6,61	5,6	3,89	4,67	3,22
<i>Lignina</i>	6,68	14	9,24	13,2	8,57	16,8 5	11,0 7	18,3 6	11,6 6	22,6 3	14,53	27,9 2	18,62	17,3	11,8 2	15,0 4	10,3 9	18,6 4	12,95	20,1	13,86
<i>Cinzas</i>	0,58	3,8	2,51	3,5	2,27	3,1	2,04	3,9	2,48	2,98	1,91	3,8	2,53	2,82	1,93	3,17	2,19	4,3	2,99	4,8	3,31
<i>Extrativos</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Total</i>	-	100,2 +0,58	-	99,7 ±0,35	-	99,3 ±0,71	-	98,2 ±0,33	-	99,5 ±0,46	-	98,8 ±0,28	-	100,4 ±0,13	-	97,3±0,41	-	98,6 ±0,30	-	98,8±0,54	-

Para fins comparativos, a Tabela 25 apresenta os resultados de solubilização dos componentes macromoleculares.

Tabela 25: Porcentagem de solubilização dos componentes lignocelulósicos de palha de cana

	Celulose	Hemicelulose	Lignina
R1PD	5,08	38,89	67,75
R2PD	8,25	41,03	70,58
R3PD	13,26	38,70	60,21
R4PD	19,35	48,81	54,10
R5PD	19,88	48,52	43,06
R6PD	23,27	52,42	31,77
R7PD	5,90	55,53	57,14
R8PD	4,98	52,69	65,15
R9PD	8,95	56,79	55,20
R10PD	7,44	59,28	59,02
InPD	48,36	63,47	85,85

Os resultados da Tabela 25 evidenciam que a palha somente deslignificada apresentou uma maior solubilização dos componentes lignocelulósicos, mostrando que este processo tem grande influência na modificação da biomassa. Porém comparando-se o resultados da amostra InPD com os resultados obtidos para as amostras pré-tratadas observa-se que mesmo em uma condição mais severa de reação, como por exemplo, R10P não há uma solubilização tão expressiva da celulose e da lignina. No processamento da biomassa a etanol a solubilização de celulose deve ser minimizada uma vez que se trata da matéria-prima para obtenção de açúcares fermentáveis para a produção de etanol, portanto pode-se afirmar que o processo de deslignificação deve ser otimizado para diminuir a quantidade de celulose solubilizada. Comparativamente aos materiais pré-tratados o material apenas deslignificado deve apresentar menores rendimentos em açúcares uma vez que houve uma significativa solubilização da celulose e ainda há uma quantidade expressiva de hemicelulose. A única vantagem deste material em relação aos demais é a menor quantidade de lignina, que atua como inibidor da hidrólise enzimática.

Um comparativo entre os materiais pré-tratados submetidos à deslignificação observa-se um aumento gradativo da solubilização dos componentes lignocelulósicos com o aumento da severidade do pré-tratamento. A amostra R8PD apresentou a menor perda de celulose, com uma significativa solubilização de lignina e hemicelulose.

Pode-se afirmar que a deslignificação pode contribuir para a remoção de até 85% da lignina do material lignocelulósico. Além disso, este processo contribui para a solubilização da hemicelulose remanescente do pré-tratamento, porém dependendo das condições adotadas no tratamento anterior pode acarretar em uma remoção significativa da celulose.

5.3.6 Difração de raios-X da celulose de palha de cana deslignificada

A Figura 59 apresenta os difratogramas obtidos para as polpas de palha de cana.

Figura 59: Difratogramas da palha de cana in natura, deslignificada e pré-tratada seguida de deslignificação alcalina

Desconsiderando a interferência da presença de sílica observada em alguns difratogramas, foram utilizados os picos referentes à região cristalina e amorfa para o cálculo da cristalinidade e a partir da equação descrita no item 4.6.2.1 foram obtidos os dados da Tabela 26, abaixo:

Tabela 26: Diminuição da cristalinidade de polpa de palha de cana

	R1PD	R2PD	R3PD	R4PD	R5PD	R6PD	R7PD	R8PD	R9PD	R10PD	INPD
Cristalinidade medida	56,58	60,43	54,97	58,07	53,34	56,78	59,91	51,20	54,93	55,28	57,27
Cristalinidade esperada	96,34	94,73	88,46	85,09	83,61	77,07	92,31	92,14	87,77	89,92	59,53
Diminuição da cristalinidade	39,76	34,30	33,49	27,02	30,27	20,29	32,40	40,94	32,84	34,64	2,26

Pode-se observar que a deslignificação promoveu uma diminuição da cristalinidade de celulose de palha. Para a amostra apenas deslignificada observa-se uma pequena diminuição da cristalinidade evidenciando que apesar de uma grande solubilização da celulose, grande parte desta celulose solubilizada era amorfa restando no material majoritariamente celulose cristalina, que é mais dificilmente hidrolisada pelas enzimas na hidrólise enzimática. Além disso, pode-se afirmar que o pré-tratamento promove uma modificação significativa que influencia nas etapas posteriores de tratamento da biomassa, como a deslignificação. Observa-se que pela mudança morfológica causada pelo pré-tratamento foi possível obter uma expressiva diminuição da cristalinidade da celulose após a deslignificação, que não é observada quando a biomassa não sofre nenhuma modificação anterior à deslignificação, como no caso da amostra InPD.

Comparando-se a diminuição da cristalinidade em função dos tratamentos realizados pode-se afirmar que após a deslignificação a celulose remanescente é menos cristalina quando comparada a celulose submetida ao processo de pré-tratamento ou a biomassa in natura, evidenciando que a combinação de tratamentos pode contribuir de forma positiva para minimização de componentes inibidores e também para aumentar a susceptibilidade do material à hidrólise enzimática.

5.3.7 Microscopia eletrônica de varredura da palha de cana após a deslignificação

As microscopias da Figura 60 revelam as modificações morfológicas que ocorrem com a palha de cana após o processo de deslignificação. A amostra INP revela uma exposição das fibras decorrente apenas do processo de deslignificação evidenciando a influência deste tratamento sobre a biomassa, porém quando há a combinação de pré-tratamento e deslignificação nota-se uma modificação e abertura das fibras ainda maior evidenciando a maior modificação nas características recalcitrante do material quando são combinados diferentes tratamentos.

Figura 60: Microscopias da palha de cana in natura (InP), deslignificada (InPD) e após o pré-tratamento hidrotérmico em diferentes condições seguida de deslignificação alcalina (RP). Barra de escala em 100 μm

Não foram observadas diferenças significativas entre as diferentes polpas submetidas previamente ao pré-tratamento, sendo que para todas as condições observa-se, majoritariamente a presença de feixes vasculares e fibras bastante

expostas. Assim como no pré-tratamento em condições mais severas, pode-se afirmar que o parênquima apresenta uma fragilidade em função do processo de deslignificação perdendo totalmente suas características estruturais. Portanto o material deslignificado, submetido à hidrólise enzimática é proveniente, em grande maioria, de feixes vasculares.

5.3.8 Análise global do processamento da palha de cana

A Tabela 27 apresenta uma análise global da solubilização dos componentes lignocelulósicos, bem como a diminuição da cristalinidade da celulose, considerando-se o processo combinado de pré-tratamento e deslignificação alcalina.

Tabela 27: Análise global de perdas dos componentes lignocelulósicos da palha de cana e diminuição da cristalinidade da celulose (dados em %)

	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Diminuição da cristalinidade
R1	19,98	49,24	70,25	62,47
R2	23,53	53,62	73,75	61,98
R3	29,44	54,04	66,93	60,97
R4	33,25	61,93	65,76	59,36
R5	33,22	61,89	56,60	55,69
R6	37,42	76,05	49,88	50,20
R7	26,72	82,64	72,07	69,95
R8	28,08	85,76	76,37	78,33
R9	28,69	91,80	71,19	72,95
R10	32,81	93,47	70,37	72,76
In D	48,36	63,47	85,85	2,26

Os resultados revelam uma significativa diminuição da cristalinidade da celulose; verifica-se que para as reações realizadas a 160°C esta diminuição atingiu até 61% e para as reações a 180°C a cristalinidade foi diminuída até 78%. Além disso, observa-se uma solubilização de até 70% da lignina nos materiais previamente pré-tratados. Em relação à hemicelulose pode-se afirmar que a temperatura de 160°C não foi efetiva em sua solubilização já que nesta condição apenas 60% da hemicelulose foi removida. Além disso, verifica-se que mesmo com a baixa solubilização da hemicelulose houve uma remoção expressiva da celulose, com valores muito próximos aos obtidos em condições mais severas a 180°C, demonstrando que esta temperatura não favorece o processamento da palha de cana à etanol, uma vez que há uma

pequena remoção de hemicelulose, menor diminuição da cristalinidade da celulose seguida de uma alta remoção desta matéria-prima para obtenção de etanol.

Já as reações realizadas a 180°C apresentaram uma alta solubilização de hemicelulose, atingindo valores de até 93%, e expressiva remoção de lignina, de até 75%.

A amostra apenas deslignificada ainda apresentou maior solubilização de lignina, porém uma baixa solubilização de hemicelulose e diminuição da cristalinidade da celulose, e alta remoção deste componente. Evidenciando, assim, que a combinação de tratamentos favorece a diminuição da recalcitrância da palha de cana tornando-a mais susceptível à hidrólise enzimática.

5.3.9 Hidrólise enzimática da palha de cana

A Tabela 28 apresenta os resultados de digestibilidade da celulose para as amostras in natura, pré-tratadas e obtidas após combinação de pré-tratamento e deslignificação.

Tabela 28: Digestibilidade de celulose de palha de cana obtida após pré-tratamento e combinação de pré-tratamento e deslignificação

	Pré-tratado		Deslignificado	
	Conversão (%)	Conversão corrigida (%)	Conversão (%)	Conversão corrigida (%)
R1P	24,78	20,89	48,35	38,69
R2P	22,38	18,65	34,97	26,74
R3P	24,52	19,94	38,24	26,99
R4P	22,89	18,94	47,91	31,98
R5P	21,92	18,97	56,03	37,42
R6P	39,40	32,13	63,15	39,51
R7P	43,68	34,02	66,08	48,43
R8P	58,57	44,33	69,68	50,12
R9P	26,77	20,97	69,96	49,89
R10P	56,15	40,76	65,35	43,91
INP	17,81	17,81	70,08	38,74

A hidrólise enzimática do material in natura apresentou uma baixa conversão em glicose devido à dificuldade de acesso da enzima ao substrato que se encontra organizado na matriz lignocelulósica. Quando este mesmo material é submetido apenas a deslignificação (InPD) observa-se um aumento de aproximadamente 45% na digestibilidade da celulose, isso ocorre pois há uma solubilização de componentes inibidores e uma maior exposição das fibras após a deslignificação. Para os materiais somente pré-tratados nota-se um aumento da conversão enzimática em relação ao material in natura, porém quando esta conversão é corrigida pelas perdas de celulose

verifica-se para as condições de menor severidade a temperatura de 160°C uma baixa conversão. Quando os mesmos materiais são submetidos ao processo de deslignificação observa-se um aumento considerável na digestibilidade alcançando valores superiores a 40%. Pode-se observar que para algumas condições de pré-tratamento à 160°C, seguido de deslignificação, a conversão é menor que a apresentada para o material in natura apenas deslignificado. Isso ocorre principalmente pelas perdas de celulose associadas ao processo de pré-tratamento e deslignificação combinados. Além disso, a maior remoção de lignina para a amostra InPD (cerca de 85%) pode ter contribuído para uma digestibilidade mais efetiva do material. Como observado anteriormente pelos resultados de solubilização de componentes, cristalinidade e microscopias, o pré-tratamento hidrotérmico a 160°C promove poucas alterações morfológicas e composicionais na biomassa apresentando resultados similares ou inferiores ao material somente deslignificado. Desta forma pode-se afirmar que uma melhor digestibilidade da palha de cana ocorre em condições mais severas, incluindo principalmente, temperaturas mais altas no pré-tratamento. Como mostrado na Tabela 28, para todos os tempos de reações avaliados a 180°C seguido de deslignificação houve um aumento de 25% da conversão de celulose em relação ao material apenas deslignificado e um aumento de 65% da digestibilidade da celulose em relação ao material in natura. As melhores condições apresentaram conversões superiores a 40%. Oliveira et al, (2013) descreveram resultados semelhantes quando utilizou-se palha de cana pré-tratada por explosão à vapor seguida de deslignificação alcalina e hidrólise enzimática com um complexo de celulasas diferentes ao utilizados neste trabalho.

Dentre as condições avaliadas pode-se destacar que a condição de pré-tratamento, seguida de deslignificação, R8D a 180°C por 30 min. apresentou o maior valor de conversão em glicose atingindo 50% de conversão, mesmo considerando as perdas globais do processo, mostrando-se assim mais promissora no processamento da palha de cana à etanol.

5.4 Análise comparativa do bagaço e palha de cana-de-açúcar para produção de etanol

Para obter informações sobre a influência do tipo de biomassa e sua performance para a produção de etanol de segunda geração foi feito um comparativo dos resultados obtidos para o bagaço e palha de cana, processados nas mesmas condições de reação, neste caso, as informações a seguir referem-se aos pré-

tratamentos realizados a 180°C nos mesmos tempos de reação, mesmas condições de designificação alcalina e hidrólise enzimática.

Uma análise do licor hidrolisado obtido após o pré-tratamento revela uma diferença significativa na formação de produtos oriundos da desidratação dos açúcares conforme mostrado na Tabela abaixo:

Tabela 29: Comparação dos licores obtidos após pré-tratamento hidrotérmico de bagaço (R1, R2, R3, R4 e R5) e palha (R6P, R7P, R8P, R9P e R10P).

LICOR HIDROLISADO				
	Ac. fórmico	Ac. acético	Furfural	HMF
R1	2,341	0,239	1,256	2,34
R2	2,670	0,395	1,411	2,67
R3	1,598	0,208	0,777	1,598
R4	2,566	0,528	2,322	2,566
R5	2,06	0,444	2,166	2,06
R6P	0,031	0,956	0,590	0,024
R7P	0,038	1,114	0,703	0,020
R8P	0,026	1,124	1,005	0,024
R9P	0,032	1,129	1,007	0,037
R10P	0,050	1,127	1,083	0,026

Para as mesmas condições de pré-tratamento, a palha e o bagaço de cana apresentam licores hidrolisados significativamente discrepantes. Nota-se que a formação de ácido fórmico, furfural e HMF são mais pronunciadas para o bagaço de cana, já o ácido acético apresenta-se em maior concentração em hidrolisados provenientes de palha de cana. Observa-se uma ordem de grandeza bastante discrepante, também, na solubilização de açúcares no hidrolisado, o bagaço de cana apresenta uma concentração de xilose de, em média, 15 g/L enquanto a palha apresenta uma média de 3g/L de xilose no licor. Tal fato pode ser evidenciado pela análise de solubilização dos componentes macromoleculares das biomassas em questão, apresentados na Tabela 30, onde se observa a maior solubilização de hemicelulose para o bagaço de cana. Já para a celulose há um comportamento oposto, onde a palha de cana apresenta uma maior solubilização indicando que a celulose deste tipo de material é mais susceptível ao pré-tratamento do que para o bagaço de cana. Além disso, a palha de cana também apresentou maior solubilização da lignina, tal fato, pode ser explicado tanto pelo arranjo da matriz lignocelulósica como também pelo pH do pré-tratamento. Nota-se que para todos os casos as

reações realizadas com palha apresentaram um pH maior do que para as mesmas condições utilizando-se bagaço de cana.

Tabela 30: Comparativo de porcentagem de solubilização dos componentes lignocelulósicos de bagaço e palha sob as mesmas condições de pré-tratamento

	Celulose	Hemicelulose	Lignina	pH
R1	9,41	73,41	7,81	3.47
R2	8,75	79,74	11,13	3.44
R3	15,90	83,48	18,74	3.40
R4	7,02	83,13	8,49	3.42
R5	12,57	85,54	11,37	3.39
R6P	18,44	49,66	26,41	4,25
R7P	22,12	60,95	34,71	3,57
R8P	24,32	69,91	32,06	3,80
R9P	21,68	81,01	35,56	3,85
R10P	27,41	83,98	27,54	3,94

Em relação às correlações estabelecidas entre a solubilização dos componentes macromoleculares em função da severidade do pré-tratamento, os resultados revelam que o coeficiente angular da solubilização de hemicelulose (Figura 53) de palha ($\alpha = 57,78$) é cerca de 2,7 vezes maior do que para o encontrado para o bagaço de cana ($\alpha = 20,95$), na Figura 35. Isso sugere que a severidade do pré-tratamento possui uma maior influência sobre a solubilização de hemicelulose de palha quando comparada ao bagaço. Portanto considerando um mesmo aumento de severidade para ambas as biomassas em questão espera-se um aumento pronunciado, em relação a uma severidade menor, na remoção de hemicelulose de palha.

Já para a remoção de celulose observa-se um comportamento distinto das biomassas em função da severidade do pré-tratamento. Para o bagaço de cana, há uma correlação polinomial entre estes dois parâmetros enquanto para a palha obtém-se uma relação linear, o que sugere que este componente pode apresentar a mesma correlação polinomial encontrada para o bagaço porém em condições mais severas de pré-tratamento.

Em relação à solubilização da lignina observa-se que ambas as biomassas apresentam mesmo comportamento para a faixa a mesma faixa de severidade (3,3 a 4,05). Ambas apresentam um comportamento polinomial com uma severidade crítica

para redeposição de lignina no material de 3,8, evidenciando que esta é uma severidade crítica para este componente independente da biomassa analisada.

Outra característica distinta entre o bagaço e palha de cana é a diminuição da cristalinidade após o pré-tratamento. Pelos resultados apresentados nos itens 5.1.4 (para bagaço) e 5.3.6 (para a palha) pode-se afirmar que o pré-tratamento contribui para a diminuição da cristalinidade da celulose de palha de forma mais expressiva que do para o bagaço, onde para todas as condições foram encontrados resultados inferiores comparativamente à palha. Assim como encontrado para a correlação entre solubilização de celulose em função da severidade, correlacionando-se a diminuição da cristalinidade deste componente com a severidade observa-se um comportamento similar, onde obtém-se uma relação polinomial para o bagaço de cana e uma correlação linear para a palha. Estes resultados evidenciam novamente o comportamento distinto da celulose destas diferentes biomassas.

Em relação às modificações morfológicas também é possível estabelecer as diferenças apresentadas pelo bagaço e palha de cana. As microscopias da Figura 61 mostram o bagaço e a palha in natura e após a mesma condição de pré-tratamento hidrotérmico a 180°C por 50 min. de reação.

Figura 61: Comparativo das microscopias de bagaço e palha de cana in natura e após pré-tratamento hidrotérmico na mesma condição de reação a 180°C por 50 min. Barra de escala em 100 μm

Pode-se afirmar que a palha de cana é constituída de fragmentos maiores do que o bagaço de cana, visto que as imagens encontram-se na mesma magnitude. Além disso, pode-se perceber um arranjo diferente entre as fibras de bagaço e palha de cana, enquanto a palha apresenta conjunto de fibras organizadas e separadas, o bagaço de cana é constituído de uma superfície única e lisa, sem separação das fibras. Para o material pré-tratado nota-se uma modificação maior para o bagaço, que apresenta uma separação e grande exposição das fibras; já para a palha observa-se que o pré-tratamento modificou a superfície das fibras, porém as mesmas encontram majoritariamente de forma arranjada com pouca separação. Neste caso pode-se afirmar que o pré-tratamento promove uma modificação e exposição das fibras para o bagaço enquanto para a palha, nas mesmas condições, tem-se apenas uma modificação da superfície, sugerindo que para obter uma exposição das fibras, similar a obtida para o bagaço, devem-se utilizar condições mais severas de pré-tratamento.

Para o processo de deslignificação os resultados revelam uma maior solubilização dos componentes lignocelulósicos do bagaço de cana após o pré-tratamento. Para o bagaço de cana o processo de deslignificação contribui significativamente para a remoção de celulose, enquanto que para a palha o processo de pré-tratamento é mais expressivo para remoção deste componente.

Tabela 31: Resultados comparativos de solubilização dos componentes lignocelulósicos de bagaço e palha de cana após combinação de pré-tratamento e deslignificação.

	Celulose	Hemicelulose	Lignina
R1	23,72	70,00	73,41
R2	27,78	70,42	70,84
R3	42,94	75,19	75,13
R4	33,32	70,86	72,81
R5	37,81	71,73	66,63
In D	24,01	34,25	70,67
R6PD	23,27	52,42	31,77
R7PD	5,90	55,53	57,14
R8PD	4,98	52,69	65,15
R9PD	8,95	56,79	55,20
R10PD	7,44	59,28	59,02
InPD	48,36	63,47	85,85

Comparando-se os materiais apenas deslignificados InD e InPD observa-se, neste caso, que a palha apresenta uma maior solubilização de todos os componentes, sugerindo uma menor recalcitrância em comparação ao bagaço de cana.

Novamente em relação à diminuição da cristalinidade observa-se uma atuação mais expressiva da deslignificação sobre a celulose de palha, mostrando que esta pode ser mais susceptível às modificações comparada à celulose de bagaço de cana.

Quanto a mudanças morfológicas, as microscopias da Figura 62 evidenciam novamente que o bagaço de cana apenas deslignificado apresenta uma maior exposição das fibras quando comparado a palha, que apresenta esta exposição, porém em menor proporção. Já para o material obtido após a combinação de tratamentos observa-se uma morfologia bastante similar entre as biomassas, com grande exposição, separação e diminuição do tamanho das fibras.

Figura 62: Comparativo das microscopias de bagaço e palha de cana in natura e após pré-tratamento hidrotérmico na mesma condição de reação a 180C por 50 min., seguido de deslignificação alcalina. Barra de escala em 100 μm

A análise global dos processos combinados apresentados no item 5.1.11 (bagaço) e 5.3.8 (palha) revela uma maior solubilização de lignina e hemicelulose para o bagaço de cana que contribuem para a maior mudança morfológica observada nas microscopias. Já em relação à diminuição da cristalinidade da celulose nota-se que a palha apresenta valores superiores ao apresentado pelo bagaço e também uma menor perda deste componente, tal fato, contribuiria para uma maior digestibilidade da celulose de palha comparada a celulose de bagaço, considerando-se uma solubilização similar de lignina e hemicelulose à encontrada para o bagaço.

Em relação à conversão em glicose a Tabela 32 apresenta os resultados para as amostras de palha e bagaço de cana submetidos ao processo combinado de pré-tratamento e deslignificação.

Tabela 32: Conversão enzimática das polpas de bagaço e palha de cana

	Deslignificado	
	Conversão (%)	Conversão corrigida (%)
R1	87,44	59,78
R2	88,45	60,95
R3	90,85	43,13
R4	85,27	56,55
R5	94,96	47,17
IN	48,98	37,22
R6P	63,15	39,51
R7P	66,08	48,43
R8P	69,68	50,12
R9P	69,96	49,89
R10P	65,35	43,91
INP	70,08	38,74

Observa-se que a digestibilidade da palha de cana, INP, apresentou valores superiores aos obtidos para o bagaço in natura (IN), onde foram obtidos 17,81% e 8,52%, respectivamente. Pode-se associar este resultado ao índice de cristalinidade da celulose, que para a palha é menor (42%) do que para o bagaço (48%) e também a redução de partícula inicial, já que a palha foi submetida à moagem diferentemente do bagaço, o qual foi utilizado integralmente sem moagem prévia, portanto, neste caso, a área superficial de contato das enzimas ao substrato é maior para a palha. Resultados semelhantes foram reportados por Silva et al, (2010), que encontraram resultados de conversão enzimática maiores para a palha quando comparada ao bagaço após o

processo de moagem em disco e associaram estes resultados a um maior redução de tamanho de partículas para a palha e ao menor índice de cristalinidade apresentado por esta biomassa.

Verifica-se que para o bagaço de cana a melhor condição de digestibilidade da celulose ocorre quando o pré-tratamento é realizado na condição R2 a 180°C por 20 min., já para a palha a melhor condição encontra-se em 180°C por 30 min, sugerindo que para obter um melhor rendimento em açúcares a palha necessita de um tempo de reação de pré-tratamento maior quando comparada ao bagaço de cana. Estes resultados corroboram com os descritos por Silva et al, (2010), onde foram utilizados diferentes tempos de tratamento por moagem a disco seguido por hidrólise enzimática.

5.5 Caracterização do colmo da cana-de-açúcar

5.5.1 Microscopia eletrônica de varredura ambiental de cana-de-açúcar

Esta segunda etapa do projeto inclui a caracterização da cana-de-açúcar ao longo do crescimento e em relação à região interna (medula) e externa (casca) do colmo.

As medidas de MEV-ambiental proporcionam uma análise completa da parede celular das células de parênquima e de feixes vasculares em relação a perda ou retenção de água e as mudanças de espessura e conformação das células com os processos de pré-tratamento e deslignificação.

As microscopias dos feixes vasculares ao longo do crescimento, na Figura 63, revelam uma significativa diferença entre os feixes da região da medula e da casca. A região da casca apresenta-se mais vascularizada que a região da medula e ao longo do crescimento nota-se uma casca mais vascularizada na parte inicial do colmo da cana.

Figura 63: Microscopias dos feixes vasculares ao longo do crescimento, na região da medula e da casca do colmo da cana. À esquerda em condições úmidas e à direita as mesmas células, porém secas. Magnitude 600X (barra de escala de 100 μm)

Em relação ao tamanho individual dos feixes, visualmente não é possível detectar diferenças de diâmetro ao longo do crescimento e da região do colmo.

Para verificar possíveis mudanças no tamanho das células de feixes vasculares ao longo do crescimento, foram medidos os diâmetros de 15 células individuais e sua média foi comparada com as diferentes regiões da cana, conforme mostrado na Tabela 33.

Tabela 33: Diferença no diâmetro dos feixes da região da medula e da casca ao longo do crescimento do colmo da cana

Feixes vasculares					
início (μm)		meio (μm)		topo (μm)	
casca	medula	casca	medula	casca	medula
15,5	14,63	14,88	14,13	12,13	11,63
5,61 %		5,04 %		4,12 %	

Pelos valores da Tabela 33, verifica-se que há uma pequena diminuição do diâmetro dos feixes vasculares tanto da medula quanto da casca. Além disso, pode-se afirmar que os feixes vasculares que compõe a região da casca são maiores do que

os feixes da região da medula. Ao longo do crescimento esta diferença de diâmetro diminui de 5,65 para 4,12%. Contudo os resultados revelam que ao longo do crescimento o diâmetro dos feixes vasculares das regiões da medula e da casca diminui.

Já para as células de parênquima, as micrografias revelam uma significativa diferença no tamanho das células em relação à região da medula e da casca (Figura 64). Diferentemente dos feixes vasculares, as células parenquimáticas são maiores na região da medula. Nota-se também que a região referente ao topo do colmo da cana perde conformação estrutural com o processo de secagem, indicando uma estrutura de parede celular mais frágil quando comparada as demais regiões de crescimento. Esta perda conformacional é verificada a partir da parte intermediária do colmo na região da medula e prolonga-se para o topo do colmo tanto para a região da medula quanto para a região da casca.

Figura 64: Microscopias das células de parênquima ao longo do crescimento, na região da medula e casca do colmo da cana. À esquerda em condições úmidas e à direita as mesmas células, porém secas. Magnitude 600X (barra de escala de 100 µm)

Analogamente aos feixes vasculares, foram calculados os diâmetros de cada célula parenquimática individualmente. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 34:

Tabela 34: Diferença no diâmetro do parênquima da medula e casca ao longo do crescimento

Parênquima					
início (μm)		meio (μm)		topo (μm)	
casca	medula	casca	medula	casca	medula
35,38	55,5	32	57,63	22,25	56,25
36,25 %		44,47 %		60,44 %	

Os resultados mostram a significativa diferença do diâmetro de parênquima da região da medula e casca, e um expressivo aumento desta diferença ao longo do crescimento. Na parte inicial do colmo da cana verifica-se que o parênquima da medula é 36% maior que a da casca enquanto esta diferença aumenta para 44% para a região intermediária e atinge 60% para o topo do colmo da cana. Observa-se que não há mudança significativa no diâmetro do parênquima na região da medula que mantém-se praticamente constante ao longo do crescimento, neste caso, verificamos que apenas o diâmetro do parênquima da região da casca diminui com o crescimento do colmo da cana.

Em relação ao material pré-tratado verifica-se uma fragilidade maior da parede celular para os feixes vasculares da região da medula que apresentam uma perda de estrutura no processo de secagem independente da região do crescimento, evidenciando as mudanças que ocorrem na parede celular após o pré-tratamento, tornando-a mais frágil, conforme mostrado na Figura 65:

Figura 65: Microscopias feixes vasculares, após pré-tratamento, ao longo do crescimento, na região da medula e da casca do colmo da cana. À esquerda em condições úmidas e à direita as mesmas células, porém secas. Magnitude 600X (barra de escala de 100 μm)

As células de parênquima pré-tratadas apresentam comportamento similar aos feixes vasculares, sendo composta por uma estrutura frágil principalmente na região da medula, independente da região do crescimento, conforme mostrado na Figura 66:

Figura 66: Microscopias das células de parênquima, após pré-tratamento, ao longo do crescimento, na região da medula e casca do colmo da cana. À esquerda em condições úmidas e à direita as mesmas células, porém secas. Magnitude 600X (barra de escala de 100 μm)

A Figura 67 mostra as micrografias obtidas para os feixes vasculares após a designificação. Nota-se que mesmo antes do processo de secagem os feixes vasculares perdem sua conformação estrutural na região da medula evidenciando uma grande fragilidade da parede celular. Além disso, após o processo de secagem na parte intermediária da região da casca observa-se uma pequena perda estrutural.

Figura 67: Microscopias dos feixes vasculares, após deslignificação, ao longo do crescimento, na região da medula e da casca do colmo da cana. À esquerda em condições úmidas e à direita as mesmas células, porém secas. Magnitude 600X (barra de escala de 100 μm)

Para as células de parênquima deslignificadas (Figura 68), verifica-se que tanto as regiões da medula quanto da casca apresentam perda estrutural com o processo de secagem evidenciando que este processo promove significativas mudanças estruturais em todas as regiões do colmo da cana.

Figura 68: Microscopias das células de parênquima, após deslignificação, ao longo do crescimento, na região da medula e casca do colmo da cana. À esquerda em condições úmidas e à direita as mesmas células, porém secas. Magnitude 600x (barra de escala de 100 μm)

5.5.2 Microscopia confocal Raman

A partir dos espectros Raman foram geradas as imagens contendo as distribuições dos carboidratos e lignina na parede celular dos feixes vasculares e do parênquima (Figura 69). A fim de facilitar a avaliação de cada componente na parede celular, foi feita a integração dos espectros e obtidas imagens com as contribuições de lignina, carboidratos e orientação de celulose, separadamente, para isso os espectros foram integrados nas regiões de $1550\text{-}1670\text{ cm}^{-1}$, $2800\text{-}2970\text{ cm}^{-1}$ e $1000\text{-}1110\text{ cm}^{-1}$ respectivamente.

Figura 69: Imagem gerada a partir do espectro Raman contendo todas as contribuições de carboidratos, lignina e orientação de celulose.

A imagem da Figura 70 representa a separação de cada componente para as células de parênquima.

Figura 70: Imagem gerada a partir da integração do espectro Raman. Em vermelho, integração referente a carboidratos, em amarelo integração referente a orientação de celulose e em verde à lignina.

Essa separação dos componentes foi realizada para as amostras da parte inicial, intermediária e topo do colmo da cana, porém como visualmente não há diferenças significativas somente às imagens para a parte intermediária, não tratada, pré-tratada e designificada, são mostradas.

Verifica-se ao longo dos tratamentos que uma pequena fração de carboidratos é perdida, principalmente após a designificação; em relação à orientação de celulose nota-se uma diminuição e mudança na orientação deste componente e, para a lignina observa-se uma significativa mudança. Ao longo dos tratamentos verificamos uma diminuição do conteúdo de lignina, e, após a designificação o desaparecimento total deste componente nas células parenquimáticas. Esta característica é observada também ao longo do crescimento, ou seja, a designificação atua eficientemente na remoção da lignina das células de parênquima.

Uma comparação dos espectros das diferentes regiões, na Figura 71, pode ser feita assumindo-se que a lignina possui a mesma estrutura ao longo do crescimento e durante as medidas foi utilizado o mesmo volume do laser (foco).

Figura 71: Espectros das regiões de crescimento (inicial, intermediária e topo) de amostras não tratadas

A banda em 1600 cm^{-1} está relacionada a ligações de C=C conjugadas, oriundas principalmente de álcool coniferílico de ligninas, conforme descrito por Willey; Atala, (1987). Pelos espectros observa-se que a parte intermediária do colmo da cana apresenta maior intensidade nesse número de onda e como a intensidade está proporcionalmente relacionada ao conteúdo de lignina, podemos afirmar que a parte intermediária do colmo possui maior quantidade de lignina do que a parte inicial e do topo, as quais apresentam praticamente mesma intensidade. O pico em 2940 cm^{-1} está relacionado a grupos metoxil da lignina e provavelmente à glucomananos e celulose.

Diferentemente a espectros obtidos para madeiras, no caso da cana temos um pronunciado pico em 1170 cm^{-1} relacionada a ácidos ferúlico e hidroxicinâmico; verifica-se também que na parte intermediária há maior conteúdo destes ácidos comparados à parte intermediária e ao topo do colmo, respectivamente. Os picos em 2900 cm^{-1} , 1423 cm^{-1} , 1303 cm^{-1} e 1096 cm^{-1} são altamente sensíveis à orientação de celulose na parede celular, os três primeiros picos nos fornecem informações de ligações C-H e CH_2 em posição perpendicular ao vetor de campo do laser. Nesse caso, como o laser está polarizado paralelamente ao plano da amostra, ou seja, na direção x, podemos afirmar que estas ligações fornecem informações de orientação de celulose paralela ao crescimento do colmo. Uma análise quantitativa em relação ao ângulo das microfibrilas de celulose não será possível por essa técnica principalmente

pela sobreposição do pico de ácido ferúlico sobre o pico de orientação de celulose em 1096 cm^{-1} . Em escala relativa podemos afirmar que o parênquima da parte inicial da cana possui uma orientação da celulose perpendicular ao crescimento mais significativa que a parte intermediária e do topo, o qual apresenta a menor intensidade do pico a 1096 cm^{-1} . Em relação ao pico em 2900 cm^{-1} verifica-se que para a parte inicial seguida pela parte intermediária e do topo do colmo tem-se uma maior intensidade, o que sugere que no parênquima da região inicial da cana possui uma camada de parede secundária S2 mais espessa que na parte intermediária e no topo do colmo por isso há uma pronunciada orientação de celulose paralela ao crescimento, enquanto a parte intermediária e topo do colmo possui preferencialmente uma orientação perpendicular ao crescimento, já que o pico em 1096 cm^{-1} está relacionado com as ligações C-O-C simétricas e assimétricas na direção do eixo x do plano da amostra e em relação à parte inicial há um decréscimo do pico em 2900 cm^{-1} . Após o pré-tratamento verifica-se uma diminuição da intensidade dos espectros causada pela diminuição do conteúdo de lignina, mas também por mudanças em sua estrutura (Figura 72). Em relação aos picos de lignina em 1600 cm^{-1} e 2940 cm^{-1} nota-se que para o primeiro pico temos mais alta intensidade para a parte inicial do colmo seguida pelo topo e parte intermediária. Nesse caso, pode-se afirmar que a lignina da parte intermediária da cana é mais facilmente reduzida que a lignina da parte inicial e topo do colmo, isso porque para as amostras não tratadas a parte intermediária apresentava o maior conteúdo de lignina. Analogamente ocorre para o pico de ácido ferúlico e hidroxicinâmico, onde a parte intermediária apresenta maior intensidade desses ácidos que a parte inicial e topo do colmo. Já para os picos referentes à orientação de celulose, temos a diminuição dos picos em 2900 cm^{-1} para o início e parte intermediária da cana e aumento do mesmo pico para o topo do colmo, evidenciando novamente as mudanças de orientação causadas em função do pré-tratamento.

Figura 72: Espectros das regiões de crescimento de amostras pré- tratadas

Já os espectros das amostras após da deslignificação (Figura 73) revelam, assim como o encontrado para as imagens, o desaparecimento total do pico referente a lignina (1600 cm⁻¹) e também do pico de ácido ferúlico e hidroxicinâmico (1170 cm⁻¹), evidenciando que as células de parênquima foram mais susceptíveis à deslignificação completa.

Os picos referentes à orientação de celulose, neste caso, apresentam comportamento semelhante às amostras não tratadas, sendo que a orientação perpendicular ao crescimento é mais pronunciada para a parte inicial do colmo seguida da parte intermediaria e do topo, o qual apresenta a menor intensidade. Esse mesmo comportamento ocorre para o pico referente à orientação de celulose paralela ao crescimento (2900 cm⁻¹). Esses resultados também sugerem que a parte inicial da cana possui preferencialmente duas orientações, uma na direção do crescimento da planta e outra perpendicular à este.

Figura 73: Espectros das regiões de crescimento de amostras designificadas

A mesma abordagem de separação das contribuições dos componentes lignocelulósicos foi realizada para os feixes vasculares e então foram obtidas as imagens da Figura 74:

Figura 74: Imagem gerada a partir da integração do espectro Raman. Em vermelho, integração referente a carboidratos, em amarelo, integração referente à orientação de celulose e em verde à lignina.

Diferentemente ao observado para as células parenquimáticas, nota-se uma significativa perda de carboidratos a partir do pré-tratamento e, que torna-se ainda mais expressiva com o processo de deslignificação. Verifica-se também que essa perda ocorre principalmente na lamela média e nos cantos das células. Em relação à

orientação de celulose há uma mudança significativa na intensidade e também em orientação ao longo dos tratamentos. Já as imagens referentes ao conteúdo de lignina nos feixes revelam que, ao contrário do que ocorre com as células de parênquima, os feixes vasculares, mesmo após o processo de deslignificação, contêm lignina. Portanto, quando caracterizamos quimicamente o bagaço de cana, por exemplo, sabemos que a lignina residual encontra-se nos feixes vasculares e localizada principalmente nos cantos das células e parcialmente na lamela média.

Analogamente ao parênquima, as imagens das diferentes regiões de crescimento são bastante similares e as mudanças podem ser observadas apenas por meio das intensidades dos picos dos espectros.

Para os feixes vasculares é possível distinguir diferentes camadas da parede celular, conforme mostrado na Figura 75, a seguir.

Figura 75: Imagem gerada a partir do espectro contendo a contribuição dos componentes lignocelulósicos, e separação das diferentes camadas da parede celular

A contribuição dos componentes lignocelulósicos nas diferentes camadas da parede celular vegetal é mostrada na Figura 76, a seguir:

Figura 76: Espectros das diferentes camadas da parte inicial do colmo de amostras não tratadas

As diferentes camadas da parede celular revelam diferenças significativas principalmente em relação ao conteúdo de lignina. Para a parte inicial do colmo da cana, os cantos da célula apresentam maior conteúdo de lignina do que a lamela média e parede secundária S2. Assim como observado para o parênquima, os feixes vasculares apresentam pronunciado conteúdo de ácidos ferúlico e hidroxicinâmico, que provoca uma sobreposição ao pico relacionado à orientação de celulose. No caso dos feixes vasculares, verifica-se uma menor contribuição de celulose orientada perpendicular ao crescimento do que observado ao parênquima. Em relação ao pico em 2900 cm^{-1} observa-se que a camada secundária S2 apresenta mais pronunciada orientação de celulose paralela ao crescimento do que os cantos das células e lamela média.

Já para a parte intermediária do colmo, mostrada na Figura 77, verifica-se que diferentemente da parte inicial, a lamela média apresenta maior intensidade de lignina que os cantos da célula e a parede secundária S2, evidenciando as mudanças estruturais da parede celular ao longo do crescimento. Outro aspecto importante em relação ao conteúdo de lignina está evidenciado no pico em 2940 cm^{-1} , onde nota-se a ausência desse pico referente aos grupos metoxil na parede secundária e pronunciado para a lamela média e cantos das células. Em relação ao pico referente aos ácidos ferúlico e hidroxicinâmico, a lamela média seguida de parede secundária S2 e cantos da célula apresentam quantidades significativas destes componentes.

Para o pico referente à orientação de celulose paralela ao crescimento (2900 cm^{-1}) verificam-se que a parede secundária S2 possui maior intensidade do pico,

assim como para o pico em 1096 cm^{-1} , referente à orientação perpendicular ao crescimento, para a região intermediária, os resultados sugerem uma contribuição tanto da parede S2 como da parede S1, já que não foi possível distinguir e separar as duas contribuições.

Figura 77: Espectros das diferentes camadas da parte intermediária do colmo de amostras não tratadas

Para o topo do colmo da cana (Figura 78), verificamos novamente uma mudança em relação ao conteúdo de lignina; neste caso assim como para a parte intermediária, a lamela média apresenta maior intensidade desse componente, porém seguida de parede secundária S2 e por fim cantos das células. Os resultados sugerem que o processo de lignificação dos feixes do colmo da cana analisada ainda não havia cessado principalmente devido à formação de outras paredes secundárias características em monocotiledôneas, onde temos uma parede secundária multilamelar, baseado nos resultados descritos por DONALDSON, 2001, e os cantos das células poderiam ainda estar em processo de deposição da lignina. Os resultados mostram que a parte inicial da cana apresenta maior conteúdo de lignina nos cantos da célula seguido da lamela média e parede secundária S2, evidenciando que nessa parte do colmo o processo de formação da última camada da parede secundária já estava finalizada; diferentemente do que ocorre para a parte intermediária e do topo do colmo, onde verifica-se que os cantos das células ainda contêm menos lignina que a lamela média e a parede secundária; portanto no topo e na parte intermediária do colmo o processo de formação de parede celular ainda não estaria finalizado.

Figura 78: Espectros das diferentes camadas da parte do topo do colmo de amostras não tratadas

Para as diferentes camadas da parede celular pré-tratadas (Figura 79) verifica-se significativas mudanças ao longo do crescimento. Para a parte inicial do colmo os resultados mostram que após o pré-tratamento há presença de ácidos ferúlico e hidroxicinâmico nos cantos das células e para as demais regiões de crescimento há uma significativa redução desses componentes. Em relação à lignina em 1600 cm^{-1} observa-se que independente da região do crescimento há uma significativa remoção deste componente na lamela média e parede secundária S2 e um alto conteúdo nos cantos da célula. Para o pico referente aos grupos metoxil, observa-se o desaparecimento total desse pico para a parte inicial e topo do colmo, prevalecendo ainda na região intermediária, principalmente na lamela média.

Para os picos relacionados à orientação de celulose, verifica-se a ausência do pico em 1096 cm^{-1} relacionado à orientação perpendicular ao crescimento para todas as regiões e a predominância do pico em 2900 cm^{-1} com contribuições similares de todas as camadas da parede celular, independente do crescimento.

Figura 79: Espectros das diferentes camadas da parte inicial, intermediária e do topo do colmo de amostras pré- tratadas

Analogamente ao observado para o parênquima, os resultados mostram que após a designificação (Figura 80) há remoção total dos ácidos ferúlico e hidroxicinâmico independente da região de crescimento. Já diferentemente ao observado para o parênquima os espectros revelam que mesmo após a designificação há lignina presente nos feixes vasculares nos cantos das células, como observado nas imagens e discutido anteriormente. A remoção da lignina também pode ser acompanhada pelo desaparecimento do pico em 2940 cm^{-1} referente aos grupos metoxila.

Com a remoção total da lignina da parede secundária S2, observa-se o aparecimento do pico em 1096 cm^{-1} referente à orientação da celulose perpendicular ao crescimento. Isso ocorre principalmente por contribuições da parede secundária S1, que possui as microfibrilas de celulose orientada praticamente perpendicular ao eixo de crescimento, e com a remoção da lignina essa camada fica mais evidente e contribui para os sinais no espectro da parede secundária S2, que nesse caso, como não foi possível distingui-las, nos fornece uma contribuição mista de ambas as

camadas. Em relação aos picos em 2900 cm^{-1} e $1303\text{-}1442\text{ cm}^{-1}$ referentes à orientação de celulose paralela ao eixo, observa-se que para a parte inicial e intermediária do colmo a intensidade destes picos para a parede secundária S2 é mais pronunciada, e para a parte do topo do colmo temos intensidade similares para S2, lamela média e cantos das células.

Figura 80: Espectros das diferentes camadas da parte inicial do colmo de amostras designificadas

Pelos resultados apresentados para os feixes vasculares podemos afirmar que as células apresentam preferencialmente uma orientação de celulose paralela ao eixo de crescimento evidenciando que essa informação é oriunda da parede secundária S2, a qual é mais espessa que as demais camadas e contribui de maneira praticamente isolada no sinal gerado nos espectros.

5.5.3 Análises de SAXS

Primeiramente as análises de SAXS foram realizadas para as células parenquimáticas. Na parte inicial do colmo da cana, os padrões bidimensionais de espalhamento revelaram, em uma análise ainda preliminar, a presença de dois diferentes sinais de fibrilas elementares orientadas paralela e perpendicularmente ao eixo de crescimento da planta. (Figura 81a, topo). Os perfis azimutais são mostrados em triplicata para as regiões da casca e medula (Figura 81b, topo). As fibrilas elementares orientadas paralelamente ao eixo de crescimento da planta são visíveis aproximadamente nos perfis azimutais de espalhamento nos ângulos 90° e 270° e as fibrilas elementares orientadas perpendiculares são visualizadas aproximadamente nos ângulos 180° e 360° , sendo as intensidades na orientação perpendicular mais pronunciada que na direção paralela.

O mesmo comportamento não é observado para o topo do colmo da cana, onde o sinal é observado em apenas uma única direção perpendicular ao eixo de crescimento da planta (ângulos 180° e 360°). (Figura 81a, inferior e 81b inferior). Na parte intermediária do colmo (não mostrado), assim como para o topo, somente foi observado sinal referente às fibrilas elementares orientadas perpendicularmente ao eixo de crescimento.

Portanto para a parte inicial do colmo, as contribuições das fibrilas elementares orientadas paralelas e perpendicularmente podem ser explicadas pela presença da parede secundária S1 mais proeminente para todas as regiões (inicial, intermediária e topo) e uma camada menos espessa de S2. Analogamente ao observado para bambu por Gritsch e Murphy, (2005), a cana de açúcar pode ser composta por fases de desenvolvimento divididas em: diferenciação, alongamento e maturação das células. O início de formação de parede secundária S2 na parte inicial do colmo sugere que a cana analisada encontrava-se no início do processo de maturação, onde há formação das diferentes camadas da parede secundária. No caso da cana estudada, o processo de maturação havia iniciado apenas na parte inicial do colmo, que sugere uma formação das camadas secundárias sucessivas no eixo de crescimento, ou seja, forma-se primeiro na parte inicial do colmo, em seguida na parte intermediária e assim consecutivamente.

Figura 81: Padrões de espalhamento bidimensionais de: parênquima, região inicial, “casca” (a, superior); parênquima, região inicial, “casca” (a, inferior), os padrões de integração azimutais são mostrados respectivamente a direita e em triplicata para as regiões “casca e medula”.

Em feixes vasculares, independentemente da região a ser analisada, início, meio ou topo, as fibrilas elementares estão ordenadas paralelamente ao eixo de crescimento da planta. (Figura 82). A partir das Figuras 81 e 82 podemos notar também que em ambas as regiões de parênquima e feixes vasculares, “as cascas e medulas” possuem a mesma característica não apresentando diferença significativa nos ângulos das fibrilas elementares.

Figura 82: Padrões de espalhamento bidimensionais da região de: fibras vasculares, região topo, “casca” (a, superior); fibras vasculares, região inicial, “casca” (a, inferior), os padrões de integração azimutais são mostrados respectivamente a direita e em triplicata para as regiões “casca e medula”.

5.5.4 Análises de termoporometria das diferentes regiões do colmo da cana

A análise de porosidade foi feita para as diferentes regiões do colmo da cana considerando as células de parênquima e feixes vasculares separadamente. A Figura 83 apresenta as diferenças de porosidade dos feixes vasculares (FV) comparados às células de parênquima (P).

Figura 83: Variação da porosidade dos feixes vasculares e células do parênquima nas regiões de crescimento inicial, intermediária e topo do colmo da cana

Observa-se uma significativa diferença de porosidade entre as células. Os resultados mostram que as células de parênquima são até 2 vezes mais porosas do que os feixes vasculares. Isso sugere que se as diferentes células fossem submetidas a hidrólise enzimática, separadamente, o parênquima apresentaria uma maior conversão em glicose, já que devido a maior quantidade de poros teria uma área de celulose exposta à enzima maior que para os feixes vasculares. Além disso, observa-se uma significativa diferença na porosidade considerando-se as regiões de crescimento do colmo. Para ambas as células analisadas verifica-se que o topo do colmo é significativamente mais poroso que a parte intermediária e inicial. Para os feixes vasculares observa-se uma diferença de até 35% na porosidade do topo em relação ao início e meio do colmo, os quais apresentam porosidade similar, sendo o meio 15% mais poroso que o início do colmo. Para as células de parênquima esta diferença diminui sendo o topo até 15% mais poroso que o meio, e este 6% mais poroso que a parte inicial da cana.

Em relação à porosidade das células após o processamento a Figura 84 apresenta os resultados obtidos para as células de parênquima submetidas à pré-

tratamento. Devido à quantidade insuficiente de amostra não foi possível determinar a porosidade das mesmas células submetidas à deslignificação.

Figura 84: Variação da porosidade das células do parênquima nas regiões de crescimento inicial, intermediária e topo do colmo da cana, antes (IN) e após o pré-tratamento hidrotérmico (PT)

Observa-se que o pré-tratamento promove um aumento da porosidade das células do parênquima. Este aumento é mais pronunciado no topo do colmo, sugerindo que esta é a fração mais susceptível à modificação no pré-tratamento atingindo um aumento de porosidade de 14% seguida de um aumento de 12% para a parte do meio e 6% para o início do colmo.

Para os feixes vasculares, mostrados na Figura 85 nota-se um aumento bastante significativo na porosidade em função do pré-tratamento e deslignificação.

Figura 85: Variação da porosidade dos feixes vasculares nas regiões de crescimento inicial, intermediária e topo do colmo da cana, antes (IN), após o pré-tratamento hidrotérmico (PT) e deslignificação (D)

Para a parte inicial do colmo observa-se um aumento de até 54% na porosidade em função do pré-tratamento. Observa-se também que para os feixes vasculares o pré-tratamento promove um aumento significativo da porosidade, porém a deslignificação não apresenta influência nesta variável, sugerindo que toda a modificação deste parâmetro ocorre no primeiro tratamento, no caso, o pré-tratamento hidrotérmico. Para a parte intermediária do colmo também observa-se um aumento significativo de até 45% na porosidade, e finalmente para o topo foi observado um aumento menos expressivo, 21%. Portanto podemos afirmar que o aumento da porosidade dos feixes vasculares em função da região de crescimento da cana é oposto ao encontrado para o parênquima.

A maior porosidade para a região do topo do colmo pode ser explicado pelo processo incompleto de maturação e lignificação desta região. Conforme descrito por Donaldson, (2001), o processo de lignificação da parede celular ocorre primeiramente pelo preenchimento dos poros pré-existent na rede polissacarídica.

Assim, os compostos aromáticos diminuem o FBW através da redução da porosidade em si e através do aumento da massa de matéria seca. Por exemplo, assumindo-se, simplificadamente, que os compostos aromáticos apresentam a mesma densidade do gelo, e, seguida da adição de x mg de lignina no enchimento de poros há uma perda absoluta de x mg de água ligada no congelamento medido por TP-DSC. Portanto as medidas de TP-DSC evidenciam o que já foi descrito anteriormente, que o topo do colmo possui uma quantidade menor de lignina, sugerindo uma maturação ainda incompleta desta região.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstraram que o pré-tratamento hidrotérmico pode ser considerado eficiente para solubilização de hemiceluloses, e que o aumento da severidade do processo contribui para a remoção deste componente.

Uma análise do hidrolisado obtido após o pré-tratamento demonstra que apesar de ocorrer a formação de produtos de desidratação de açúcares, a concentração obtida foi baixa, o que torna este pré-tratamento adequado quanto a utilização do hidrolisado tanto para obtenção de etanol quanto de outros produtos.

Pode-se afirmar que severidades acima de 3,8, tanto para o bagaço quanto para a palha de cana podem ser consideradas crítica, uma vez que para o bagaço, acima deste valor ocorre um aumento em média de 4 vezes na quantidade de celulose solubilizada e, para esta biomassa e para a palha de cana observou-se que acima desta severidade ocorre uma redeposição de lignina sobre o material pré-tratado que impacta negativamente nas etapas subsequentes demandando mais reagente na deslignificação ou atuando como inibidor da etapa de hidrólise enzimática.

Outro fator importante analisado foi o grau de cristalinidade da celulose após o pré-tratamento e deslignificação. Este fator é de extrema relevância para a escolha de um pré-tratamento e deslignificação que preferencialmente diminua consideravelmente a cristalinidade deixando assim a celulose mais susceptível à etapa seguinte de hidrólise enzimática. Em todas as condições, e para as duas biomassas analisadas, houve uma diminuição da cristalinidade da celulose, uma vez que grande parte da fração amorfa foi removida. Observou-se que a palha de cana apresentou uma diminuição da cristalinidade da celulose mais expressiva do que para o bagaço, e avaliando os resultados do índice de cristalinidade das amostras in natura é possível afirmar que a palha possui uma estrutura menos cristalina que o bagaço de cana, e conseqüentemente apresenta uma diminuição de cristalinidade mais expressiva após os tratamentos.

Apesar de a palha apresentar uma menor solubilização e uma expressiva diminuição da cristalinidade da celulose remanescente, para uma mesma condição de pré-tratamento, comparativamente ao bagaço, houve uma menor solubilização de hemicelulose e lignina. Isso impacta em um material com menor mudança morfológica e menor superfície de contato entre a enzima e o substrato, além de uma ação inibitória da lignina sobre a enzima.

Uma análise geral das perdas indica a necessidade de avaliar as etapas prévias à hidrólise enzimática, principalmente a deslignificação, a fim de se minimizar as perdas de celulose. Esta etapa impactou significativamente na remoção de celulose atingindo valores de até 48% de solubilização para a amostra de palha deslignificada e valores superiores a 25% para o bagaço pré-tratado e deslignificado.

A hidrólise enzimática nos materiais pré-tratados e deslignificados apresentou uma alta eficiência, atingindo-se conversões reais de 60% para o bagaço e 50% para a palha de cana.

Correlacionando-se todos os resultados obtidos para o bagaço e para a palha de cana pode-se concluir que as amostras R2 e R3P, a 180°C por 20m min e 30 min respectivamente, são consideradas mais promissoras na obtenção de etanol celulósico, uma vez que apresentaram uma alta solubilização de hemicelulose, as menores perdas de celulose e, uma expressiva diminuição da cristalinidade, que contribuíram para uma alta conversão na hidrólise enzimática. Além disso, pode-se concluir que para obter uma maior conversão em glicose, para a palha de cana, é necessário um tempo maior de pré-tratamento do que para o bagaço, o que evidencia a distinta recalcitrância e características dessas biomassas.

Os resultados da caracterização conformacional, das ligninas obtidas após a deslignificação revelaram que o pré-tratamento, independente da severidade, não possui influência no raio de giro da macromolécula. Além disso, a lignina foi caracterizada como um fractal de massa, sem variações significativas nos valores de coeficiente angular encontrados. Já uma comparação entre lignina de palha e bagaço, em uma mesma condição de extração, revelou partículas coloidais de ligninas maiores para a palha.

Quando se almeja aplicar o conceito de biorrefinaria, a análise e caracterização dos produtos liberados após o pré-tratamento e a deslignificação tornam-se fundamentais na escolha do tipo de processamento da biomassa, para que ao final do processo possam ser alcançados rendimentos adequados para todos os produtos de interesse.

Além disso, compreender a atuação das diferentes variáveis sobre a biomassa contribui para uma escolha de parâmetros de processamento mais adequado para obtenção de etanol celulósico. Dentro deste contexto, as análises de microscopia revelaram uma significativa fragilidade e perda de estrutura morfológica das células de parênquima e feixes vasculares, após o pré-tratamento e deslignificação alcalina,

evidenciando que a solubilização dos componentes lignocelulósicos possui impacto direto sobre a morfologia e propriedades da parede celular vegetal. Além disso, verificaram-se diferenças significativas de tamanho das células de parênquima ao longo do colmo da cana, mostrando que ao longo do crescimento da planta, o tamanho das células de parênquima da medula e da casca podem apresentar diferenças de até 60% para o topo da cana, e para a parte intermediária e início do colmo esta diferença do tamanho das células diminuem.

As análises de microscopia Raman mostraram uma grande quantidade de ácido ferúlico e hidroxicinâmico, muitas vezes não observadas para outras biomassas como a madeira. Além disso, observou-se que, a lignina, após o pré-tratamento e deslignificação das células de parênquima foi totalmente removida. Diferentemente do que ocorre para os feixes vasculares onde, mesmo após a deslignificação foi detectado, por caracterização química e por Raman, a presença de lignina. Pode-se afirmar que a lignina remanescente nos materiais pré-tratados e deslignificados encontra-se nos feixes vasculares nas regiões de canto de células.

Em relação à orientação de celulose, os dados de Raman e SAXS evidenciaram que a parte inicial do colmo da cana possui duas direções preferenciais deste componente, sendo uma paralela ao eixo de crescimento, oriunda das contribuições da camada secundária S2 e uma perpendicular ao eixo de crescimento, proveniente da contribuição da camada S1. Esta característica não foi observada, em ambas as técnicas, para as demais regiões de crescimento da cana, as quais apresentaram apenas a contribuição da camada secundária S1.

Outro fator importante está relacionado à porosidade da parede celular das células. Os dados de termoporometria revelaram que tanto para os feixes vasculares quanto para as células de parênquima, o topo do colmo é a região mais porosa da cana.

Levando-se em conta os dados descritos acima pode-se concluir que a cana avaliada não havia completado seu período de maturação, já que detectou-se apenas a contribuição da parede S2 na parte inicial da cana e o topo do colmo é mais poroso que as demais regiões evidenciando, também uma fase de lignificação para esta região ainda incompleta.

Além disso, pode-se afirmar que o pré-tratamento possui completa influência sobre a biomassa. Observa-se que após esta etapa há um aumento significativo da porosidade da parede celular que contribui para a acessibilidade da enzima ao

substrato e consequentemente aumenta a conversão da celulose em glicose. Já o processo de deslignificação não apresentou uma influência significativa na porosidade dos materiais evidenciando a maior relevância do pré-tratamento sobre esta variável.

Considerando-se todos os resultados obtidos pode-se concluir que a combinação de pré-tratamento e deslignificação possuem uma ação sinérgica, já que, quando combinadas, aumentam significativamente a conversão de celulose à glicose, isso porque ambos apresentam contribuições para a modificação da biomassa, sendo o pré-tratamento impactante no aumento da porosidade e a deslignificação eficiente na remoção de lignina.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUSTRALIAN GOVERNMENT, The Biology of the *Sacharum* spp. (sugarcane). Disponível em: [http://www.ogtr.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/content/sugarcane-3/\\$FILE/biologysugarcane08.pdf](http://www.ogtr.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/content/sugarcane-3/$FILE/biologysugarcane08.pdf). Acesso em 14 de março 2012.
- ALIZADEH, H.; TEYMOURI, F.; GILBERT, T.I.; DALE, B.E. Pretreatment of switchgrass by ammonia fiber explosion (AFEX). **Appl Biochem Biotechnol**, v.124, p.1133–1141, 2005.
- ALLEN, G.S.; KAM,C.L.;ZEMANN, J.A.;ANTAL, Jr., J.M., Fractionation of Sugar Cane with Hot, Compressed, Liquid Water. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v.35, p. 2709-2715, 1996.
- 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, p. 4851–4861, 2010.
- ARGAVAL, U.P.; ATALLA, R.H. In-situ Raman microprobe studies of plant cell walls: Macromolecular organization and compositional variability in the secondary wall of *Picea mariana* (Mill.) B.S.P. **Planta**, v. 169, p.325-332, 1986.
- ASADA, C.; NAKAMURA, Y.; KOBAYASHI, F. Waste reduction system for production of useful materials from un-utilized bamboo using explosion followed by various conversion methods. **Biochemical Engineering Journal**, v. 23, p. 131-137, 2005.
- BARBAROTO, P.R. **Microscopio eletrônico de varredura, Medidas para caracterização e análise de materiais**. Disponível em: <http://www.dsif.fee.unicamp.br/~furio/IE607A/SEM.pdf> Acesso em agosto de 2010.
- BALAT, M.; BALAT, H.; CAHIDE, O. Progress in bioethanol processing, **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 34 p. 551–573, 2008.
- BAUCHER, M.; MONTIES, B.; VAN MONTAGUM.; BOERJAN, W. Biosynthesis and genetic engineering of lignin. **Crit. Rev. Plant Sci**, v. 17 p. 125–97, 1998.
- BEAUCAGE, G. Small Angle-Scattering from polymeric mass fractals of arbitrary mass-fractal dimension. **Journal of Crystallography**, v.29, p.134-146, 1996.
- BERGGREN, R.; MOLIN, U.; BERTHOLD, F.; LENNHOLM, H.; LINDSTRÖN, M. Alkaline degradation of birch and spruce: Influence of degradation conditions on molecular mass distributions and fibre strength. **Carbohydrate Polymers**, v.51, p.255–264, 2003.
- BIELECKI, J. Energy security: is the wolf at the door? **The Quarterly Review of Economics and Finance**, v.42, p. 235–250, 2002.
- BIOETANOL. Disponível em: <http://www.bioetanoldecana.org>. Acesso em 12 de dezembro de 2008.
- BOBLETER, O. Hydrothermal degradation of polymers derived from plants. **Prog. Polym. Sci.**, v.19, p.797–841, 1994.
- BOERJAN, W. ; RALPH, J. ; BAUCHER, M. Lignin Biosynthesis, **Annu. Rev. Plant Biol.** v.54 p.519-546, 2003.
- BOGNER, A.; JOUNEAU, P.H.; THOLLET, G.; BASSET, D.; GAUTHIER, C. A history of scanning electron microscopy developments: Towards “wet-STEM” imaging. **Micron**, v.38, p.390-401, 2007.
- BROWNELL, H.H.; SADDLER, J.N. Steam pretreatment of lignocellulosic material for enhanced enzymatic hydrolysis. **Biotechnol Bioeng**, v.29 p.228–235, 1987.

CAPARRÓS, S.; LOPÉZ, F.; DÍAS, M.J. Optimizing cellulosic paper obtained from *Arundo Donax L.* under hydrothermal treatment. **Journal of Industrial Engineering Chemistry**, v. 13, n.3, p. 465-473, 2007.

CARA, C.; RUIZ, E.; BALLESTEROS, I.; NEGRO, M.J.; CASTRO, E. Enhanced enzymatic hydrolysis of olive tree wood by steam explosion and alkaline peroxide delignification. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 423-429, 2006.

CARA, C.; MOYA, M.; BALLASTEROS, I.; NEGRO, J. M.; GONZÁLEZ, A.; RUIZ, E. Influence of solid loading on enzymatic hydrolysis of steam exploded or liquid hot water pretreated olive tree biomass. **Process Biochem.** v.42 p.1003–1009, 2007.

CAO, Y.; TAN, H. Effects of cellulase on the modification of cellulose. **Carbohydrate Research**, v.337, p.1291-1296, 2002.

CERRI, C. Mudança de estoque de carbono no solo. In: WORKSHOP ON THE IMPACT OF NEW TECHNOLOGIES ON THE SUSTENTABILITY OF THE SUGARCANE. 2009. Brasil.

CHAMPAGNE, P. Feasibility of producing bio-ethanol from waste residues: a Canadian perspective, resources. **Conserv Recycl**, v. 50 p.211–230, 2007.

CHAVES, C.M.G.F. Fenômenos de agregação. **Ci. Hoje**, v.10 p.27-32, 1989.

CHEMICAL Engineering 2012. Disponível em:
<http://www.chemical-engineering.co/2011/07/13/cellulose/> Acesso em 14 de março de 2012.

CHEN, W.H.; TU, Y.J.; HERNG-KUANG, S. Impact of dilute acid pretreatment on the structure of bagasse for bioethanol production. **Int. J. Energy Res.**, v.34, p.265–274, 2010.

CHOUDHARY, R.; UMAGILIYAGE A. L.; LIANG Y.; SIDDARAMU T, HADDOCK J.; MARKEVICIUS G. Microwave pretreatment for enzymatic saccharification of sweet sorghum bagasse. **Biomass and bioenergy**, v.39, p. 218-226, 2012.

CHUM, H.L.; JOHNSON, BLACK, S.K. Organosolv Pretreatment for Enzymatic Hydrolysis of Poplars. 2. Catalyst effects and the combined severity parameter. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 29 (2), p. 156-162, 1990.

CONAB- Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira:** cana-de-açúcar, terceiro levantamento. Disponível em:
http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_12_12_10_34_43_boletim_cana_portugues_12_2012.pdf Acesso em 05 de março de 2013.

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

Ref. CORTEZ.

COSGROVE D.J. Growth of the plant cell wall, **Nature Reviews**, v.6, p. 850-861, 2005.

CURRELI, N.; AGELLI, M.; PISU, B.; RESCIGNO, A.; SANJUST, E.; RINALDI, A. Complete and efficient enzymic hydrolysis of pretreated wheat straw. **Process Biochemistry**, v.37, p.937-941, 2002.

DANILATOS, G.D. Environmental Scanning Electron Microscopy and Microanalysis. **Mikrochim. Acta**, v. 114/115, p. 143-155, 1994.

DANTAS FILHO, D.L.P. **Análise de custo na geração de energia com bagaço de cana-de-açúcar: um estudo de caso em quatro usinas em São Paulo**, 2009. 70p. Dissertação (Mestrado em energia), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

DE OLIVERIA MED, V. B.E; RYKIEL, Jr. E.J. Ethanol as fuel: energy, carbon dioxide balances, and ecological footprint. **BioScience**, v. 55, p.593–602, 2005.

Di RISIO, S.; HU, C.S.; SAVILLE, B.A.; LIAO, D.; LORTIE, J. Large-scale, high- solids enzymatic hydrolysis of steam-exploded poplar. **Biofuels, Bioprod. Bioref.**, v. 5, p.609–620, 2011.

DIAS, O.S.M.; ENSINAS, V.A.; NEBRA, A.S.; FILHO, M.R.; ROSSELL, E.V.C.; MACIEL, R.W.M. Production of bioethanol and other biobased materials from sugarcane bagasse: Integration to conventional bioethanol production process. **Chemical engineering research and design**, v. 87, p. 1206–1216, 2009.

DONALD, A.M.; BAKER, F.S.; SMITH, A.C.; WALDRON, K.W. Fracture of plant tissue and wall as visualized by scanning electron microscopy. **Annals of Botany**, v.92, p. 73-77, 2003.

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

DRIEMEIER, C.; CALLIGARIS, A.G. Theoretical and experimental developments for accurate determination of crystallinity of cellulose I materials. **Journal of applied Crystallography**, v. 44, p.184-192, 2011.

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

EDER, M.; STANZL-TSCHEGG.; BURGERT, I. The fracture behaviour of single wood fibres is governed by geometrical constraints: in situ ESEM studies on three fibre types. **Wood Sci Technol**, v. 42, p.679–689, 2008.

EDWARDS, H.G.M.; FARWELL, D.W.; WEBSTER, D. FT Raman microscopy of untreated natural plant fibres. **Spectrochimica Acta Part A**, v.53, p. 2383-2392, 1997.

EPE- Empresa de Pesquisa Energética. **Perspectivas para o etanol no Brasil**. Disponível em: http://www.observatoriadoagronegocio.com.br/page41/files/EPE_PerspecEtanol%20no%20Brasil.pdf Acesso em 27 de março de 2012.

FEIGIN, L.A.; SVERGUN, D.I. **Structural analysis by small angle x-ray and neutron scattering**, New York: Plenum Press, 1987. ISBN: 978 0306426292.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood Chemistry, Ultrastructure, reactions, Berlin**: Walter de Gruyter, 1989.

GARROTE, G.; DOMINGUEZ, H.; PARAJO, J.C. Hydrothermal processing of lignocellulosic materials. **Holz Roh Werkst**, v.57,p. 191–202,1999.

GENENCOR, A DANISCO DIVISION. **Accellerase 1500, Cellulase Enzyme Complex for Lignocellulosic Biomass Hydrolysis**, 2009 .Disponível em: http://www.danisco.com/uploads/tx_tcdaniscofiles/ACCELLERASE%2B1500%2Bprod%2Binfo%2Bsheet.pdf. Acesso em 20 de março de 2012.

GIERLINGER, N.; SCHAWANNINGER M. Chemical Imaging of Poplar Wood Cell Walls by Confocal Raman Microscopy. **Plant Physiology**, v. 140, p. 1246–1254, 2006.

GLATTER, O.; KRATKY O. **Small Angle X-ray scattering**. London: Academic Press, 1982.

GOLDEMBERG, J. The promise of clean energy. **Energy Policy**, v. 34, p. 2185–2190, 2006.

GONÇALVES, A.R.; MORIYA, Y.R.; OLIVEIRA, L.R.M.; SAAD, M.B.W. Xylanase recycling for economical biobleaching of sugarcane bagasse and straw pulps. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, p. 157-163, 2008.

GOUVEIA, E. R.; NASCIMENTO, R. T.; SOUTO-MAIOR, A. M.; ROCHA, G. J. M. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, p.1-4, 2009.

GRAF, A.; OREGON, K. T. **Cellulose-ethanol study: an evaluation of the potential for ethanol production in Oregon using cellulose based feedstocks**. Disponível em: <http://www.oregon.gov/ENERGY/RENEW/Biomass/docs/OCES/OCES.PDF?ga=t> Acesso em 27 de março de 2012.

GRASSES. **The Grass plant**. Disponível em: http://www.fog.org.au/grasses_of_nsw/grasses_of_nsw.htm .Acesso em 14 março 2012.

HALL, D.O. Biomass energy in industrialised countries-a view of the future. **Forest Ecology and Management**, v. 91, p.17-45, 1997.

GREGG, D.J.; BOUSSAID, A.; SADDLER, J.N. Techno-economic evaluations of a generic wood-to-ethanol process: effect of increased cellulose yields and enzyme recycle. **Bioresource Technology**, v. 63, p. 7-12, 1998.

GUIMARÃES, J.L.; FROLLINI E.; SILVA, C.G.; WYPYCH, F.; SATYANARAYANA, K.G. Characterization of banana, sugarcane bagasse and sponge gourd fibers of Brazil. **Industrial Crops and Products**, v. 30 p.407–415, 2009.

GUINIER, A.; FOURNET G. **Small angle scattering of x-rays**. 268 p. New York Wiley, 1955.

GUSAKOV, A.V.; SALANOVICH, T.N.; ANTONOV, A.I.; USTINOV, B.B.; OKUNEV, O.N.; BURLINGAME, R. Design of highly efficient cellulose mixtures for enzymatic hydrolysis of cellulose. **Biotechnol Bioeng**, v.97 p.1028–38, 2007.

HARRISON, A. **Fractals in chemistry**. Oxford: Science Publications, 1992, 90 p.

HEITZ M, CHORNET E, CAPEK E, KOEBERLE P, GAGNÉ J, OVEREND R.P., TAYLOR J.D., YU E Fractionation of Populus Tremuloides at the Pilot Plant Level: Optimization of Pretreatment Conditions Via Steam Explosion Using the STAKE II Technology. In: CANADIAN 7TH BIOENERGY R&D SEMINAR, 1989.

HEITZ, M.; CAPEK-MENARD, E.; KOEBERLE, P.G.; GAGNÉ, J.; CHORNET, E. Fractionation of populus tremuloides at pilot plant scale: Optimization of steam pretreatment conditions using the STAKE II technology. **Bioresource Technology**. v.35, p.23-32, 1991.

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

HIMMEL, M.E.; DING.S.Y.; JONHSON D.K.; ADNEY, W.S.; NIMLOS, M.R.; BRADY J.W.; FOUST, T.D. Biomass Recalcitrance: Engineering Plants and Enzymes for Biofuels Production. **Science**, v.315, p.804-807, 2007.

HOEL, M.; KVERNDOKK, S. Depletion of fossil fuels and impacts of global warming. **Resources and Energy economics**, v.18, p. 115-136, 1996.

HONGZHANG, C.; LIYING L. Unpolluted fractionation of wheat straw by steam explosion and ethanol extraction. **Bioresource Technology**, v.98, p. 666-676, 2007.

HOWARD, R.L.; ABOTSI, E.; VAN RENSBURG, E.L.J.; HOWARD, S. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. **Afr J Biotechnol**, v.2 p.602–19, 2003.

IEA. **Key World Energy Statistics, 2009**, disponível em:

http://www.iea.org/textbase/nppdf/free/2009/key_stats_2009.pdf .Acesso em 10 julho de 2010.

INDACOECHEA, I.; BOLADO, S.; GARCÍA-CUBER, M.T.; DIEZ, R. Pretreatment processes of lignocellulosic material for bioethanol conversion: ozonolysis. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF CHEMICAL AND PROCESS ENGINEERING, 17., 2006, Chisa, Prague.

IONASHIRO, M.; GIOLITO, I. Nomenclatura, padrões e apresentação dos resultados em análise térmica. **Cerâmica**, v. 26, p.17 – 24, 1980.

JAKOB, H.F.; FRATZL, P.; TSCHEGG, S.E. Size and arrangement of elementary cellulose fibrils in wood cell: A small angle X-ray scattering study of *Picea abies*. **Journal of Structural Biology**, 113, 13-22, 1994.

KAAR, W.E.; GUTIERREZ, C.V.; KINOSHITA, C.M. Steam Explosion of Sugarcane Bagasse as a Pretreatment for Conversion to Ethanol. **Biomass and Bioenergy**, v.14, n.3, p. 277-287, 1998.

KARLSSON, J.O.; ANDERSSON, M.; BERNTSSON, P.; CHIHANI, T.; GATENHOLM, P. Swelling behavior of stimuli-responsive cellulose fibers. **Polymer**, v.39, n.16, p. 3589-3595, 1998.

KIM, K.H.; HONG, J. Supercritical CO₂ pretreatment of lignocellulose enhances enzymatic cellulose hydrolysis. **Bioresource Technol**, v.77 p.139–44, 2001.

KELLER, F.A. Integrated bioprocess development. In: **Handbook on Bioethanol: Production and Utilization**. Wyman, C.E. (Editor). Washington: Taylor & Francis, cap. 17, p. 381-394.

KNILL, C. J.; KENNEDY, J. F. Degradation of cellulose under alkaline conditions. **Carbohydrate Polymers**, v.51, p.281–300, 2003.

KUMAR, R.; WYMAN, C.E. Does change in accessibility with conversion depend on both the substrate and pretreatment technology? **Bioresour. Technol.**, v.100,p. 4193–4202, 2009.

KRUYT, B.; VANVUUREN, D.P.; DEVRIES, H.J.M.; GROENENBERG, H. Indicators for energy security. **Energy Policy**, v.37, p.2166–2181, 2009.

LABAT, G.A.A.; GONÇALVES, A.R. Oxidation in Acidic Medium of Lignins from Agricultural Residues. **Appl Biochem Biotechnol**, v.148, p. 151–161, 2008.

LASER, M.; SCHULMAN, D.; ALLEN, G. S.; LICHWA, J.; ANTAL, JR. M.J.; LYND, R.L. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. **Bioresource Technology**, v.81 p. 33±44, 2002.

LEVAN, S.L.; ROSS, R.J.; WINANDY, J.E. **Effects of fire retardant chemicals on bending properties of wood at elevated temperatures.**

Disponível em: <http://128.104.77.228/documnts/fplrp/fplrp498.pdf> Acesso em 27 de março de 2012.

LIN, Y.; TANAKA, S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects, **Appl. Microbiol. Biotechnol**, v.69, p.627-642, 2006.

LIU, C.-FU.; SUN, R.C.; QIN, M.-HUA.; ZHANG, A.-PING.; REN J.L.; FENG, XU F.; YEJ, J.; WU, S.B. Chemical modification of ultrasound-pretreated sugarcane bagasse with maleic anhydride. **Industrial Crops and Products**, v.26 p.212–219, 2007

LYND, L.R.; WEIMER, P.J.; VAN, Z.Y.L.W.H.; PRETORIUS, I.S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiol Mol Biol Rev**, v.66, n.3, p.506- 577, 2002.

LUO, L.; VAN DER VOET, E.; HUPPES, G. Biorefining of lignocellulosic feedstock – Technical, economic and environmental considerations. **Bioresource Technology**, v.101, p.5023–5032, 2010.

LUZ, S.M.; GONÇALVES, A.R.; DEL ARCO JUNIOR, A.P. Mechanical behavior and microstructural analysis of sugarcane bagasse fibers reinforced polypropylene composites. **Composites: Part A**, v.38, p. 1455–1461, 2007

MANDELBROT, B.B. **The fractal geometry of nature – update and augmented**. New York, Freeman, 1983. p. 568.

MANDELS, M.; ANDREOTT, R.; ROCHE, C. Measurement of saccharifying cellulose. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, v.6, p. 2-34, 1976.

MANSARAY, K.G.; GHALY, A.E. Determination of kinetic parameters of rice husks in oxygen using thermogravimetric analysis. **Biomass and Bioenergy**, v.17, p.19±31, 1999.

MANSFIELD, S.D.; MOONEY, C.; SADDLER, J.N. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. **Biotechnol. Prog.** v.15, p.804–816, 1999.

MARTÍN, C.; GALBE, M.; WAHLBOM, C.F.; HAHN-HÄGERDAL, B.; JÖNSSON, L.J. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.31, p.274-282, 2002.

MAZIERO P., **Estudos Topoquímicos de bagaço e palha de cana-de-açúcar durante o processamento de etanol**. 1º relatório científico FAPESP 2009/00874-5 - avaliação da assessoria científica da FAPESP que acompanhou o projeto (maio de 2010).

MAZIERO, P.; OLIVEIRA NETO, M.; MACHADO, D.; BATISTA, T.; CAVALHEIRO, C.; NEWMANN, M.G.; CRAIEVICH, A.; ROCHA, G.J.M.; POLIKARPOV, I.; GONÇALVES, A.R. Analysis of the stability and structure of oxidized lignin from sugar cane bagasse. **Industrial Crops and Products**, v. 35, p.61– 69, 2012.

McDOUGALL, G. J.; MORRISON, I. M.; STEWART, F.; WEYERS, J. D. B. R.; HILLMAN, J. R. Plant fibres: botany, chemistry and processing for industrial use. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.62, p.1-20, 1993.

MILÉO, P.C.; MULINARI, D.R.; BAPTISTA, C.A.R.P.; ROCHA, G.J.M.; GONÇALVES, A.R. Mechanical Behaviour of Polyurethane from Castor oil Reinforced Sugarcane Straw Cellulose Composites. **Procedia Engineering**, v.10, p. 2068–2073, 2011.

MIHRANYAN, A.; LLAGOSTERA, A.P.; KARMHAG, R.; STROMME, M.; Ek, R. Moisture sorption by cellulose sorption of varying crystallinity. **International Journal of Pharmaceutics**, v.269, p.433-442, 2004.

MONIQUE, H.; FAAIJ, A.; VAN DEN BROEK, R.; BERNDES, G.; GIELEN, D.; TURKENBURG, W. Exploration of the ranges of the global potential of biomass for energy. **Biomass Bioenergy**,

MONIRUZZAMAN, M. Saccharification and Alcohol Fermentation of Steam-Exploded Rice Straw. **Bioresource Biotechnology**, v.55, p.111-117, 1996.

MOORE, P.H. Anatomy and morphology. In: SUGAR cane improvement through breeding. Amsterdam: Elsevier; 1987. p.:85-142.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; HOLTZAPPLE, Y.Y.L.M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technol.**, v. 96, p.673–86, 2005a.

MOSIER, N.; HENDRICKSON, R.; HO, N.; SEDLAK, M.; LADISCH, M.R. Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover. **Bioresour. Technol.** v.96, p.1986–1993, 2005b.

MURAD, H.A.; AZZAZ, A. Cellulase and dairy animal feeding. **Biotechnology**, v. 9, p. 238-256, 2010.

MUSSATO, S. I.; DRAGONE, G.; ROCHA, G. J. M.; ROBERTO, I. C. Optimum operating conditions for brewer's spent grain soda pulping. **Carbohydrate Polymers**, v.64, p.22-28, 2006.

NIKOLIC, S.; MOJOVIC, L.; RAKIN, M.; PEJIN, D.; PEJIN, J. Ultrasound-assisted production of bioethanol by simultaneous saccharification and fermentation of corn meal. **Food Chemistry** v. 122, p. 216–222, 2010.

NORGREN, M.; EDLUND, H.; WAGBERG, L. Aggregation of Lignin Derivatives under Alkaline Conditions. Kinetics and aggregate structure. **Langmuir**, v.18, p.2859-2865, 2002.

NREL Biomass Research: Disponível em <http://www.nrel.gov/biomass/biorefinery.htm> , acesso em 25 de abril de 2010.

NTNU: Norwegian University of Science and Technology, paper online. **Monocotyledons** Disponível em: <http://www.chemeng.ntnu.no/research/paper/Online-articles/Nonwoods/Nonwood.html>. Acesso em 14 março 2012.

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 NETO, M ; Alonso, R. L. ; LEITE, F. L. ; OLIVEIRA JUNIOR, Osvaldo Novais de ; POLIKARPOV, I ; MASCARENHAS, Y. P. . Simulated Annealing of Two Electron Density Solution Systems. In: Cher Ming Tan. (Org.). **Simulated Annealing**:2008, p. 343-361.

OVEREND, R.P.; CHORNET, E. Fractionation of Lignocellulosics by Steam-Aqueous Pretreatments [and Discussion]. **Phil. Trans. R. Soc. Lond**, v.321, p. 523-536, 1987.

OYEKOLA, O.O. **The enzymology of sludge solubilisation under biosulphidogenic conditions: isolation, characterisation and partial purification of endoglucanases.** Dissertação. (Mestrado em Ciências), Rhodes University, Grahamstown, South Africa, 2004

PAN, X.; GILKES, N.; SADDLER, J.N. Effect of acetyl groups on enzymatic hydrolysis of cellulosic substrates. **Holzforschung**, v.60 p.398–40, 2006.

PARK, S.; LEE, S.; JEONG, J.S.; SONG, J.H.; PARK, W.J. Assessment of CO₂ emissions and its reduction potential in the Korean petroleum refining industry using energy-environment models. **Energy**, v. 35, p.2419-2429, 2010.

PAULO, C.M.A. **Influência da agitação mecânica e da composição enzimática no tratamento do algodão com celulasas.** Tese. (Doutorado em engenharia têxtil)- Universidade do Minho, Portugal, 1995.

PETERSEN, O.M.; LARSEN, J.; THOMSEN, H.M. Optimization of hydrothermal pretreatment of wheat straw for production of bioethanol at low water consumption without addition of chemicals. **Biomass and Bioenergy**, v. 33 p. 834 – 840, 2009.

PLANT. **Detailed chemical structure of a portion of lignina molecule.** Disponível em: <http://5e.plantphys.net/article.php?ch=t&id=24> .Acesso em 14 de março de 2012.

PRINCETON INSTRUMENTS. **Confocal Raman microscopy**: General Overview. Disponível em: http://content.piacton.com/Uploads/Princeton/Documents/Library/UpdatedLibrary/Confocal_raman_microscopy_note.pdf. Acesso em 27 de março de 2012.

RAMOS, R.A. **Correlação entre propriedades físico-químicas de celuloses e sua solubilização e derivatização em LiCl/DMAc e DMSO/TBAF.3H₂O**. Tese (Doutorado em Química), Instituto de Química de São Carlos, USP, São Carlos, 2005.

REINIKAINEN, T. **The Cellulose Binding Domain of Cellobiohydrolase I from Trichoderma Reesei**. Tese. (Doutorado), VTT Publications, Espoo, v. 206, Finland, 1994.

REESE, E.T.; SIU, R.G.H.; LEVINSON, H.S. Biological degradation of soluble cellulose derivatives. **J. bacteriol**, v.59, p. 485-497, 1950.

REZENDE, C.A.; LIMA, M.A.; MAZIERO, P.; AZEVEDO, E.R.; GARCIA, W.; POLIKARPOV, I. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. **Biotechnology for Biofuels**. v.4, 2011, doi:10.1186/1754-6834-4-54

RICHTER, S.; MUSSIG J.; GIERLINGER N. Functional plant cell wall design revealed by the Raman imaging approach. **Planta** v.233, p.763–772, 2011.

RIVERS, D.B.; EMERT, G.H. Lignocellulose pretreatment: a comparison of wet and dry ball attrition. **Biotechnol Lett**, v.9 p.365–8, 1987.

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, p. 274– 279, 2012.

ROCHA, G. J. M.; SILVA, F. T.; ARAÚJO, G. T.; CURVELO, A. A. S. A fast and accurate method for determination of cellulose and polyoses by HPLC. In: BRAZILIAN SYMPOSIUM ON THE CHEMISTRY OF LIGNIN AND OTHER WOOD COMPONENTS, 1997, Curitiba. **Anais**. Curitiba: UFPR, 1997, v.5.

SAAD, M. B.W. **Avaliação técnica e econômica preliminar da produção de etanol via hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar**, Dissertação de Mestrado, Escola de Engenharia de Lorena (Mestrado em Biotecnologia Industrial), Lorena- São Paulo, 2010.

SAAR, B.G.; ZENG, Y.; FREUDIGER, C.W.; LIU Y-S.; HIMMEL, M.E.; XIE, X.S.; DING, S-Y. Label-Free, Real-Time Monitoring of Biomass Processing with Stimulated Raman Scattering Microscopy. **Angew. Chem. Int. Ed**, v.49, p.5476 –5479, 2010.

SAKA, S.; GORING, D.A.I. Localization of lignins in wood cell walls. In: BIOSYNTHESIS and Biodegradation of Wood Components, ed. T Higuchi, p. 51–62, 1985.

SALAS-HERNANDEZ, J.M.; VILLA-RAMIREZ, J.S.; VELOZ-RENDON; RIVERA-HERNANDEZ, K.N.; GONZALEZ-CESAR, R.A.; PLASCENCIA-ESPINOSA, M.A.; TREJO-ESTRADA, S.R. Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse. **Bioresource Technology**, v.100 p.1238–1245, 2009.

SANTOS, M.L.; LIMA, O.J.; NASSAR, E. J.; CIUFFI, K.J.; CALEFI, P.S. Estudos das condições de estocagem do bagaço de cana-de-açúcar por análise térmica. **Química Nova**. v, 34 (3), p.507-511, 2011.

SCHMIDT P. Small-Angle Scattering Studies of Disordered, Porous and Fractal Systems. **J. Appl. Cryst.**, v.24,p. 414-435, 1991.

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

SEABRA, J. E. A. **Análise de opções tecnológicas para uso integral da biomassa no setor de cana-de-açúcar e suas implicações**. 2008. 298p. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

SENDELIUS, J. **Steam Pretreatment Optimisation for Sugarcane Bagasse in Bioethanol Production**. 2005. Dissertação (Master at Chemical Engineering)- Lund University, Sweden, 2005.

SENESE, N.; RIZZI, F.R.; DELLINO, P. & ACQUAFREDDA, P. Fractal humic acids in aqueous suspensions at various concentrations, ionic strengths, and pH values. **Coll. Surf.**,v.127 p.57-68, 1997.

SEO, D. K.; PARKA, S. S.; HWANGA, J.; YU, T. Study of the pyrolysis of biomass using thermogravimetric analysis (TGA) and concentration measurements of the evolved species, **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v.89, p.66–73, 2010.

SHAFIEE, S.; TOPAL, E. A long-term view of worldwide fossil fuel prices. **Applied Energy**, v. 87, p. 988–1000, 2010.

SILVA, A.C.; MENDONÇA, E.S.; MARTINS, M.L.; REIS, C. A natureza fractal de ácidos húmicos. **R. Bras. Ci. Solo**, v.24, p.759-766, 2000.

SILVA, A.A.; HYROYUKI, I.; TAKASHI, E.; SHINICHI, Y.; BON, E.P.S. Milling pretreatment of sugarcane and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. **Bioresource Technology**. v. 101, p.7402-7409,2010.

SILVERSTEIN, R.A.; CHEN, Y.; SHARMA-SHIVAPPA, R.R.; BOYETTE, M.D.; OSBORNE, J. A. comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. **Bioresource Technol**, v.98 p. 3000–3011, 2007.

SINGHANIA, R.R.;, SUKUMARAN, R.K.; PATEL, K.A.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases, **Enzyme and Microbial Technology**, v.46 p.541–549,2010.

SIQUEIRA, G.; MILAGRES, M.F.A.; CARVALHO, W.; KOCH, G.; FERRAZ, A. Topochemical distribution of lignin and hydroxycinnamic acids in sugar-cane cell walls and its correlation with the enzymatic hydrolysis of polysaccharides. **Biotechnology for Biofuels**, v.4, p.1-9, 2011.

SLUITER, J.; SLUITER, A. **Summative mass closure- Laboratory Analytical procedure LAP**. Technical report NREL/TP-510-48087, Golden, CO, July, 2011.

STICKLEN, B.M. Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. **Nature reviews genetics**, v.9, p. 433-443, 2008.

STOKES, D.J. Recent advances in electron imaging, image interpretation and applications: environmental scanning microscopy. **Phil. Trans. R. Soc. Lond. A**, v. 361, p. 2771–2787, 2003.

TANIMOTO, T.S. **Utilização da engenharia interfacial para preparação de superfícies nano-estruturadas de Au pela aproximação bottom up**. Tese (Doutorado em Química Analítica), Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos, São Carlos, 2006.

TETARD, L.; PASSIAN, A.; FARAH, H.R.; KALLURI, U.C.; DAVISON, B.H.; THUNDAT, T. Spectroscopy and atomic force microscopy of biomass. **Ultramicroscopy**, v.106, p. 701-707, 2010.

TOMALSQUIM, M. **Balanço energético nacional- ANO BASE 2007- EPE- Empresa de Pesquisa energética**. Disponível em: http://www.epe.gov.br/imprensa/apresentacaoevento/20080508_1.pdf Acesso em 10 de março de 2013.

TURRELL, G.; DHAMELIN COURT, P. **Characteristics of Raman microscopy. Raman microscopy developments and applications**. New York: Elsevier, 1996. ISBN: 978-0-12-189690-4.

VAINIO, U.; MAXIMOVA, N.; HOTLING, Bo.; LAINE, J.; STENIUS, P.; SIMOLA, K.L.; GRAVITIS, J.; SERIMAA, R.; Morphology of Dry Lignins and Size and Shape of Dissolved Kraft Lignin Particles by X-ray Scattering. **Langmuir**, v. 20, p. 9736-9744, 2004.

VAN DILLEWIJN, C. El tallo. In **Botánica de la caña de azúcar**. Instituto del Libro: La Habana, Cuba, 1951. p. 1-29.

WEO World Energy outlook, **Executive summary, International energy agency (IEA)**, 2009.

WILDENBORG, T.; LOKHORST, A. Introduction on CO₂ Geological storage-classification of storage options. **Oil Gas Sci Technol Rev IFP**, v. 60 p.513-515, 2005.

WLLEY, H.J.; ATALLA, H.R. Band assignments in the Raman spectra of celluloses. **Carbohydrate Research**, v.170, p. 113-129, 1987.

WLLEY, H.J.; ATALLA, H.R. Band assignments in the Raman spectra of celluloses. **Carbohydrate Research**, v.170, p. 113-129, 1987.

WINANDY, J.E. **Effects of fire retardant treatments after 19 months of exposure at 150F** Disponível em: <http://www.fpl.fs.fed.us/documnts/fplrn/fplrn264.pdf>. Acesso em 20 de março de 2012.

WOOD, T.M.; McCRAE, S.I. Synergism between enzymes involved in the solubilization of native cellulose. **Adv Chem Ser**, v. 181, p.181– 209,1979.

WOOD, T. M.; SADDLER, J. N. Increasing the availability of cellulose in biomass materials. **Methods in Enzymology**, v.160, p.3-11, 1988.

YANG, B.; WYMAN, E.C. Pretreatment: the key to unlocking low cost cellulosic ethanol. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 21, p. 26 – 40, 2007.

YANG, X.; ZENG, Y.; MA, F.; ZHANG, X.; YU H. Effect of biopretreatment on thermogravimetric and chemical characteristics of corn stover by different white-rot fungi, **Bioresource Technology**, v.101, p.5475–5479, 2010.

ZHANG, L.; WANG, T.; JIAO, S.; HAO, C.; MAO, Z. Effect of steam-explosion on biodegradation of lignin in wheat straw. In: **ASAE ANNUAL MEETING**, 2007, June p.17–20, Minneapolis, Minnesota. Paper number 077076.

ZHANG, Y.H.P.; HIMMEL, M.E.; MIELENZ, J.R. Outlook for cellulose improvement: screening and selection strategies. **Biotechnol Adv**, v.24 p.452–81, 2006.

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

ZHAO, H.; KWAK, H.J.; ZHANG, C.Z.; BROWN, M.H.; AREY, B.W.; HOLLADAY, J.E. Studying cellulose fiber structure by SEM, XRD, NMR and acid hydrolysis. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, p.235–241, 2007.