UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

VINÍCIUS FERNANDES NUNES DA SILVA

**Avaliação de parâmetros experimentais do fracionamento
do bagaço de cana-de-açúcar na obtenção de etanol
celulósico e lignina**

Lorena
2014

VINÍCIUS FERNANDES NUNES DA SILVA

**Avaliação de parâmetros experimentais do fracionamento
do bagaço de cana-de-açúcar na obtenção de etanol
celulósico e lignina**

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 Microbiologia Aplicada

Orientador: Prof. Dr. George Jackson de Moraes
Rocha

Co-orientador: Prof. Dr. Adilson Roberto
Gonçalves

Edição reimpressa e corrigida

Lorena
Novembro, 2014

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

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

Silva, Vinícius Fernandes Nunes da

Avaliação de parâmetros experimentais do fracionamento do bagaço de cana-de-açúcar na obtenção de etanol celulósico e lignina. / Vinícius Fernandes Nunes da Silva. –ed. reimpr., corr.-2014.

145 p.: il.

Tese (Doutor em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2014.

Orientador: George Jackson de Moraes Rocha

Co-orientador: Adilson Roberto Gonçalves

1. Fracionamento do bagaço de cana-de-açúcar 2. Etanol 3. *Saccharomyces cerevisiae* Pe-2 4. Reciclo de células 5. Caracterização de lignina. I. Título. II. Rocha, George Jackson de Moraes, orient. III. Gonçalves, Adilson Roberto, co-orient.

664.113 - CDU

*Dedico esta tese aos meus pais Néelson e
Lusmarina, meus irmãos Pétersson e
Stéfanni, e aos meus avós João e Guiomar,
pelo carinho, amor e apoio constante.*

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força, fé e coragem ao longo desta caminhada.

A minha família, que mesmo estando distante, sempre me proporcionou estímulo, apoio e confiança para superar mais este desafio.

Ao Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena, pela formação recebida desde o estágio de iniciação científica.

Ao CNPq, pela bolsa de doutorado.

Ao Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), em nome do Dr. Carlos Eduardo Vaz Rossell, pela disponibilidade de suas instalações para a realização de grande parte deste trabalho.

A todo corpo técnico científico do CTBE/CNPEM que direta ou indiretamente auxiliou neste trabalho, em especial Alex, Claudete, Cristiane, Edgar, Elisiane, Fernanda, Karen, Leila, Lívia, Lúcia, Maiko, Renan, Rogério, Sidney, Silvane, Simone, Suzane, Tatiane e Viviane.

Aos colegas de laboratório do “Lado B” pelos momentos de descontração e companheirismo.

Ao Prof. Dr. George Jackson de Moraes Rocha, pela orientação, aprendizado, paciência e grande amizade, desde a época da FAENQUIL.

Ao Prof. Dr. Adilson Roberto Gonçalves, pela co-orientação, amizade e grande aprendizado durante as discussões de resultados desta tese.

À Dra Jaciane Ienczak pelo suporte e aprendizado na área de fermentação alcoólica.

Ao Dr. Carlos Driemeier pelo suporte e discussão de resultados de difração de raios-X e termoporometria.

Ao Serviço Alemão de Intercâmbio Acadêmico (DAAD), pelo auxílio recebido para a realização de estágio no Departamento de Química da Madeira da Universidade de Hamburgo.

Aos Drs. Bodo Saake, Ralph Lehnen e Dietrich Meier pela disponibilidade da infraestrutura de seus laboratórios em Hamburgo e supervisão na área de caracterização de ligninas.

RESUMO

SILVA, V. F. N. **Avaliação de parâmetros experimentais do fracionamento do bagaço de cana-de-açúcar na obtenção de etanol celulósico e lignina.** 2014. 145p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2014.

Este trabalho teve como objetivo o estudo de parâmetros experimentais do fracionamento do bagaço de cana-de-açúcar, tais como o tipo de ácido (H_3PO_4 1,5 % m/v e H_2SO_4 1,0 % m/v) empregado como catalisador na etapa de pré-tratamento em reator piloto (350 L) a 120 °C por 20 min. Avaliou-se também os efeitos de temperatura, tempo, concentração de hidróxido de sódio e relação sólido-líquido, de acordo com um planejamento fatorial completo 2^4 com três repetições no ponto central, para a etapa de deslignificação alcalina em reator de bancada (2 L) do bagaço de cana-de-açúcar previamente pré-tratado de forma a obter uma fração celulósica com elevadas taxas de conversão enzimática e maior recuperação de lignina no licor negro. As melhores condições experimentais obtidas em reator de bancada para o processo de deslignificação alcalina foram reproduzidas em reator piloto de 350 L, como forma de escalonamento deste processo. As ligninas obtidas foram caracterizadas e a fração celulósica da polpa bruta do bagaço pré-tratado com ácido fosfórico foi submetida à hidrólise enzimática de forma a obter quantidade de hidrolisado suficiente para a realização de um ensaio de fermentação alcoólica, com *Saccharomyces cerevisiae* Pe-2, em biorreator de 700 mL de volume de trabalho, empregando a tecnologia de reciclo de células. Os resultados mostraram que o pré-tratamento com H_3PO_4 1,5 % (m/v) removeu 45,5 % de hemicelulose, contra 75,6 % pelo pré-tratamento com H_2SO_4 1,0 % (m/v). Os fatores concentração de NaOH e relação sólido-líquido apresentaram maior influência do que os fatores tempo e temperatura, no processo de deslignificação alcalina dos bagaços pré-tratados, sendo reproduzidas em escala piloto as condições 120 °C, 30 min, NaOH 1,5 % (m/v) e relação sólido-líquido 1:15. Estas condições de reação proporcionaram a obtenção de polpas celulósicas com conversão enzimática próxima a 80 %. Análises das polpas celulósicas por difração de raios X comprovam um aumento de cristalinidade da celulose, proporcionada pela remoção de hemicelulose e lignina. Já a análise de termoporometria mostrou um aumento do tamanho dos poros na estrutura da celulose, ao longo do seu processamento. Imagens de microscopia eletrônica de varredura mostram uma maior exposição das fibras celulósicas no bagaço de cana após a deslignificação alcalina. O ensaio de fermentabilidade mostrou que o hidrolisado celulósico foi bem assimilado pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* Pe-2, com a possibilidade da realização de 5 bateladas sucessivas, sendo obtidos valores de 0,45 g/g para $Y_{P/S}$ e 5,81 g L⁻¹h⁻¹ para produtividade. As ligninas obtidas apresentaram características muito parecidas entre si com pureza (lignina total) entre 95-97 %, massa molar média entre 9500 e 10200 g mol⁻¹, ponto de transição vítrea entre 140 e 160 °C, poder calorífico na ordem de 25 MJ/kg, sendo atribuída a razão H:G:S de 1:0,9:1,1 para a lignina (ácido fosfórico) e 1:1,4:1,7 para a lignina (ácido sulfúrico). Pelos resultados de caracterização foram também propostas as fórmulas $\text{C}_9\text{H}_{8,57}\text{O}_{2,64}(\text{OCH}_3)_{1,00}$ para a lignina (ácido fosfórico) e $\text{C}_9\text{H}_{9,05}\text{O}_{3,19}(\text{OCH}_3)_{0,92}$ para a lignina (ácido sulfúrico).

Palavras-chave: Fracionamento do bagaço de cana-de-açúcar. Etanol. *Saccharomyces cerevisiae* Pe-2. Reciclo de células. Caracterização de ligninas.

ABSTRACT

SILVA, V. F. N. **Evaluation of experimental parameters of sugarcane bagasse fractionation in obtaining cellulosic ethanol and lignin.** 2014. 145p. Thesis (Doctoral of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, São Paulo.

This work aimed to the study of experimental parameters of sugarcane bagasse fractionation, such as, the type of acid (H_3PO_4 1.5 % w/v and H_2SO_4 1.0 % w/v) employed as catalyst in the pretreatment step carried out in a 350 L pilot reactor at 120 °C for 20 min. Temperature, time, NaOH concentration and solid to liquid ratio effects were also evaluated according to a 2^4 full factorial design with three replications in the central point, for the alkaline delignification of pretreated bagasse, carried out in a 2 L reactor, aiming to get cellulosic fraction with high enzymatic conversion rates and greater lignin recovery in black liquor. Scaling up the alkaline delignification process, the best experimental conditions obtained from 2 L reactor were reproduced in 350 L reactor. Lignins obtained were characterized and the cellulosic fraction from bagasse pulp pretreated with H_3PO_4 was subjected to enzymatic hydrolysis in order to obtain sufficient amount of hydrolysate to conduct an alcoholic fermentation assay with *Saccharomyces cerevisiae* Pe-2 yeast in a bioreactor with 700 mL working volume, employing the cell recycle technology. The results showed that 45.5 % of hemicellulosic fraction were solubilised by H_3PO_4 1.5 % w/v pretreatment, versus 75.6 % of hemicellulose that was solubilised by H_2SO_4 1.0 % w/v. In the alkaline delignification process of pretreated sugarcane bagasse, NaOH concentration and solid to liquid ratio factors had higher influence than the time and temperature factors, with 120 °C, 30 min, NaOH 1.5 % (w/v) and 1:15 solid to liquid ratio conditions performed in pilot scale. Enzymatic conversion near to 80 % was achieved for cellulosic pulps obtained in these alkaline delignification conditions. X-ray diffraction of cellulosic pulps confirms an increase of cellulose crystallinity, proportioned by hemicellulose and lignin removal. In relation to thermoporometry analysis, an increasing of pore large in cellulose structure was observed, throughout its processing. Scanning electronic microscopy images showed more exposed cellulosic fibers after alkaline delignification. The cellulosic hydrolysate was well assimilated by the *Saccharomyces cerevisiae* Pe-2 yeast, with the possibility of performing five successive batches, with 0.45 g/g for $Y_{P/S}$ and $5.81 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$ for productivity, as resulted of fermentation assay. Lignin obtained showed very similar characteristics each other with purity (total lignin) between 95-97 %, average molecular weight between 9500 and 10200 g mol^{-1} , glass transition point between 140 and 160 °C, calorific value of 25 MJ/kg being attributed H:G:S ratio of 1:0.9:1.1 for lignin (phosphoric acid) and 1:1.4:1.7 ratio for lignin (sulfuric acid). Lignin formulas $\text{C}_9\text{H}_{8.57}\text{O}_{2.64}(\text{OCH}_3)_{1.00}$ to lignin (phosphoric acid) and $\text{C}_9\text{H}_{9.05}\text{O}_{3.19}(\text{OCH}_3)_{0.92}$ to lignin (sulfuric acid) were also proposed by the characterization results.

Keywords: Fractionation of sugarcane bagasse. Ethanol. *Saccharomyces cerevisiae* Pe-2. Cell recycle. Characterization of lignins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 Rotas Tecnológicas para a obtenção de etanol (adaptado de BIOETANOL..., 2008).....	28
Figura 2.2 Composição típica da biomassa da cana (adaptado de BIOETANOL..., 2008).....	30
Figura 2.3- A: Bagaço de cana-de-açúcar (ALCOOLBRAS, 2005); B: Palhada – Material que fica no campo após a colheita da cana. É composto por folhas verdes, pontas do vegetal, palha e restos do caule (PORTAL DO AGRONEGÓCIO, 2011; GÓMEZ et al., 2010).....	32
Figura 2.4 Estrutura recalcitrante dos materiais lignocelulósicos, os quais são constituídos de celulose, hemicelulose e lignina (ZHANG, 2008).....	34
Figura 2.5 Representação esquemática de uma xilana de gramínea mostrando alguns grupos substituintes. Xyl = D-xilopirranose; Ara = L-arabinofuranose; (4-Me)-GlcA = ácido (4-O-metil)-D-glicopirranurônico; Ac = acetil; FA = ácido ferúlico; DDFA = ácido desidroferúlico (McDOUGALL et al., 1993).....	35
Figura 2.6 Estruturas dos álcoois precursores da lignina: p-cumarílico, coniferílico e sinapílico (adaptado de YU; LOU; WU, 2008).....	36
Figura 2.7 Fluxograma do processo de obtenção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos (adaptado de HAHN-HÄGERDAL et al., 2006; NIGAM; SINGH, 2011).....	37
Figura 2.8 Fluxograma do processamento das biomassas lignocelulósicas que pode ocorrer em uma biorrefinaria (adaptado de SCHUCHARDT; RIBEIRO; GONÇALVES, 2001; ZHANG, 2008).....	40
Figura 2.9 Esquema do efeito do pré-tratamento em materiais lignocelulósicos (adaptado de MOSIER et al., 2005).....	41
Figura 2.10 Modo de ação das celulasas e um sistema enzimático cooperativo na degradação da celulose (adaptado de MUSSATTO; TEIXEIRA, 2010).....	47
Figura 4.1 Fluxograma de trabalho para o bagaço de cana-de-açúcar empregando-se os ácidos fosfórico e sulfúrico diluídos, como pré-tratamento.....	51
Figura 4.2 Foto do reator piloto em que foram realizados os pré-tratamentos com ácido diluído (H_3PO_4 e H_2SO_4) do bagaço de cana-de-açúcar (A). Vista superior do reator agitado (B).....	52
Figura 4.3 Perfil da temperatura em função do tempo de aquecimento durante o processo de pré-tratamento ácido diluído do bagaço de cana em reator piloto de 350 L.....	53
Figura 4.4 Foto do reator de bancada utilizado no processo de deslignificação do bagaço de cana pré-tratado com ácido diluído.....	55
Figura 5.1 Foto do bagaço de cana “in natura” (A), pré-tratado com H_3PO_4 1,5 % (m/v) (B) e pré-tratado com H_2SO_4 1,0 % (m/v) (C).....	70

Figura 5.2 Solubilização dos componentes do bagaço de cana-de-açúcar após as etapas de pré-tratamento com H_3PO_4 1,5 % (m/v) e H_2SO_4 1,0 % (m/v).....	72
Figura 5.3 Formação de uma estrutura metídeo-quinona pela clivagem alcalina de uma ligação α -aril éter em uma unidade fenólica de lignina (Linha pontilhada: possível ligação β -C em outra unidade) (adaptado de FENGEL; WEGENER, 1989).....	76
Figura 5.4 Diagrama de Pareto com os efeitos estimados das variáveis significativas no nível de 90 % de confiança para a remoção de lignina do bagaço de cana pré-tratado com ácido fosfórico de acordo com o planejamento fatorial completo 2^4 com 3 repetições no ponto central.....	78
Figura 5.5 Superfície de resposta para a remoção de lignina em função da relação sólido-líquido e concentração de NaOH (% m/v) empregados no processo de deslignificação do bagaço pré-tratado com ácido fosfórico. Tempo fixo em 60 min.....	80
Figura 5.6 Diagrama de Pareto com os efeitos estimados das variáveis significativas no nível de 90 % de confiança para a conversão enzimática da polpa bruta de bagaço de cana pré-tratado com ácido fosfórico de acordo com o planejamento fatorial completo 2^4 com 3 repetições no ponto central.....	82
Figura 5.7 Superfície de resposta para a conversão enzimática da celulose em função da relação sólido-líquido e concentração de NaOH (% m/v) no processo de deslignificação do bagaço pré-tratado com ácido fosfórico. Tempo fixo em 60 min.....	84
Figura 5.8 Diagrama de Pareto com os efeitos estimados das variáveis significativas no nível de 90 % de confiança para a remoção de lignina do bagaço de cana pré-tratado com ácido sulfúrico de acordo com o planejamento fatorial completo 2^4 com 3 repetições no ponto central.....	88
Figura 5.9 Superfície de resposta para a remoção de lignina em função da relação sólido-líquido e concentração de NaOH (% m/v) empregados no processo de deslignificação do bagaço pré-tratado com ácido sulfúrico. Tempo fixo em 60 min.....	90
Figura 5.10 Diagrama de Pareto com os efeitos estimados das variáveis significativas, e suas interações, no nível de 90 % de confiança para a conversão enzimática da polpa celulósica do bagaço de cana pré-tratado com ácido sulfúrico de acordo com o planejamento fatorial completo 2^4 com 3 repetições no ponto central.....	91
Figura 5.11 Superfície de resposta para a conversão enzimática da celulose em função da relação sólido-líquido e concentração de NaOH (% m/v) empregados no processo de deslignificação do bagaço pré-tratado com ácido sulfúrico. Tempo fixo em 60 min.....	94
Figura 5.12 Perfis de temperatura em função do tempo durante o processo de deslignificação alcalina, em reator piloto de 350 L (A) e de laboratório (2 L) (B), do bagaço de cana pré-tratado com ácido fosfórico diluído.....	95
Figura 5.13 Comparação da reação de deslignificação do bagaço de cana pré-tratado com ácido fosfórico (Ensaio 14) entre as escalas de laboratório e piloto em relação à solubilização dos componentes químicos.....	96
Figura 5.14 Solubilização dos componentes do bagaço de cana-de-açúcar após as etapas de pré-tratamento com H_3PO_4 1,5 % (m/v), deslignificação com NaOH 1,5 % (m/v), e o total solubilizado.....	97

Figura 5.15 Perfis de temperatura em função do tempo durante o processo de deslignificação alcalina, em reator piloto de 350 L (A) e de laboratório (2 L) (B), do bagaço de cana pré-tratado com ácido sulfúrico diluído.....	99
Figura 5.16 Comparação da reação de deslignificação do bagaço de cana pré-tratado com ácido sulfúrico (Ensaio 14) entre as escalas de laboratório e piloto em relação à solubilização dos componentes químicos.....	100
Figura 5.17 Solubilização dos componentes do bagaço de cana-de-açúcar após as etapas de pré-tratamento com H ₂ SO ₄ 1,0 % (m/v), deslignificação com NaOH 1,5 % (m/v), e o total solubilizado.....	101
Figura 5.18 Fotomicrografias do bagaço de cana-de-açúcar “in natura” (A); pré-tratado com ácido fosfórico diluído (B) e deslignificado (C); pré-tratado com ácido sulfúrico diluído (D) e deslignificado (E).....	102
Figura 5.19 Relação entre água confinada congelável e o diâmetro equivalente dos poros, obtida com calorimetria diferencial de varredura.....	104
Figura 5.20 Perfil de glicose, (X) massa celular e etanol com o tempo para fermentações em batelada com reciclo de células em hidrolisado celulósico usando <i>S.cerevisiae</i> Pe-2.....	108
Figura 5.21 Valores obtidos de rendimento e produtividade global para as cinco reações de fermentação alcoólica.....	111
Figura 5.22 Distribuição da massa molar média das ligninas obtidas por processo de deslignificação alcalina de bagaço pré-tratado por ácido fosfórico (Lignina H ₃ PO ₄) e sulfúrico (Lignina H ₂ SO ₄).....	115
Figura 5.23 Espectro quantitativo de RMN ³¹ P de lignina de bagaço de cana (pré-tratado com ácido fosfórico) derivatizada com 2-cloro-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxafosfolano (TMDP) e utilizando colesterol como padrão interno.....	117
Figura 5.24 Espectro quantitativo de RMN ³¹ P de lignina de bagaço de cana (pré-tratado com ácido sulfúrico) derivatizada com 2-cloro-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxafosfolano (TMDP) e utilizando colesterol como padrão interno.....	118
Figura 5.25 Termogramas obtidos para as ligninas de bagaço de cana provenientes dos pré-tratamento com os ácidos: fosfórico (A) e sulfúrico (B).....	119
Figura 5.26 Curvas de calorimetria diferencial de varredura para as ligninas de bagaço de cana pré-tratado pelos ácidos: fosfórico (A) e sulfúrico (B).....	120
Figura 5.27 Cromatograma representativo da lignina de bagaço de cana-de-açúcar (pré-tratado com H ₃ PO ₄) com os principais picos identificados: (1) guaiacol, (2) 4-metilguaiacol, (3) 4-etilguaiacol, (4) 4-vinilguaiacol, (5) 4-vinilfenol, (6) siringol, (7) 4-propenilguaiacol, (8) 4-metilsiringol, (9) 4-vinilsiringol, (10) 4-(1-propenil)-trans siringol, (11) siringaldeído e (12) acetosiringona.....	121
Figura 5.28 Cromatograma representativo da lignina de bagaço de cana-de-açúcar (pré-tratado com H ₂ SO ₄) com os principais picos identificados: (1) fenol, (2) guaiacol, (3) 4-metilguaiacol, (4) 4-etilguaiacol, (5) 4-vinilguaiacol, (6) 4-vinilfenol, (7) siringol, (8) 4-metilsiringol, (9) 4-vinilsiringol, (10) 4-(1-propenil)-trans siringol, (11) siringaldeído e (12)	

acetosiringona.....	123
Figura 5.29 Espectro de infravermelho para as ligninas obtidas.....	124

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 Composição química de alguns materiais lignocelulósicos (adaptado de REDDY; YANG, 2005).....	33
Tabela 2.2 Diversos tipos de métodos de pré-tratamento para materiais lignocelulósicos (adaptado de TAHERZADEH; KARIMI, 2007; SÁNCHEZ; CARDONA, 2008).....	42
Tabela 4.1 Codificação dos níveis para as variáveis avaliadas.....	55
Tabela 4.2 Matriz do planejamento fatorial 2^4 para avaliação da influência das variáveis: temperatura, tempo, concentração de NaOH e relação sólido-líquido na deslignificação do bagaço de cana pré-tratado com H_3PO_4 1,5 % (m/v) e H_2SO_4 1,0 % (m/v).....	56
Tabela 5.1 Composição química do bagaço de cana “in natura”, e após os pré-tratamentos com H_3PO_4 1,5 % (m/v) e H_2SO_4 1,0 % (m/v), juntamente com o balanço de material após as etapas de processamento desta biomassa.....	71
Tabela 5.2 Composição do bagaço de cana pré-tratado com ácido fosfórico e deslignificado.....	74
Tabela 5.3 Valores de composição química corrigidos pelos rendimentos do pré-tratamento com ácido fosfórico/deslignificação alcalina e comparados com o bagaço de cana “in natura”.....	75
Tabela 5.4 Solubilização total dos componentes do bagaço de cana após o pré-tratamento com ácido fosfórico diluído e deslignificação alcalina.....	76
Tabela 5.5 Matriz do planejamento fatorial 2^4 para a deslignificação alcalina do bagaço de cana pré-tratado com ácido fosfórico contendo as variáveis repostas: conversão enzimática da fração celulósica e porcentagem em massa de lignina removida.....	77
Tabela 5.6 Valores dos coeficientes do modelo e de p-valor para as variáveis independentes e suas interações, considerando uma significância de 90 %, para a variável resposta remoção de lignina do bagaço de cana.....	79
Tabela 5.7 Análise dos efeitos principais no planejamento fatorial 2^4 , utilizando o erro puro para a remoção de lignina do bagaço de cana.....	79
Tabela 5.8 Valores dos coeficientes do modelo e de p-valor para as variáveis independentes e suas interações, considerando uma significância de 90 %, para a variável resposta conversão enzimática da fração celulósica de bagaço de cana.....	82
Tabela 5.9 Análise dos efeitos principais no planejamento fatorial 2^4 , utilizando o erro puro para a conversão enzimática da fração celulósica de bagaço de cana.....	83
Tabela 5.10 Composição química do bagaço de cana deslignificado após pré-tratamento com ácido sulfúrico.....	85
Tabela 5.11 Valores de composição química corrigidos pelos rendimentos da deslignificação alcalina e comparados com o bagaço de cana “in natura”.....	86

Tabela 5.12 Solubilização total dos componentes do bagaço de cana após o pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído e deslignificação alcalina.....	86
Tabela 5.13 Matriz do planejamento fatorial 2^4 para a deslignificação alcalina do bagaço de cana pré-tratado com ácido sulfúrico contendo as variáveis repostas: porcentagem em massa de lignina removida e conversão enzimática da fração celulósica.....	87
Tabela 5.14 Valores dos coeficientes do modelo e de p-valor para as variáveis independentes e suas interações, considerando uma significância de 90 %, para a variável resposta remoção de lignina do bagaço de cana.....	88
Tabela 5.15 Análise dos efeitos principais no planejamento fatorial 2^4 , utilizando o erro puro para a remoção de lignina do bagaço de cana.....	89
Tabela 5.16 Valores dos coeficientes do modelo e de p-valor para as variáveis independentes e suas interações, considerando uma significância de 90 %, para a variável resposta conversão enzimática da fração celulósica de bagaço de cana.....	92
Tabela 5.17 Análise dos efeitos principais no planejamento fatorial 2^4 , utilizando o erro puro para a conversão enzimática da fração celulósica de bagaço de cana.....	93
Tabela 5.18 Composição química do bagaço de cana, juntamente com o balanço de material após o pré-tratamento com ácido fosfórico diluído e deslignificação alcalina, ambos em escala piloto.....	96
Tabela 5.19 Composição química do bagaço de cana, juntamente com o balanço de material após o pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído e deslignificação alcalina, ambos em escala piloto.....	100
Tabela 5.20 Parâmetros de difração de raios X para a celulose de bagaço de cana “in natura” e após as etapas de pré-tratamento e deslignificação.....	105
Tabela 5.21 Comparativo da hidrólise enzimática do bagaço de cana “in natura” com a hidrólise enzimática dos bagaços pré-tratado e deslignificado.....	107
Tabela 5.22 Parâmetros avaliados durante a fermentação alcoólica do hidrolisado celulósico concentrado.....	110
Tabela 5.23 Composição química das ligninas obtidas de bagaço pré-tratado e deslignificado.....	113
Tabela 5.24 Resultados de análise elementar para as ligninas obtidas.....	114
Tabela 5.25 Massa molar das ligninas obtido por cromatografia de permeação em gel.....	116
Tabela 5.26 Valores calculados para os grupos funcionais (mmol/g de lignina).....	117
Tabela 5.27 Valores calculados para os grupos funcionais (mmol/g de lignina).....	118
Tabela 5.28 Poder calorífico superior das ligninas de bagaço de cana-de-açúcar.....	120
Tabela 5.29 Distribuição dos compostos presentes na lignina de bagaço de cana-de-açúcar (proveniente do pré-tatamento com H_3PO_4).....	122

Tabela 5.30 Distribuição dos compostos presentes na lignina de bagaço de cana-de-açúcar (proveniente do pré-tatamento com H₂SO₄)..... 123

Tabela 5.31 Valores e atribuições dos picos característicos em ligninas..... 125

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	25
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
2.1 Biocombustíveis.....	27
2.1.1 Etanol.....	27
2.2 Cana-de-açúcar.....	29
2.2.1 Produção da cana-de-açúcar.....	31
2.2.2 Bagaço e palha de cana-de-açúcar.....	31
2.3 Características Estruturais dos Materiais Lignocelulósicos.....	33
2.3.1 Celulose.....	34
2.3.2 Hemicelulose.....	34
2.3.3 Lignina.....	36
2.3.4 Outros Compostos.....	36
2.4 O Etanol de 2ª geração – <i>Biorrefinaria</i>	37
2.5 Pré-tratamento dos Materiais Lignocelulósicos.....	41
2.5.1 Pré-tratamento ácido diluído.....	43
2.6 Remoção da Lignina.....	45
2.7 Hidrólise Enzimática de Materiais Lignocelulósicos.....	46
2.8 Fermentação de hidrolisados celulósicos.....	48
3 OBJETIVOS.....	49
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	50
4.1 Material lignocelulósico estudado.....	50
4.2 Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar.....	52
4.3 Deslignificação alcalina.....	54
4.3.1 Estudo da influência das variáveis: temperatura, tempo, concentração de NaOH e relação sólido-líquido na deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com H ₃ PO ₄ 1,5% (m/v) e H ₂ SO ₄ 1,0% (m/v).....	54
4.4 Hidrólise Enzimática.....	57

4.5 Caracterização Química dos Materiais Lignocelulósicos.....	58
4.5.1 Determinação de carboidratos e ácidos orgânicos por CLAE.....	59
4.5.2 Determinação de lignina insolúvel em meio ácido.....	59
4.5.3 Determinação do teor de cinzas da lignina.....	59
4.5.4 Determinação do teor de cinzas totais.....	60
4.5.5 Determinação de lignina solúvel.....	60
4.5.6 Determinação de furfural e hidroximetilfurfural.....	61
4.6 Análise dos materiais lignocelulósicos por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	61
4.7 Análise do bagaço de cana por difratometria de raios X (DRX).....	62
4.8 Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar por termoporometria com calorimetria diferencial de varredura (DSC).....	62
4.9 Fermentabilidade do hidrolisado celulósico de bagaço de cana-de-açúcar.....	63
4.10 Estudo das ligninas obtidas dos processos de deslignificação alcalina do bagaço de cana-de-açúcar.....	65
4.10.1 Análise físico-química das ligninas.....	65
4.10.2 Análise elementar.....	65
4.10.3 Cromatografia de permeação em gel (GPC).....	66
4.10.4 Análise de ressonância magnética nuclear (RMN) de ³¹ P.....	66
4.10.5 Análise termogravimétrica (TGA).....	67
4.10.6 Determinação do poder calorífico superior (PCS).....	68
4.10.7 Pirólise acoplada à cromatografia gasosa e espectrometria de massas (Pyr-GC/MS)...	68
4.10.8 Espectroscopia na região do infravermelho.....	68
4.10.9 Determinação de grupos metoxila.....	69
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	70
5.1 Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar em reator piloto.....	70
5.2 Deslignificação alcalina do bagaço de cana-de-açúcar em reator de bancada.....	73
5.2.1 Deslignificação do bagaço de cana pré-tratado com ácido fosfórico.....	73
5.2.1.1 Estudo da influência das variáveis: temperatura, tempo, concentração de NaOH e	

relação sólido-líquido, na deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido fosfórico e na conversão enzimática da polpa celulósica obtida.....	77
5.2.2 Deslignificação do bagaço de cana pré-tratado com ácido sulfúrico.....	84
5.2.2.1 Estudo da influência das variáveis: temperatura, tempo, concentração de NaOH e relação sólido-líquido, na deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido sulfúrico e na conversão enzimática da polpa celulósica obtida.....	87
5.3 Deslignificação alcalina do bagaço de cana-de-açúcar em reator piloto.....	94
5.3.1 Reação de deslignificação do bagaço pré-tratado com ácido fosfórico.....	94
5.3.2 Reação de deslignificação do bagaço pré-tratado com ácido sulfúrico.....	98
5.4 Análise morfológica do bagaço de cana-de-açúcar por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	102
5.5 Análise do bagaço de cana-de-açúcar por termoporometria com calorimetria diferencial de varredura (DSC).....	103
5.6 Análise da celulose de bagaço de cana-de-açúcar por difração de raios X.....	105
5.7 Hidrólise enzimática da polpa celulósica de bagaço de cana-de-açúcar obtida em escala piloto.....	106
5.8 Avaliação da fermentabilidade do hidrolisado celulósico de bagaço de cana-de-açúcar...	108
5.9 Caracterização química das ligninas obtidas no processo de deslignificação em escala piloto dos bagaços pré-tratados com os ácidos fosfórico e sulfúrico.....	113
5.9.1 Análise físico química.....	113
5.9.2 Análise elementar.....	114
5.9.3 Cromatografia de permeação em gel (GPC).....	115
5.9.4 Análise de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ³¹ P.....	116
5.9.5 Análise termogravimétrica (TGA).....	118
5.9.6 Determinação do poder calorífico superior (PCS).....	120
5.9.7 Pirólise acoplada à cromatografia gasosa e espectrometria de massas (Pyr-GC/MS)....	121
5.9.8 Espectroscopia na região do infravermelho (IV).....	123
6 CONCLUSÕES.....	126
REFERÊNCIAS.....	127
APÊNDICE.....	139

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento econômico e social tende sempre a criar demanda por mais energia. Sendo assim, um dos grandes desafios para a humanidade neste século é disponibilizar uma fonte de energia para o transporte e os processos industriais, de maneira sustentável, a partir de uma matéria-prima renovável (FAPESP, 2007; SARKAR et al., 2012). O petróleo e seus derivados, junto com o gás natural, representam 55% do consumo mundial de energia e, como combustíveis fósseis, as suas reservas são finitas e o seu uso é a principal fonte dos gases que estão provocando mudanças climáticas e o aquecimento global (BIOETANOL..., 2008; NIGAM; SINGH, 2011).

As emissões globais de dióxido de carbono (CO_2) derivadas da queima dos combustíveis fósseis atingiram em 2012 o recorde de 34,5 bilhões de toneladas, o que tem causado a aceleração dos processos ligados a mudanças climáticas (WMO, 2013).

Diante deste cenário, o biodiesel e, principalmente o etanol, passaram a constar de forma definitiva da agenda dos governos e das políticas de vários países. Em se tratando do etanol, sua utilização não está apenas restrita ao combustível, mas incorpora o etanol grau químico, fonte de matérias-primas para a fabricação de produtos químicos, o que leva à redescoberta da alcoolquímica (BASTOS, 2007; BONOMI; FELIPE, 2010).

O estabelecimento de metas extremamente ambiciosas para aumento do consumo do etanol nos próximos anos, principalmente nos países desenvolvidos, requer um aumento substancial da produção de etanol e, nesse sentido, estimula a pesquisa e o desenvolvimento de novas matérias-primas para o etanol, como a biomassa lignocelulósica, e a construção de biorrefinarias integradas, um conceito análogo ao das refinarias de petróleo (BASTOS, 2007; DARKU; RICHARD, 2011).

No Brasil, a agroindústria da cana-de-açúcar se transforma em uma agroindústria de energia, onde o melhor aproveitamento dos resíduos da cana pode ampliar significativamente a produção de energia elétrica, e o desenvolvimento de novos processos para a obtenção de etanol, a partir do bagaço e a palha, pode elevar a produção de energia em 40%, usando a mesma quantidade de cana (FELIPE, 2010).

Dessa forma, o bagaço de cana, importante fonte lignocelulósica do setor sucroalcooleiro, vem sendo amplamente estudado em relação ao seu uso potencial como fonte de açúcares fermentáveis para a produção de etanol devido a sua grande disponibilidade nas usinas e, também, devido à presença de quantidades apreciáveis de celulose e hemicelulose em sua constituição química, as quais podem ser despolimerizadas

em açúcares monoméricos simples (glicose, xilose, arabinose, manose, galactose, etc.). Estes açúcares podem ser convertidos tanto a etanol quanto a produtos de alto valor agregado (CHANDEL et al., 2012b).

Um dos grandes desafios para a obtenção do etanol a partir de materiais lignocelulósicos é o fracionamento dos componentes químicos (celulose, hemicelulose e lignina) que compõem a estrutura da biomassa vegetal para que os polissacarídeos, os quais serão utilizados no processo fermentativo, não sejam degradados durante este fracionamento.

Muitas pesquisas estão sendo realizadas para melhorar a digestibilidade química e enzimática da biomassa lignocelulósica para a eficiente conversão da hemicelulose e celulose em etanol (MONOT et al., 2013). Dentre estas, destacam-se o desenvolvimento de pré-tratamentos em escala piloto (ROCHA et al., 2012b), a produção de enzimas mais eficientes na hidrólise dos polissacarídeos (CANNELLA; JORGENSEN, 2014) e a busca por microrganismos capazes de fermentar pentoses e hexoses com maior eficiência (KIM et al., 2013). Entretanto, ainda não estão claras quais características da biomassa são importantes para um pré-tratamento eficiente de forma a contribuir para a despolimerização da celulose (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

O presente trabalho propôs estudar os processos de pré-tratamento ácido diluído e de deslignificação alcalina do bagaço de cana-de-açúcar, em escala piloto, e posteriormente avaliar as eficiências destes processos pela conversão da celulose em glicose por meio da sacarificação enzimática, visando à fermentação com reciclo de células de *Saccharomyces cerevisiae* para produção de etanol celulósico. Paralelo a este estudo, foi realizada a caracterização da lignina obtida pelo processo de deslignificação alcalina com o objetivo de contribuir para a elucidação da estrutura desta macromolécula, sendo esta de tão grande importância para a obtenção de químicos de alto valor agregado.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biocombustíveis

A atual economia mundial é altamente dependente de várias fontes energéticas fósseis, tais como petróleo, carvão, gás natural, entre outros. Dessa forma, as preocupações referentes ao aumento desta demanda energética, especialmente quanto à demanda de combustíveis para o setor de transportes, o acúmulo de CO₂ atmosférico devido à queima dos combustíveis fósseis, a segurança energética nacional aliada ao fim dos combustíveis fósseis e o desenvolvimento da economia rural são os principais motivos para a busca de fontes energéticas sustentáveis e materiais renováveis (ZHANG, 2008; NIGAM; SINGH, 2011; SARKAR et al., 2012).

Dentre as fontes energéticas renováveis destacam-se os biocombustíveis, sendo este termo designado aos combustíveis líquidos ou gasosos do setor de transporte, predominantemente produzidos da biomassa vegetal. Combustíveis líquidos, como o etanol e o biodiesel, e gasosos, como o hidrogênio e o metano, estão entre os principais combustíveis produzidos a partir destes recursos naturais (BIOETANOL..., 2008).

Há várias razões para a obtenção dos biocombustíveis ser considerada como tecnologia relevante para o desenvolvimento e industrialização dos países. Eles implicam em razões de segurança energética, preocupações ambientais e a questão socioeconômica relacionada ao setor rural (DEMIRBAS, 2007). Os biocombustíveis apresentam as seguintes vantagens: (a) podem ser obtidos a partir de fontes biomássicas abundantes e baratas, (b) seu uso permite reduzir a emissão de carbono para a atmosfera e, além disso, a produção de biomassa é potencialmente favorecida, dentro de limites e para algumas espécies, pela crescente disponibilidade de dióxido de carbono na atmosfera (BIOETANOL..., 2008) e (c) eles são biodegradáveis e contribuem para a sustentabilidade (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006; DEMIRBAS, 2009; NIGAM; SINGH, 2011).

2.1.1 Etanol

O etanol, ou álcool etílico, é uma substância incolor, volátil, inflamável, totalmente solúvel em água, apresenta fórmula molecular C₂H₆O (BIOETANOL..., 2008; POLOBIO, 2009) podendo ser obtida por via química e por via fermentativa. Por via química, obtém-se o etanol a partir de hidrocarbonetos não saturados, como o eteno e o etino, e de gases de petróleo e da hulha. Porém, a via fermentativa é a maneira mais importante e econômica

para a obtenção do álcool etílico no Brasil devido, principalmente, ao grande número de matérias-primas naturais existentes em todo o País (LIMA et al., 2001).

Qualquer substrato que contenha açúcar ou outro carboidrato constitui-se em matéria-prima para a obtenção do etanol (Figura 2.1). Entretanto para que seja viável economicamente é preciso considerar seu volume de produção, o rendimento industrial e o custo de fabricação. As matérias-primas podem ser classificadas em matérias açucaradas, agrupando cana-de-açúcar, beterraba açucareira, sorgo sacarino, milho sacarino, melaços, mel de abelhas e frutas; em matérias amiláceas e feculentas, agrupando grãos amiláceos, raízes e tubérculos feculentos; e em matérias celulósicas, incluindo palhas, madeiras, resíduos agrícolas e resíduos sulfíticos de fábricas de papel (LIMA et al., 2001; WALKER, 2010).

Figura 2.1 – Rotas tecnológicas para a produção de etanol.

Fonte: adaptado de BIOETANOL..., 2008.

As ações governamentais dirigidas ao etanol orientam-se inicialmente por preocupações na área de energia e combustíveis. Nesse sentido reproduzem as ações do governo brasileiro na década de 1970, quando a crise do petróleo levou à incorporação do etanol (ou álcool) em nossa matriz energética, tornando-o uma alternativa efetiva à

gasolina. Mesmo com a interrupção da trajetória virtuosa do etanol (Proálcool) no início da década de 1990 em resposta à queda nos preços relativos do petróleo e aos problemas de natureza fiscal do governo, que eliminaram os subsídios e levaram a uma perda de espaço relativo para a gasolina, um novo ímpeto foi garantido ao etanol combustível graças aos novos veículos bicomcombustíveis (*flex fuel*) (BASTOS, 2007; CHANDEL et al., 2014).

No mundo, o recente retorno aos aumentos no preço do petróleo (alcançando aproximadamente US\$ 110,0 o barril) (FUTUROS..., 2014), as perspectivas de esgotamento das reservas, os riscos geopolíticos decorrentes da dependência do petróleo de países politicamente instáveis e os compromissos mais sólidos com a questão ambiental desde a assinatura do Protocolo de Kyoto, o qual definiu mecanismos e metas para os países reduzirem as emissões de gases causadores do efeito estufa em 5,2%, entre 2008 e 2012, frente aos níveis de 1990, fizeram renascer a atenção para as fontes alternativas de energia (BASTOS, 2007; CHATURVEDI; VERMA, 2013).

Nesse novo cenário, as atenções voltadas para o etanol não estão mais restritas ao etanol combustível, mas incorpora o etanol como matéria-prima para obtenção de diversos produtos químicos (alcoolquímica), tais como o eteno (derivado do petróleo), o qual é matéria-prima para resinas, além de produtos hoje importados derivados do etanol, como os acetatos e o éter etílico. Atualmente, com o crescimento do pensamento sustentável, a alcoolquímica vem recebendo destaque no setor industrial, fazendo com que o etanol substitua gradativamente o petróleo como fonte de matérias-primas (BASTOS, 2007; RODRIGUES, 2011).

Nesse sentido, ações como as da Empresa Braskem na produção de eteno a partir do etanol de cana-de-açúcar (ODEBRECHT Informa, 2011), da Dow Química, Oxiten e do grupo belga Solvay preveem que a indústria alcoolquímica demande aproximadamente 650 milhões de litros de etanol nos próximos anos (ETANOL..., 2010).

2.2 Cana-de-açúcar

Acredita-se que a cana-de-açúcar se estabeleceu há cerca de 6.000 anos a.C. na Melanésia, Indonésia e Nova Guiné, espalhando-se para o Pacífico Sul, Índia, China e vizinhanças, entre 1.500 a.C. e 1.000 a.C. Posteriormente, disseminou-se para outras regiões do mundo, em especial regiões tropicais e subtropicais (OLIVEIRA, 2007).

Como um dos principais produtos agrícolas do Brasil, cultivada desde a época da colonização, a cana-de-açúcar é um gerador de energia e a grande vantagem disso é que ela é renovável (ETANOL..., 2010). É uma planta semiperene com ciclo fotossintético do tipo C4, pertencente ao gênero *Saccharum*, da família das gramíneas, composta de espécies de gramas altas perenes, oriundas de regiões temperadas quentes a tropicais da Ásia, especialmente da Índia (BIOETANOL...,2008).

Essas características fazem com que a cana-de-açúcar tenha elevada taxa fotossintética de saturação (absorve mais energia solar), alta eficiência na utilização da água, sendo bastante apta à produção bioenergética. A parte aérea da planta é composta pelos colmos, nos quais se concentra a sacarose, e pelas pontas e folhas, que constituem a palha da cana, como mostrado na Figura 2.2. Todos esses componentes somados totalizam cerca de 35 toneladas de matéria seca por hectare.

O clima ideal para o cultivo da cana é aquele que apresenta duas estações distintas: uma quente e úmida, para proporcionar a germinação, o perfilhamento (formação de brotos) e o desenvolvimento vegetativo, seguida de outra fria e seca, para promover a maturação e o acúmulo de sacarose nos colmos (BIOETANOL...,2008).

Figura 2.2 – Composição típica da biomassa da cana.

Fonte: adaptado de BIOETANOL..., 2008.

Estudos mostram que, no ciclo completo da cana, desde o seu cultivo até a produção e o consumo do etanol, a emissão de CO₂ é cerca de 89% menor que a da gasolina (INTERNATIONAL ENERGY AGENCY, 2010).

2.2.1 Produção da cana-de-açúcar

A indústria de cana-de-açúcar é de longa data um dos esteios da economia brasileira. A partir da introdução das primeiras mudas no país, em 1532, por mais de dois séculos o açúcar foi o principal produto brasileiro. Há cerca de 40 anos, teve início a transformação do setor. Além do açúcar, as usinas passaram a ter foco na produção de etanol e, mais recentemente, a atenção voltou-se à bioeletricidade, aos alcoolquímicos e à comercialização de créditos de carbono (ETANOL..., 2010).

O Brasil encontra-se em uma situação bastante favorável quanto à produção de cana-de-açúcar e consequentemente quanto à produção de etanol. Atualmente o país é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e o segundo maior produtor de etanol. O volume de cana processado na safra 2012/2013 foi de 588,92 milhões de toneladas, resultando em uma produção de 38,34 milhões de toneladas de açúcar e 23,64 bilhões de litros de etanol (CONAB, 2013).

2.2.2 Bagaço e palha de cana-de-açúcar

Como consequência do aumento da produção de etanol nos últimos anos, tem-se o aumento dos subprodutos agroindustriais deste processo, tais como a palha e o bagaço da cana-de-açúcar.

O potencial de geração de subprodutos da cana-de-açúcar (matéria-seca) representa em média 14% da massa da cana (SEABRA, 2008). Desta forma, para cada tonelada de cana (colmos) produzida têm-se 140 kg de bagaço (base seca) e 140 kg de palha (novo resíduo devido à proibição da queima da palha de cana), e segundo dados da safra 2012/2013 o processamento da cana está gerando aproximadamente 165 milhões de toneladas de materiais vegetais (palha e bagaço de cana) (CONAB, 2013).

A principal utilidade do bagaço de cana (figura 2.3 A) é gerar energia elétrica para a própria usina por meio de queima em caldeiras, pois além de estar presente em grande volume na usina, não apresenta um custo adicional com transporte, por exemplo (OLIVEIRA, 2007). Quantidades de bagaço remanescentes podem ser utilizadas em inúmeros processos industriais pela separação da fibra, que serve para a fabricação de papéis/móveis, e da medula que pode ser utilizada na alimentação animal e na produção de furfural (BERTONCINI, 2008). Destaca-se também a utilização do bagaço de cana em processos de compostagem, como insumo energético a outras áreas do setor industrial

como papel e celulose, de cerâmicas e retíficas de pneus (DANTAS FILHO, 2009) e mais recentemente como matéria-prima para a obtenção de biogás pelo processo de biodigestão anaeróbia (BRITO, 2011).

A palha, ou palhada, (figura 2.3 B) deixada na superfície do solo tem importância na melhoria da sua fertilidade, por meio do retorno dos nutrientes via processo de mineralização, controle de processos erosivos e maior retenção de água, além de propiciar aumento na microbiota do solo (BERTONCINI, 2008; PERES; SOUZA; LAVORENTI, 2010).

Porém, devido à grande quantidade de material gerado, juntamente com o bagaço de cana, têm-se um desperdício de uma importante fonte lignocelulósica para a geração de energia elétrica, biocombustíveis e fabricação de produtos como bioplásticos, carvão para siderúrgicas e até cimento. Outro problema é a fuligem liberada ao meio ambiente durante a queima da palha da cana-de-açúcar no campo, na época da colheita e se deposita no chão na forma de finos flocos escuros carregando em sua composição cerca de 70 produtos químicos, prejudiciais ao ambiente pela liberação de gases que contribuem para o efeito estufa e causam sérios problemas respiratórios para a população exposta.

Figura 2.3 – **A:** Bagaço de cana-de-açúcar; **B:** Palhada – Material que fica no campo após a colheita da cana. É composto por folhas verdes, pontas do vegetal, palha e restos do caule.

Fonte: ALCOOLBRAS, 2005; GÓMEZ et al., 2010; PORTAL DO AGRONEGÓCIO, 2011.

Frente a esse problema, o governo do estado de São Paulo regulamentou a Lei nº 11.241/02 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 (BRASIL, 2003). Por outro lado, a União da Indústria de Cana-de-açúcar (UNICA), a Organização de Plantadores de

Cana da Região Centro-Sul do Brasil (ORPLANA) e o governo do Estado de São Paulo, assinaram, em 2007, o Protocolo Agroambiental do Setor Sucroalcooleiro. Esse Protocolo, estabeleceu uma série de diretrizes, dentre as quais se destaca a antecipação dos prazos legais para o fim da colheita da cana-de-açúcar com o uso prévio do fogo nas áreas cultivadas pelas usinas (UNICA, 2007).

Assim, o setor paulista se comprometeu a antecipar, em até 14 anos, os referidos prazos: toda a área mecanizável terá 100% da queima eliminada até 2014 e áreas não mecanizáveis terão 100% da queima eliminada até 2017 (UNICA, 2007).

2.3 Características Estruturais dos Materiais Lignocelulósicos

A dificuldade de se converter os materiais lignocelulósicos em insumos químicos é atribuída às suas características químicas e morfológicas. Esses materiais são constituídos de fibras de celulose envolvidas em uma matriz amorfa de polioses e lignina. Essa matriz amorfa age como uma barreira natural ao ataque de microrganismos e/ou enzimas e torna esses materiais estruturalmente rígidos e pouco reativos (FENGEL; WEGENER, 1989). As biomassas lignocelulósicas incluem vários resíduos agrícolas (palhas, cascas, caules, pedúnculos), madeiras de coníferas e folhosas, resíduos de indústrias de polpa e papel, e colheitas herbáceas. A tabela 2.1, a seguir, mostra a composição de alguns materiais lignocelulósicos. Pode-se observar que a composição destes materiais é muito variável; o principal componente mais abundante é a celulose, seguido de hemicelulose e lignina. Inorgânicos, fenólicos, ácidos graxos e outros constituintes, denominados extrativos, compõem a fração remanescente destas biomassas vegetais (SLUITER et al., 2010).

Tabela 2.1 - Composição química de alguns materiais lignocelulósicos (adaptado de REDDY; YANG, 2005)

Materiais Lignocelulósicos	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Cinzas (%)
Forragem de milho	38 - 40	28	7 - 21	3,6 - 7
Fibra de coco	36 - 43	0,15 - 0,25	41 - 45	2,7 - 10,2
Fibra de Bagaço	32 - 48	19 - 24	23 - 32	1,5 - 5
Fibra de Bananeira	60 - 65	6 - 8	5 - 10	4,7
Palha de trigo	33 - 38	26 - 32	17 - 19	6 - 8
Palha de arroz	28 - 36	23 - 28	12 - 14	14 - 20
Palha de cevada	31 - 45	27 - 38	14 - 19	2 - 7

2.3.1 Celulose

A celulose é um polímero linear de anidroglicopirranose associada por ligações $\beta(1\rightarrow4)$ glicosídicas (ZHANG, 2008), sendo a celobiose a unidade repetitiva do polímero. 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 (Figura 2.4), que são insolúveis em água e apresentam regiões cristalinas e amorfas (FENGEL; WEGENER, 1989).

Figura 2.4 – Estrutura recalcitrante dos materiais lignocelulósicos, os quais são constituídos de celulose, hemicelulose e lignina.

Fonte: ZHANG, 2008.

As ligações de hidrogênio inter e intramoleculares são responsáveis pela manutenção das regiões cristalinas e tornam a celulose altamente resistente à hidrólise ácida, alcalina ou enzimática (WOOD; SADDLER, 1988; CONVERSE; WARE, 1994).

2.3.2 Hemicelulose

As hemiceluloses, também chamadas de polioses, diferem substancialmente da celulose por serem amorfas, com estruturas ramificadas e compostas pela combinação de vários açúcares (pentoses, hexoses, ácidos hexurônicos e desoxiexoses). As polioses são

classificadas de acordo com os açúcares presentes na cadeia principal do polímero: xilanas, glucomananas e galactanas (FENGEL; WEGENER, 1989).

A cadeia principal pode ser um homopolímero, como no caso das xilanas, ou um heteropolímero, como no caso das glucomananas e podem apresentar arabinose, galactose, ácido 4-O-metilglucurônico e grupos acetil ligados à cadeia principal. As madeiras moles apresentam maior proporção de galactoglucomananas do que xilanas, enquanto as madeiras duras são mais ricas em xilanas (FENGEL; WEGENER, 1989). A composição de xilanas de gramíneas foi estudada por vários autores, entre eles por McDOUGALL et al., 1993. Uma representação esquemática de uma xilana típica de gramíneas se encontra na figura 2.5.

Figura 2.5 – Representação esquemática de uma xilana de gramínea mostrando alguns grupos substituintes. Xyl = D-xilopirranose; Ara = L-arabinofuranose; (4-Me)-GlcA = ácido (4-O-metil)-D-glicopirranurônico; Ac = acetil; FA = ácido ferúlico; DDFA = ácido desidroferúlico.

Fonte: McDOUGALL et al., 1993.

As hemiceluloses apresentam como características estruturais importantes, a perda da cristalinidade, principalmente devido à alta estrutura ramificada, e a presença de grupos acetila conectados à cadeia polimérica (HARMSEN et al., 2010).

Devido à combinação de diversos açúcares e por apresentar grande parte de uma estrutura molecular amorfa, a hemicelulose é mais solúvel em água e mais fácil de ser degradada do que a celulose; nos materiais lignocelulósicos, está intimamente ligada à celulose e à lignina, funcionando como uma fase adesiva na estrutura do material.

2.3.3 Lignina

Depois da celulose, a lignina é a macromolécula orgânica mais importante e abundante dentre os materiais lignocelulósicos, sendo responsável pelo aumento da resistência mecânica das plantas (FENGEL; WEGENER, 1989).

A lignina é uma macromolécula amorfa, altamente complexa e ramificada tridimensionalmente, gerada a partir da polimerização desidrogenativa dos álcoois hidroxicinâmicos: p-cumarílico (I), coniferílico (II) e sinapílico (III) (figura 2.6). A lignina é constituída principalmente de unidades de fenilproprano associadas por ligações estáveis do tipo C-C, aril-éter e aril-aril (FENGEL; WEGENER, 1989).

Figura 2.6 – Estruturas dos álcoois precursores da lignina: p-cumarílico, coniferílico e sinapílico.

Fonte: adaptado de YU; LOU; WU, 2008.

Além da função estrutural, a lignina tem um importante papel no transporte de água, nutrientes e metabólitos, sendo responsável pela proteção dos tecidos contra o ataque de microrganismos (LIGNOWORKS, 2012).

2.3.4 Outros Compostos

Os materiais lignocelulósicos podem conter também uma extensa variedade de extrativos orgânicos, os quais podem ser extraídos por solventes polares ou apolares. São exemplos de extrativos: ácidos graxos, ceras, alcalóides, proteínas, fenólicos, açúcares simples, pectinas, mucilagens, gomas, resinas, terpenos, amido, glicosídeos, saponinas e óleos essenciais (FENGEL; WEGENER, 1989).

Os extrativos são compostos intermediários do metabolismo do vegetal; proporcionam reserva energética e proteção ao vegetal contra o ataque de microrganismos

e insetos, porém têm um efeito inibitório nos processos de conversão de biomassa (FENGEL; WEGENER, 1989). A biomassa vegetal também contém uma pequena quantidade de espécies inorgânicas, tais como, potássio, sódio, cálcio, etc., como resultado dos nutrientes adquiridos durante o seu crescimento (YU; LOU; WU, 2008).

2.4 O Etanol de 2ª geração – Biorrefinaria

A substituição dos combustíveis fósseis por uma fonte energética renovável faz com que a produção futura em larga escala do etanol e de diversos insumos químicos seja baseada principalmente em materiais lignocelulósicos.

Há três etapas principais no processo de conversão dos materiais lignocelulósicos em etanol (figura 2.7): primeira, pré-tratamento, de forma a romper a ultraestrutura da biomassa vegetal, solubilizar a fração hemicelulósica e disponibilizar a fração celulósica para posterior hidrólise; segunda, sacarificação enzimática da biomassa pré-tratada para disponibilizar os açúcares fermentáveis; terceira, fermentação dos açúcares liberados realizada por microrganismos especializados - esta etapa pode ser realizada em uma etapa combinada chamada de Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SSF – Sigla em Inglês). A recuperação do etanol (processo de destilação) é realizada de forma semelhante ao processo de obtenção do etanol de 1ª geração.

A deslignificação, realizada após o pré-tratamento para remoção da fração hemicelulósica, pode ser incluída na primeira etapa, porém trata-se de um processo opcional dentro da cadeia de produção do etanol celulósico.

Figura 2.7 – Fluxograma do processo de obtenção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos.

Fonte: adaptado de HAHN-HÄGERDAL et al., 2006; NIGAM; SINGH, 2011.

Mesmo com tantas vantagens para a utilização de materiais lignocelulósicos visando à obtenção de etanol, ainda há gargalos no processo de forma a que este se apresente competitivo ao etanol produzido a partir do caldo de cana (1ª geração).

Podem-se destacar alguns desafios a serem vencidos como no caso do pré-tratamento ácido diluído, utilizado para a remoção da hemicelulose, o qual necessita de um controle da quantidade e/ou concentração de ácido utilizado para evitar a intensa degradação da celulose e a formação de produtos indesejáveis que atuam como inibidores no processo fermentativo, além da necessidade de se trabalhar com equipamentos desenvolvidos com materiais resistentes à corrosão (KELLER, 1996; BASTOS, 2007). Por outro lado, enquanto a hidrólise enzimática da fração celulósica tem sido considerada uma tecnologia promissora, pelo fato das enzimas apresentarem elevada especificidade de ação em seu substrato evitando assim a formação de produtos inibidores para o processo fermentativo (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006; ARANTES; SADDLER, 2010), o custo de produção das enzimas ainda é elevado, o que dificulta a viabilidade econômica do processo (HIMMEL; RUTH; WYMAN, 1999; WOOLEY et al., 1999; TAYLOR, 2008; ARANTES; SADDLER, 2011).

Muitos pesquisadores estão concentrando esforços no desenvolvimento de pré-tratamentos que sejam eficientes, capazes de disponibilizar a maior quantidade de açúcar possível (pentoses e hexoses) (ROCHA et al., 2012b), no desenvolvimento de microrganismos geneticamente modificados que possam fermentar tanto pentoses quanto hexoses (KIM et al., 2013), na produção de plantas geneticamente modificadas com maior quantidade carboidratos ou plantas modificadas estruturalmente para facilitar a etapa de pré-tratamento em condições amenas (LOUREIRO et al., 2011, MASARIN et al., 2011), e na utilização de processos integrados para reduzir o número de etapas do processo e consequentemente, reduzir a demanda energética (ERDEI et al., 2013).

Atualmente o Brasil vem recebendo destaque no setor de biocombustíveis de 2ª geração, pois será sede de investimentos importantes nesta área, com destaque para a Empresa Granbio, a qual pretende produzir etanol a partir de palha e bagaço de cana, em escala industrial, já no ano de 2014. Outra iniciativa é da Empresa Raízen, que está construindo sua primeira planta industrial para a produção de etanol de 2ª geração, com início da sua operação previsto para o ano-safra 2014/2015. O projeto da Raízen é considerado como o primeiro projeto no mundo que utilizará tecnologias para conversão da palha e do bagaço de cana em escala industrial totalmente integradas ao processo de etanol

convencional, obtido a partir do caldo da cana-de-açúcar (etanol de 1ª geração) (BNDES, 2013).

Em outra frente, o Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) já está em fase adiantada em suas pesquisas com etanol de 2ª geração e vem planejando uma planta de demonstração com possibilidade de operação em 2014 (UDOP, 2013).

A curto prazo os materiais lignocelulósicos serão utilizados para a produção de combustível, calor e eletricidade; entretanto, a longo prazo, a tecnologia do bioetanol servirá de base para a produção sustentável de produtos, tais como diversos químicos e materiais, em futuras biorrefinarias, como representado na figura 2.8 (WYMAN, 2003; KAMM; KAMM, 2004; REDDY; YANG, 2005; ZHANG et al. 2007).

O conceito de biorrefinaria engloba a extensa faixa de tecnologias disponíveis para fracionar biomassas lignocelulósicas em seus blocos constituintes (carboidratos, proteínas, extrativos, entre outros) os quais podem ser convertidos em produtos de alto valor agregado, biocombustíveis e químicos (CHERUBINI; STROMMAN, 2011).

Figura 2.8 – Fluxograma do processamento das biomassas lignocelulósicas que pode ocorrer em uma biorrefinaria.

Fonte: adaptado de SCHUCHARDT; RIBEIRO; GONÇALVES, 2001; ZHANG, 2008.

2.5 Pré-tratamento dos Materiais Lignocelulósicos

A eficiente redução da estrutura recalcitrante dos materiais lignocelulósicos e a liberação dos polissacarídeos estão entre uma das mais importantes e urgentes prioridades nas áreas de pesquisa e desenvolvimento para a indústria do etanol celulósico e para a obtenção de químicos em processos desenvolvidos em biorrefinaria (BIOMASS RESEARCH AND DEVELOPMENT TECHNICAL ADVISORY COMMITTEE, 2002; EERE, 2006; ZHANG et al., 2007; ZHANG, 2008; HUANG et al., 2011).

A biomassa lignocelulósica possui o complexo lignina-carboidrato naturalmente resistente o que limita a acessibilidade das enzimas à celulose e hemicelulose (YANG; WYMAN; 2008). Portanto, um processamento prévio e adequado destes materiais torna-se necessário para romper a parede celular (barreira física), bem como diminuir a cristalinidade da celulose e a associação com a lignina para que as enzimas hidrolíticas possam acessar a macroestrutura da biomassa a fim de aumentar o rendimento de conversão da celulose em glicose (figura 2.9) (MOSIER et al., 2005; WYMAN et al., 2005; KIM; HOLTZAPPLE, 2006; HIMMEL et al., 2007).

A quantidade variável de hemicelulose e lignina em um material lignocelulósico depende de fatores como o tipo da planta a partir da qual a biomassa é obtida, idade da colheita, etc. Isto mostra que não há nenhum método de pré-tratamento específico para diversos tipos de materiais lignocelulósicos (CLAASSEN et al., 1999).

Figura 2.9 – Esquema do efeito do pré-tratamento em materiais lignocelulósicos.

Fonte: adaptado de MOSIER et al., 2005.

Nos estudos de conversão da biomassa lignocelulósica, a etapa de pré-tratamento pode influenciar fortemente o custo do processo, uma vez que determinará o rendimento de hidrólise enzimática, a carga de enzima utilizada no processo, o poder de mistura dos

reagentes, a concentração e a purificação dos produtos obtidos, a demanda no tratamento de resíduos, entre outras variáveis do processo. Portanto, esta etapa de processamento da biomassa vegetal necessita ser de baixo custo, sendo que deve ser evitado o elevado consumo de reagentes químicos, a alta demanda energética e a intensa degradação dos materiais lignocelulósicos (WYMAN et al., 2005). Para a etapa de pré-tratamento, vários processos têm sido propostos e desenvolvidos podendo-se destacar os processos físicos, químicos, biológicos ou uma combinação destes (SUN; CHENG, 2002). Os principais métodos são reportados na tabela 2.2 e foram revisados por McMillan (1994), Wyman (1996), Sun e Cheng (2002), e Mosier et al. (2005).

Tabela 2.2 – Diversos tipos de métodos de pré-tratamento para materiais lignocelulósicos (adaptado de TAHERZADEH; KARIMI, 2007; SÁNCHEZ; CARDONA, 2008)

Método	Processo	Efeitos no lignocelulósico
Pré-tratamentos Físicos	<ul style="list-style-type: none"> - Moinho de bola - Moinho de martelo - Hidrotérmico (água quente) - Vapor a alta pressão - Extrusão - Pirólise - Irradiação de raios gama - Irradiação de micro-ondas - Irradiação de ultrassom 	<ul style="list-style-type: none"> - Aumento da área superficial acessível e do tamanho dos poros - Redução do grau de cristalinidade da celulose e o seu grau de polimerização - Hidrólise parcial da hemicelulose - Fragmentação parcial da lignina
Pré-tratamentos Físico-químicos e químicos	<p>BASEADOS EM EXPLOSAO:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Explosão a vapor - AFEX (Ammonia Fiber Explosion) - Explosão com impregnação de SO₂ <p>BASEADOS EM ÁLCALIS:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Hidróxido de sódio - Amônia ou Sulfeto de Amônio <p>BASEADOS EM GÁS:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dióxido de cloro - Dióxido de nitrogênio <p>BASEADOS EM ÁCIDOS:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Ácido sulfúrico - Ácido clorídrico - Dióxido de enxofre <p>AGENTES OXIDANTES:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Peróxido de hidrogênio - Ozônio <p>SOLVENTES:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Cadoxen (Solvente de celulose) - Líquidos iônicos <p>ORGANOSOLV:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Extração etanol-água - Extração benzeno-água 	<ul style="list-style-type: none"> - Deslignificação - Redução do grau de cristalinidade da celulose e o seu grau de polimerização - Hidrólise parcial ou completa da hemicelulose
Pré-tratamentos biológicos	<ul style="list-style-type: none"> - Uso de actinomicetos - Uso de fungos 	<ul style="list-style-type: none"> - Deslignificação - Redução do grau de polimerização da hemicelulose e celulose

Dentre essas técnicas de pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos, pode-se destacar a explosão a vapor, o hidrotérmico, AFEX e utilização de ácido diluído como métodos mais estudados e promissores no processo de obtenção de etanol a partir da biomassa vegetal (MOSIER et al., 2005; SÁNCHEZ; CARDONA, 2008).

2.5.1 Pré-tratamento ácido diluído

Dentre os tipos de pré-tratamento existentes a hidrólise utilizando ácido diluído é a técnica mais empregada para a remoção da fração hemicelulósica e tem sido aplicada a diversos resíduos agrícolas, empregando-se uma extensa faixa de catalisadores tais como os ácidos sulfúrico, clorídrico, fosfórico e nítrico (RAMOS, 2003; SEABRA, 2008; MUSSATTO; TEIXEIRA, 2010). Este processo de hidrólise apresenta como maior vantagem a rápida taxa de reação, o que é facilitado pelo processo contínuo (DEMIRBAS, 2008).

O processo de pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos utilizando ácido diluído é conduzido sob alta temperatura e pressão, e tem um tempo de reação na faixa de minutos, com o objetivo de solubilizar a hemicelulose, e com isso deixar a celulose mais acessível para a etapa de sacarificação enzimática (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009) já que a presença da hemicelulose juntamente com a lignina reduz a eficiência desta etapa (MUSSATTO et al., 2008).

O pré-tratamento pode também ser conduzido com ácido concentrado para aumentar a solubilização da fração hemicelulósica. Porém, além da maior solubilização de hemicelulose, o uso de ácidos concentrados necessita de intenso cuidado, pois estes reagentes são tóxicos, corrosivos, favorecem maior precipitação de lignina solubilizada, maior formação de hidroximetilfurfural e furfural (produtos de desidratação da glicose e xilose, respectivamente), e maior liberação de ácido acético pela desacetilação da hemicelulose, sendo que estes compostos atuam como inibidores do processo fermentativo para produção de etanol. Além disso, o uso de ácidos concentrados promove a corrosão interna dos equipamentos, exigindo a construção de reatores mais resistentes e, portanto, mais caros. (FENGEL; WEGENER, 1989; SHEVCHENKO; BEATSON; SADDLER, 1999; LIU; WYMAN, 2003; RAMOS, 2003).

Logo, o pré-tratamento da biomassa vegetal empregando ácido diluído é bastante utilizado, pois as reações secundárias gerando produtos de degradação são menos

pronunciadas do que usando o ácido concentrado e a digestibilidade do material pré-tratado correlaciona bem com a remoção da fração hemicelulósica (WYMAN, 1994; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

Há primeiramente dois tipos de processos de pré-tratamento com ácido diluído: processos que trabalham a altas temperaturas (maiores que 160 °C) com fluxo contínuo para baixa carga de sólidos (5-10 % (m/m)) e processos que trabalham a baixas temperaturas (menores que 160 °C) em batelada para alta carga de sólidos (10-40 % (m/m)) (SUN; CHENG, 2002; SAHA, 2003). Durante o pré-tratamento com ácido diluído dos materiais lignocelulósicos há hidrólise da hemicelulose em açúcares monoméricos (xilose, arabinose, entre outros), os quais são solúveis em água, e há formação de um resíduo sólido rico em celulose e lignina.

O pH do hidrolisado hemicelulósico obtido do processo de pré-tratamento ácido diluído necessita ser corrigido para a sua utilização nos processos fermentativos, sem que haja inibição dos microrganismos por um pH desfavorável à sua eficiente bioconversão (SAHA, 2003). Da mesma forma, o material sólido resultante da etapa de pré-tratamento necessita ser neutralizado para que seja utilizado em uma etapa posterior, como a hidrólise enzimática, por exemplo. Isto adiciona novos passos ao processo, tais como, a utilização de grande quantidade de água, com implicações inevitáveis nos custos operacionais.

A hidrólise com ácido sulfúrico diluído (empregando-se H_2SO_4 0,5 % a 1,5 % (m/v) e temperatura acima de 160 °C) tem sido historicamente o processo preferido para aplicações industriais, por conta do alto rendimento de açúcares a partir da hemicelulose (75-90 % de xilose) (HAMELINCK; HOOIJDONK; FAALJ, 2005; SEABRA, 2008), e também por melhorar o processo subsequente que consiste na hidrólise enzimática da celulose (YU; LOU; WU, 2008).

Rezende et al. (2011) avaliaram o pré-tratamento ácido diluído de bagaço de cana-de-açúcar. O processo, no qual foi utilizado H_2SO_4 (1 % v/v) a 120 °C por 40 min conseguiu uma solubilização de 80 % da fração hemicelulósica e uma redução de 15 % do total de lignina do bagaço de cana.

O pré-tratamento de biomassas lignocelulósicas empregando soluções diluídas de ácido fosfórico também se tem apresentado como promissor. O uso de soluções diluídas de ácido fosfórico como catalisador, comparativamente aos procedimentos que utilizam ácidos mais fortes como ácido sulfúrico, apresenta menor efeito destrutivo sobre as

pentoses, com menor acúmulo de furfural no meio de reação (FONTANA et al., 1984; GOMEZ-RUEDA, 2010).

Vasconcelos et al. (2013) empregaram H_3PO_4 0,20 % (m/v) a 186 °C por 8 min em reator rotatório de 20 L, para o pré-tratamento de bagaço de cana. Nestas condições de processo, foi solubilizada aproximadamente 96 % da fração hemicelulósica, sendo gerada baixa quantidade de inibidores.

2.6 Remoção da Lignina

Para se obter uma elevada taxa de conversão enzimática da celulose em glicose, tanto a hemicelulose quanto a lignina, precisam ser removidas ou modificadas. Do mesmo modo que a hemicelulose, a lignina também forma uma barreira física protetora ao ataque enzimático da fração celulósica, não sendo completamente removida na etapa de pré-tratamento do material lignocelulósico (PAN et al., 2005; ÖHGREN et al., 2007; ROCHA et al., 2013). Existem vários métodos utilizados para a remoção de lignina das biomassas vegetais, e dentre eles estão a polpação soda, polpação soda-antraquinona, polpação sulfito, polpação kraft e polpação organosolv (SÁNCHEZ; CARDONA, 2008). Estas técnicas são geralmente empregadas em materiais lignocelulósicos “in natura”, os quais apresentam uma estrutura morfológica bem rígida e recalcitrante, necessitando assim de condições de reação mais severas (concentração de álcali > 10% e temperatura acima de 150 °C).

Por outro lado, quando o material lignocelulósico já foi submetido a um pré-tratamento que torna a lignina mais exposta e fragilizada, a técnica utilizada para remoção da lignina é a extração alcalina, que consiste do mesmo processo da polpação soda, porém em condições de reação mais brandas (concentração de álcali no máximo 4 % e temperaturas na ordem de 70 °C) (OLIVEIRA, 2012). Esta técnica, muito utilizada na deslignificação de materiais não lenhosos, consiste na dissolução da lignina, a qual é separada do material de partida pela formação de um licor de coloração escura, rico em compostos fenólicos, representando o efluente do processo de polpação (GARCÍA et al., 2009).

A influência da lignina na hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos vem sendo muito abordada na literatura. Mussatto et al. (2008) avaliaram o efeito da hemicelulose e lignina na sacarificação da fração celulósica de bagaço de malte e

observaram que a razão da conversão celulósica (definida pelo rendimento de glicose + celobiose) a partir da celulignina (celulose + lignina) foi 3,5 vezes maior do que a hidrólise enzimática do lignocelulósico não pré-tratado, e foi de 4 vezes maior a partir da polpa celulósica, correspondendo a 85,6 % de rendimento de glicose.

Silva et al. (2011) verificaram a influência da deslignificação com NaOH 1.0 % (m/v) a 100 °C por 1 h na hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado por processo hidrotérmico. Estes autores verificaram que a sacarificação enzimática do material pré-tratado e deslignificado proporcionou uma conversão de celulose em glicose próxima a 90 % contra 70 % de conversão do material apenas pré-tratado.

Já Siqueira et al. (2013) investigaram a remoção seletiva de lignina do bagaço de cana empregando clorito de sódio/ácido acético para a obtenção de substratos modelo com baixos níveis de lignina. Os autores observaram que os níveis de conversão enzimática da fração celulósica destes substratos foram maiores que 80 % para substratos que tiveram mais que 60 % de lignina removida. A maioria dos processos de pré-tratamento proporcionam múltiplos efeitos na estrutura dos materiais lignocelulósicos devido à complexidade destes materiais, o que torna difícil o estudo do efeito isolado da lignina na conversão enzimática (SIQUEIRA et al., 2013).

2.7 Hidrólise Enzimática de Materiais Lignocelulósicos

A etapa de hidrólise enzimática da celulose, necessária para a obtenção de açúcares fermentáveis, ocorre após a etapa de pré-tratamento, que é seguida ou não de uma posterior remoção da lignina remanescente deste processo. Esta hidrólise é catalisada por enzimas específicas denominadas de enzimas celulolíticas ou celulasas e diante da heterogeneidade da estrutura da cadeia celulósica, a qual apresenta regiões altamente ordenadas, estabilizadas por numerosas ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, e áreas menos ordenadas ou amorfas, esta sacarificação depende de um sinergismo do complexo enzimático para que todo carboidrato presente seja hidrolisado (PITARELO, 2007).

As celulasas são usualmente uma mistura de diversas enzimas e pelo menos três grupos principais destas estão envolvidos no processo hidrolítico (figura 2.10):

1. Endoglucanase (endo-1,4-D-glucanohidrolase, ou EC 3.2.1.4), a qual ataca regiões de baixa cristalinidade na fibra celulósica, criando cadeias com extremidades livres;

2. Exoglucanase ou celobiohidrolase (1,4- β -D-glucano celobiohidrolase ou EC 3.2.1.91.) a qual se liga nas extremidades das cadeias e gera principalmente glicose e celobiose.

3. β -glicosidase (EC 3.2.1.21), responsável por clivar a celobiose produzindo duas moléculas de glicose.

Figura 2.10 – Modo de ação das celulasas em um sistema enzimático cooperativo na degradação da celulose.

Fonte: adaptado de MUSSATTO; TEIXEIRA, 2010.

Pesquisas são realizadas com diferentes microrganismos capazes de produzir celulasas sendo que o mais utilizado industrialmente é o fungo *Trichoderma reesei*. Entretanto, apresenta como desvantagem, a baixa produção de β -glicosidase, e isto restringe a conversão de celobiose em glicose proporcionando inibição da atividade das celulasas pelo acúmulo de celobiose (SHEN; XIA, 2004; CORREDOR; BEAN; WANG, 2007). Portanto, um suplemento de β -glicosidase, obtido a partir do fungo *Aspergillus sp*, por exemplo, é necessário para reduzir o efeito inibitório da celobiose nas celulasas e aumentar o rendimento de conversão da celulose em glicose (CHEN; ZHAO; XIA, 2008).

Vários pesquisadores têm realizado estudos de sacarificação enzimática de materiais lignocelulósicos utilizando xilanases (1,4- β -D-xilanase, EC 3.2.1.8) como um suplemento às celulasas, com o objetivo de aumentar a taxa de hidrólise da fração hemicelulósica ainda remanescente da etapa de pré-tratamento e com isso deixando a fração celulósica mais acessível à ação das celulasas a fim de proporcionar um aumento na conversão da celulose em glicose (ÖHGREN et al., 2007; PETERSEN; LARSEN;

THOMSEN, 2009). As xilanases, as quais são enzimas que tem como função degradar a cadeia principal de xilana constituinte da estrutura hemicelulósica, podem ser produzidas pelo fungo *Trichoderma reesei*, a partir de seu crescimento em substratos lignocelulósicos ricos em pentoses, tais como a palha de trigo (TABKA et al., 2006).

2.8 Fermentação de hidrolisados celulósicos

O processo fermentativo do caldo rico em açúcares redutores, obtido após a hidrólise dos materiais lignocelulósicos, é uma etapa importante no processo de obtenção de etanol de 2ª geração, a qual deve ser compatível com um custo de produção factível, sob uma visão técnica e econômica. Nesse sentido, deve-se levar em conta o consumo energético associado às condições de fermentação e a concentração de etanol final obtida no vinho (ROSSELL, 2007). A fermentação alcoólica é um processo em que os açúcares são convertidos em etanol por meio de microrganismos (usualmente leveduras, sendo *Saccharomyces cerevisiae* a mais utilizada), conforme a equação:

com rendimento estequiométrico da reação de 0,51 g etanol/g glicose.

Atualmente, entre 70-80 % das destilarias brasileiras utilizam a técnica de reciclo de células no processo (BRETHAUER; WYMAN, 2010). Entre suas vantagens estão a redução de tempo e custos envolvidos com a suplementação de nutrientes, no preparo do inóculo (SANDA et al., 2011), diminuição no consumo de carbono para o crescimento celular e um incremento da produtividade de etanol (BRETHAUER; WYMAN, 2010). Além disso, é possível ter maiores concentrações de células no fermentador (10-17 % m/v base úmida), quando comparado com os processos comuns. Como consequência, o tempo de fermentação é reduzido para 6-11 h (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011) e há um incremento na produção de etanol a 90-92 % do valor teórico. Além disso, ocorre uma seleção de leveduras resistentes imposta pelas condições de estresse operacional encontrados no ambiente industrial, tais como altas temperaturas e concentrações de etanol, estresse osmótico, devido às altas concentrações de sal e açúcar, contaminação microbiana e acidificação do meio (MIRANDA JUNIOR et al, 2009). Assim, essa prática pode ser usada como uma estratégia para obter maior desempenho do processo e um comportamento desejável do microrganismo (ANDRADE et al., 2013; LANDAETA et al., 2013; MATANO; HASUNUMA; KONDO, 2013).

3 OBJETIVOS

Geral

O objetivo geral deste trabalho é avaliar parâmetros experimentais do fracionamento do bagaço de cana-de-açúcar na obtenção de etanol celulósico e lignina

Específicos

- Avaliar o efeito dos ácidos fosfórico e sulfúrico como catalisadores no processo de pré-tratamento ácido diluído do bagaço de cana-de-açúcar em reator piloto.
- Estudar a deslignificação do bagaço pré-tratado, em reator de bancada, avaliando-se os efeitos da temperatura, tempo, concentração de hidróxido de sódio e relação sólido líquido, na busca pela máxima remoção de lignina e maior conversão enzimática da polpa celulósica, de forma a propor um escalonamento, em reator piloto, das melhores condições obtidas em reator de bancada;
- Utilizar as técnicas de difração de raios X, microscopia eletrônica de varredura e calorimetria diferencial de varredura, após cada etapa de pré-tratamento e deslignificação alcalina em escala piloto do bagaço de cana, a fim de analisar mudanças na estrutura química e morfológica da biomassa;
- Realizar a hidrólise enzimática do bagaço de cana nas formas “in natura”, pré-tratada e deslignificada, e com isso analisar a eficiência do pré-tratamento e da deslignificação;
- Avaliar a fermentação alcoólica do hidrolisado celulósico de bagaço de cana obtido sob as melhores condições de deslignificação e hidrólise enzimática.
- Caracterizar as ligninas obtidas, nas melhores condições reacionais, pelos processos de deslignificação alcalina.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material lignocelulósico estudado

No presente trabalho, foi avaliado o pré-tratamento e a deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar, sendo este material gentilmente fornecido pela Usina da Pedra (unidade do Grupo Pedra Agroindustrial), localizada em Serrana – SP.

O bagaço de cana foi colhido imediatamente após a moagem do mesmo. Após transporte à Escola de Engenharia de Lorena – EEL/USP, ele foi seco ao ar livre até redução de sua umidade a valores inferiores a 10%. Por fim, o bagaço seco foi armazenado em sacos de plástico de capacidade de 50 L para posteriores processos de pré-tratamento.

A seguir, é apresentado o fluxograma de trabalho para a biomassa estudada (figura 4.1). O projeto foi executado avaliando-se dois tipos de pré-tratamento ácido diluído em escala piloto: o primeiro utilizando-se o ácido fosfórico em condições brandas de processo (adaptado de Gómez-Rueda, 2010) e o segundo utilizando-se o ácido sulfúrico em condições já realizadas na EEL/USP por Medina (2013). As etapas de deslignificação, hidrólise enzimática, fermentação e todo o procedimento analítico de caracterização do bagaço de cana foram desenvolvidos no Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol – CTBE/CNPEN, Campinas, SP.

A etapa de caracterização das ligninas foi realizada no Departamento de Química do Instituto de Ciências da Madeira da Universidade de Hamburgo, Alemanha.

Figura 4.1 – Fluxograma de trabalho para o bagaço de cana-de-açúcar empregando-se os ácidos fosfórico e sulfúrico diluídos, como pré-tratamento.

Fonte: Arquivo pessoal.

4.2 Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar foi submetido a um pré-tratamento com ácido fosfórico diluído, em escala piloto, num reator aço inox (AISI 316) equipado com camisa de óleo térmico para aquecimento indireto por resistência elétrica, agitado, com capacidade de 350 L, localizado no Departamento de Engenharia Química da Escola de Engenharia de Lorena – EEL/USP (figura 4.2).

Figura 4.2 – Foto do reator piloto em que foram realizados os pré-tratamentos com ácido diluído (H_3PO_4 e H_2SO_4) do bagaço de cana-de-açúcar (A). Vista superior do reator agitado (B).

Fonte: Arquivo pessoal.

As condições de reação empregadas foram as seguintes: 20,0 kg de bagaço (massa seca), 200 L de solução de H_3PO_4 1,5 % (m/v) e agitação de 100 rpm. O reator foi carregado com 160 L de água, e então iniciou-se o aquecimento. Ao atingir aproximadamente 95 °C foram adicionados 20,0 kg de bagaço (massa seca), a solução de H_3PO_4 , preparada com 20 L de água contendo 3,0 kg de H_3PO_4 (base 100 %) e mais 20 L de água para lavar o sistema e completar o volume. O reator foi fechado e aquecido até 120 °C, monitorando-se a temperatura a cada 15 min, de acordo com o gráfico apresentado na figura 4.3.

Ao atingir a temperatura de reação de 120 °C o sistema foi mantido por 20 min, sendo que após o término da reação, o reator foi despressurizado lentamente até chegar à pressão ambiente e temperatura de aproximadamente 100 °C. O bagaço de cana pré-tratado foi então descarregado do reator e o hidrolisado hemicelulósico separado da massa de sólido obtida do pré-tratamento (celulignina) por filtração.

Essa massa de sólido (celulignina) foi lavada com água, até atingir pH neutro, sendo posteriormente pesada, a fim de se determinar o rendimento desta etapa, e

posteriormente utilizada para caracterização química, ensaio de conversão enzimática e deslignificação alcalina com NaOH.

Em relação ao pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído, as condições reacionais empregadas foram as seguintes: 20,0 kg de bagaço (massa seca), 200 L de solução de H_2SO_4 1 % (m/v) e agitação de 100 rpm. O reator foi carregado com 160 L de água, e então iniciou-se o aquecimento. Ao atingir aproximadamente 95 °C foram adicionados 20,0 kg de bagaço (massa seca), a solução de H_2SO_4 , preparada com 20 L de água contendo 2,0 kg de H_2SO_4 (base 100 %) e mais 20 L de água para lavar o sistema e completar o volume. O reator foi fechado e aquecido até 120 °C, monitorando-se a temperatura a cada 15 min.

Ao atingir a temperatura de reação de 120 °C o sistema foi mantido por 20 min, sendo que após o término da reação, o reator foi despressurizado lentamente até chegar à pressão ambiente e temperatura de aproximadamente 100 °C. O bagaço de cana pré-tratado foi então descarregado do reator e o hidrolisado hemicelulósico separado da massa de sólido obtida do pré-tratamento (celulignina) por filtração, repetindo-se os mesmos procedimentos para o bagaço pré-tratado com ácido fosfórico diluído.

A figura 4.3 a seguir correlaciona o perfil de temperatura em função do tempo para as duas reações de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar.

Figura 4.3 – Perfil da temperatura em função do tempo de aquecimento durante o processo de pré-tratamento ácido diluído do bagaço de cana em reator piloto de 350 L.

Fonte: Arquivo pessoal.

Todos os rendimentos mássicos das etapas de pré-tratamento estudadas neste trabalho foram calculados utilizando a equação a seguir:

$$R = \frac{m_{final}}{m_{inicial}} \times 100 \quad (4.1)$$

onde: $m_{inicial}$: massa inicial seca de material lignocelulósico (g);
 m_{final} : massa final seca de material lignocelulósico (g);
 R: rendimento mássico da etapa.

A perda do componente macromolecular (celulose, hemicelulose e lignina) foi calculada pela seguinte equação:

$$P = 100 \times \left(\frac{M_i \cdot y_i - M_i \cdot R \cdot y_f}{M_i \cdot y_i} \right) = 100 \times \left(1 - R \frac{y_f}{y_i} \right) \quad (4.2)$$

onde: P: perda do componente macromolecular (%);
 M_i : massa inicial de material lignocelulósico;
 y_i : teor do componente macromolecular no material lignocelulósico “in natura”;
 y_f : teor do componente macromolecular no material lignocelulósico pré-tratado;
 R: rendimento mássico da etapa de pré-tratamento.

4.3 Deslignificação Alcalina

4.3.1 Estudo da influência das variáveis: temperatura, tempo, concentração de NaOH e relação sólido-líquido na deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com os ácidos fosfórico e sulfúrico

Para o processo de deslignificação do bagaço de cana pré-tratado com ácido diluído foi empregada a técnica de extração alcalina sendo a reação realizada em reator de bancada Parr (modelo 4532) com volume de 2 L (figura 4.4).

Figura 4.4 – Foto do reator de bancada utilizado no processo de deslignificação do bagaço de cana pré-tratado com ácido diluído.

Fonte: Arquivo pessoal.

As variáveis selecionadas para realizar o estudo de otimização do processo de deslignificação alcalina do bagaço de cana obtido pelos pré-tratamentos com H_3PO_4 1,5 % (m/v) e com H_2SO_4 1,0 % (m/v) foram: temperatura ($^{\circ}\text{C}$), tempo (min), concentração de NaOH (% m/v), relação sólido-líquido. Na tabela 4.1 são apresentados os níveis escolhidos para cada variável.

Tabela 4.1 – Codificação dos níveis para as variáveis avaliadas

Variáveis	Níveis		
	Inferior (-)	Médio (0)	Superior (+)
X_1 (temperatura, $^{\circ}\text{C}$)	80	100	120
X_2 (tempo, min)	30	60	90
X_3 (concentração de NaOH, % m/v)	0,5	1,0	1,5
X_4 (relação sólido-líquido, S/L)	1:5	1:10	1:15

Foi proposto um planejamento fatorial completo 2^4 com três repetições no ponto central, conforme apresentado na tabela 4.2. Como variáveis respostas foram consideradas maiores porcentagens em massa de lignina removida e a conversão enzimática da fração celulósica. Para cada ensaio do planejamento fatorial foram utilizadas 50,0 g de bagaço de cana pré-tratado (massa seca).

Tabela 4.2 – Matriz do planejamento fatorial 2^4 para avaliação da influência das variáveis: temperatura, tempo, concentração de NaOH e relação sólido-líquido na deslignificação do bagaço de cana pré-tratado com H_3PO_4 1,5 % (m/v) e H_2SO_4 1,0 % (m/v)

Ensaio	Níveis codificados				Níveis reais			
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_1 (°C)	X_2 (min)	X_3 (% m/v)	X_4 (S/L)
01	-	-	-	-	80	30	0,5	1:5
02	+	-	-	-	120	30	0,5	1:5
03	-	+	-	-	80	90	0,5	1:5
04	+	+	-	-	120	90	0,5	1:5
05	-	-	+	-	80	30	1,5	1:5
06	+	-	+	-	120	30	1,5	1:5
07	-	+	+	-	80	90	1,5	1:5
08	+	+	+	-	120	90	1,5	1:5
09	-	-	-	+	80	30	0,5	1:15
10	+	-	-	+	120	30	0,5	1:15
11	-	+	-	+	80	90	0,5	1:15
12	+	+	-	+	120	90	0,5	1:15
13	-	-	+	+	80	30	1,5	1:15
14	+	-	+	+	120	30	1,5	1:15
15	-	+	+	+	80	90	1,5	1:15
16	+	+	+	+	120	90	1,5	1:15
17	0	0	0	0	100	60	1,0	1:10
18	0	0	0	0	100	60	1,0	1:10
19	0	0	0	0	100	60	1,0	1:10

A fração sólida foi lavada com água destilada até pH neutro para total remoção da lignina extraída, até não mais apresentar coloração amarelada no efluente da lavagem. Após este procedimento, a polpa celulósica do bagaço de cana foi seca à temperatura ambiente, pesada e a massa corrigida pela umidade, para então ser mensurada quanto ao rendimento mássico (base seca) do processo (equação 4.1). Uma fração de cada material deslignificado foi reservada para posterior análise de caracterização química e ensaio de conversão enzimática.

As melhores condições reacionais de deslignificação obtidas tanto para o bagaço proveniente do pré-tratamento com H_3PO_4 1,5 % (m/v), quanto para o proveniente do pré-tratamento com H_2SO_4 1,0 % (m/v) foram reproduzidas em reator piloto de 350 L. Para a análise estatística dos experimentos foi utilizado o programa Statistica versão 7.0.

4.4 Hidrólise Enzimática

No presente trabalho, os ensaios de conversão enzimática foram realizados utilizando celulase comercial (Celluclast 1.5 L), adquirida da Empresa LNF Latino Americana, suplementada com β -glicosidase (Novozym 188), adquirida da Empresa Sigma-Aldrich.

O protocolo escolhido para se avaliar a sacarificação enzimática do bagaço de cana após as etapas de pré-tratamento e deslignificação ocorreu nas seguintes condições de reação: tampão citrato de sódio $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 4,8, sob agitação de 150 rpm em incubadora de movimento rotatório a 50°C por 72 h e relação sólido:líquido 1:10 (m/v). As cargas enzimáticas que foram utilizadas são de 15 FPU.g^{-1} de material lignocelulósico seco, para o complexo Celluclast 1.5 L, e de 10 UI.g^{-1} de material lignocelulósico seco para a enzima β -glicosidase, sendo estes valores baseados em dados comumente encontrados na literatura (WYMAN et al., 1999; BALLESTEROS et al., 2004; CARA et al., 2006).

Após o término da reação enzimática os hidrolisados foram fervidos por 5 min para cessar a atividade enzimática, sendo posteriormente filtrados em papel de filtro Whatmann nº1 e analisados por cromatografia líquida de alta eficiência, conforme será descrito abaixo. Os resíduos da hidrólise enzimática foram reservados para posterior quantificação da massa residual deste processo.

A conversão enzimática da celulose foi calculada pela equação 4.3:

$$CC = \frac{m_{\text{glicose}} \times f_h}{m_{\text{inicial}} \times y_i} \times 100 \quad (4.3)$$

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 0,9)

A atividade celulolítica total (FPase) foi determinada empregando-se a metodologia padrão de Mandels; Andreotti e Roche (1976). Em um tubo de ensaio foram adicionados 0,3 mL de extrato enzimático, 1,2 mL de tampão citrato de sódio $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 4,8 e

50 mg de papel de filtro Whatmann n°1 como substrato. O meio foi incubado em um banho-maria à temperatura de 45 °C por 1 h, sendo que, a glicose liberada foi determinada pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) descrito por Miller (1959).

A reação foi interrompida pela adição de 3 mL de DNS, sendo o meio fervido, em seguida, por 5 min. Após o resfriamento, a absorbância em 540 nm foi lida em um espectrofotômetro UV-visível Thermo Scientific modelo Evolution 60.

A atividade da enzima β -glicosidase foi determinada utilizando-se a metodologia descrita por Mongkolthanaruk e Dharmstithi (2002). Em um tubo de ensaio foram adicionados 0,1 mL de extrato enzimático e 0,4 mL de solução 0,1% (m/v) de p-NPG (para-nitrofenol β -1 $\rightarrow$ 4 glicosídeo).

O meio foi incubado em banho-maria a 45 °C por 30 min e após este tempo, a reação foi interrompida pela adição de 1 mL de solução 10 % (m/v) de bicarbonato de sódio (NaHCO₃). A quantidade de glicose liberada foi mensurada pela equivalência molar do p-NP (para-Nitrofenol) na clivagem do p-NPG (1 p-NPG $\rightarrow$ 1 glicose + 1 p-NP) e utilizando a absorvidade molar do p-NP ($\epsilon_{410\text{nm}} = 15.000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$).

4.5 Caracterização Química dos Materiais Lignocelulósicos

As caracterizações químicas das amostras “in natura”, pré-tratada e pré-tratada/deslignificada de bagaço de cana foram realizadas empregando-se a metodologia analítica desenvolvida por Rocha et al. (1997) e validada por Gouveia et al. (2009).

Amostras de 2 g (massa seca) de material lignocelulósico (moídas a $\leq 0,841 \text{ mm}$) foram pesadas com precisão de 0,1 mg e transferidas para um béquer de 100 mL para serem tratadas com 10 mL de H₂SO₄ 72 %, sob vigorosa agitação, em um banho termostatizado a $45,0 \pm 0,5 \text{ °C}$ 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 de água a 275 mL. 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, a 121 °C.

Após a descompressão da autoclave, o Erlenmeyer foi retirado da mesma, resfriado à temperatura ambiente, sendo a mistura reacional filtrada e transferida para um balão volumétrico de 500 mL que foi completado com a água de lavagem do material retido no

filtro. O balão volumétrico contendo o hidrolisado foi armazenado para posterior análise de carboidratos, ácidos orgânicos, furfural, hidroximetilfurfural e lignina solúvel.

4.5.1 Determinação de carboidratos e ácidos orgânicos por CLAE

Os hidrolisados obtidos no item 4.5 e os obtidos pela hidrólise enzimática (item 4.4) foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), empregando-se uma coluna Aminex HPX-87H (300 mm x 7,8 mm) em um cromatógrafo Dionex Ultimate 3000, utilizando como fase móvel H_2SO_4 0,005 mol.L⁻¹ com fluxo de 0,5 mL.min⁻¹, a 50 °C.

Os compostos foram monitorados com um detector de índice de refração Shodex RI-101, sendo os compostos fenólicos presentes nas amostras removidos por cartuchos de extração em fase sólida Sep-Pak C₁₈.

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.

4.5.2 Determinação de lignina insolúvel em meio ácido

O material insolúvel retido no papel de filtro proveniente da etapa de hidrólise ácida para caracterização química foi lavado com aproximadamente 1,5 L de água destilada, para remoção de ácido residual (até pH próximo de 7), e seco em estufa à temperatura de 105 °C até massa constante. A porcentagem de lignina insolúvel em meio ácido foi calculada em relação à massa de material lignocelulósico seco descontando-se a massa de cinzas presente na lignina.

4.5.3 Determinação do teor de cinzas da lignina

Os materiais resultantes da etapa de determinação de lignina insolúvel foram colocados em cadinho de porcelana previamente calcinado e tarado. Posteriormente, estes materiais foram inicialmente pré-calcinados à 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. A massa obtida foi utilizada para subtrair do teor de lignina descrito no item 4.6.2 e então se obter a massa real de lignina insolúvel.

4.5.4 Determinação do teor de cinzas totais

Para determinação do teor de cinzas totais, foram pesados aproximadamente 2 g de material lignocelulósico (base seca) em cadinho de porcelana previamente calcinado e tarado. Posteriormente estes materiais foram inicialmente pré-calcinados à 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 de lignina solúvel

A quantidade de lignina solúvel foi determinada pela medida de absorbância a 280 nm em um espectrofotômetro UV-visível Thermo Scientific modelo Evolution 300. Uma alíquota de 5 mL do hidrolisado obtido da etapa de hidrolise ácida para caracterização química do bagaço de cana foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL, juntamente com 50 mL de água destilada e 2 mL de NaOH 6,5 N (pH final próximo a 12).

Após agitação, o volume foi completado com água destilada e essa mistura resultante foi analisada no espectrofotômetro. As equações abaixo foram utilizadas para determinar a concentração de lignina solúvel no hidrolisado:

$$C_{Lig} = \frac{(A_{T280nm} - A_{PD280nm}) - A}{B} \quad (4.4)$$

$$A_{PD280nm} = C_{HMF} \cdot \epsilon_{HMF} + C_F \cdot \epsilon_F \quad (4.5)$$

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

A_{T280nm} : Absorbância total do hidrolisado em 280 nm;

$A_{PD280nm}$: Absorbância dos produtos de degradação em 280 nm;

ϵ_{HMF} : Absortividade do hidroximetilfurfural (114,0 L.g⁻¹.cm⁻¹) (dado experimental);

$\epsilon_{Furfural}$: Absortividade do furfural (146,8 L.g⁻¹.cm⁻¹) (dado experimental);

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

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

A: Coeficiente linear;

B: Coeficiente angular = Absortividade da lignina ($\text{L.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$).

Em seguida, foi obtida a equação analítica de determinação de lignina solúvel para o bagaço de cana-de-açúcar.

$$C_{Lig} = \frac{(A_{T280nm} - A_{PD280nm}) - 0,018}{23,7}$$

4.5.6 Determinação de furfural e hidroximetilfurfural

Furfural e hidroximetilfurfural foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em uma coluna C18 ($3\text{ }\mu\text{m}$) de $150\text{ mm} \times 4,6\text{ mm}$, utilizando-se acetonitrila/água 1:8 (v/v) com 1 % de ácido acético como fase móvel, a uma vazão de $0,8\text{ mL.min}^{-1}$, à temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

O hidrolisado obtido na etapa de hidrólise ácida para caracterização química do bagaço de cana foi previamente diluído com água na razão de 1:5, sendo posteriormente filtrado em membrana de diâmetro de poro de $0,47\text{ }\mu\text{m}$ (Milipore), para total remoção de partículas sólidas das amostras, e injetado com uma válvula Rheodyne equipada com alça de injeção de $10\text{ }\mu\text{L}$. Os compostos foram detectados em 274 nm por um detector UV-visível. As concentrações de furfural e hidroximetilfurfural foram determinadas a partir das curvas de calibração obtidas com os compostos puros.

4.6 Análise dos materiais lignocelulósicos por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Primeiramente, as amostras de bagaço de cana foram fixadas com fita carbono em suporte de alumínio (“stub”) e submetidas ao recobrimento metálico de 16 nm de ouro em um metalizador Coating System BAL-TEC SCD 050 e mantidas em dessecador até o momento da análise.

As fotomicrografias de MEV foram obtidas em um equipamento JEOL (modelo JSM-6330F) com detector Thermo JEOL (elétron secundário) a uma potência do feixe de elétrons de $5,0\text{ kV}$ (equipamento disponível no Laboratório Nacional de Nanotecnologia - LNNano). As amostras foram dispostas de forma que fosse possível observar as

modificações superficiais das fibras dos materiais lignocelulósicos estudados após as etapas de pré-tratamento e deslignificação.

4.7 Análise do bagaço de cana por difratometria de raios X (DRX)

Com o propósito de se avaliar a mudança de cristalinidade do bagaço de cana após as etapas de pré-tratamento e deslignificação, amostras deste material em estudo passaram por uma moagem branda, suficiente para que o material resultante pudesse ser inserido em um tubo capilar (de vidro ou borosilicato) de 2 mm de diâmetro. O feixe de raios-x foi incidido no capilar contendo a amostra, durante 6 minutos. Uma placa detectora foi posicionada atrás do capilar de forma que coletasse todos os raios-x que fossem difratados pela amostra. Cada material analisado gerou um padrão de difração.

A partir desses padrões foi possível fazer os devidos cálculos para se encontrar tanto a cristalinidade da amostra, como diversas características da celulose, tais como o tamanho médio dos cristalitos de celulose e parâmetros da sua célula unitária (DRIEMEIER; BRAGATTO, 2013).

A cristalinidade, portanto, é um valor que representa a proporção entre a massa dos cristais de celulose em relação à massa total da amostra analisada (equação 4.6) (DRIEMEIER; CALLIGARIS, 2011):

$$x_{cr} = \frac{\text{massa celulose cristalina}}{\text{massa amostra seca}} \quad (4.6)$$

onde:

$$0 < x_{cr} < 1$$

4.8 Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar por termoporometria com calorimetria diferencial de varredura (DSC)

O bagaço de cana foi analisado antes e após as etapas de pré-tratamento e deslignificação a fim de se verificar mudanças na estrutura deste material lignocelulósico em relação ao aumento do número de poros, sendo este um fator importante que pode influenciar a acessibilidade da enzima no substrato celulósico facilitando sua conversão em açúcares fermentáveis.

Os métodos termoporométricos em geral baseiam-se na mudança da propriedade física de uma substância (abaixamento do ponto de fusão) quando esta se encontra confinada dentro de pequenos espaços na matéria. A termoporometria com DSC mede a transferência de calor durante a mudança de fase da substância presente nos poros, sendo que a quantidade de líquido descongelado a uma temperatura específica está diretamente relacionada ao volume de poro de tamanho definido no material celulósico (ISHIZAWA et al., 2007).

As análises térmicas foram realizadas no equipamento DSC-Q200 da TA Instruments partindo-se de amostras lignocelulósicas úmidas (entre 15 e 16 mg de amostra). A medida de termoporometria foi realizada utilizando uma sequência de aquecimento de -70 °C até 0,5 °C, dividida em intervalo de temperaturas que diminuem gradativamente até temperaturas próximas da temperatura de fusão da água (0 °C). As rampas de aquecimento para cada intervalo de temperatura são de 1 °C/min intercaladas com isotermas. O tempo dessas isotermas (5-25 min) deve ser suficiente para que o fluxo de calor se estabilize na linha de base.

A porosidade do material lignocelulósico foi calculada por meio da razão entre a massa total de gelo derretido pela massa de material celulósico, para cada intervalo de temperatura, de acordo com metodologia descrita por Driemeier, Mendes e Oliveira (2012).

4.9 Fermentabilidade do hidrolisado celulósico de bagaço de cana-de-açúcar

Como estudo complementar aos processos de pré-tratamento e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar, também foi realizada a fermentação do hidrolisado celulósico como forma de avaliar a fermentabilidade deste material visando à produção de etanol. Para isto, foi escolhida a polpa celulósica obtida em escala piloto (reator de 350 L), proveniente do pré-tratamento com H₃PO₄ 1,5 % (m/v), para uma hidrólise enzimática da fração celulósica (empregando-se as mesmas condições utilizadas no item 4.4 deste trabalho) de forma a obter o hidrolisado a ser fermentado.

Este hidrolisado, obtido com concentração aproximada de glicose de 70 g/L, foi concentrado em um banho com água a 100 °C, até se obter a concentração de 120 g/L de glicose. Para o ensaio de fermentação do hidrolisado utilizou-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae* Pe-2, previamente estriada em placas de Petri em meio Agar YPD (yeast/peptone/dextrose) e mantida em geladeira a 7 °C. O pré-inóculo foi realizado em

frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de meio, a partir da inoculação de três alçadas da levedura mantida em placa de Petri em meio YPD (20 g/L de glicose, 10 g/L de peptona, 10 g/L extrato de levedura) sob agitação de 200 rpm, a 33 °C e 24 h. Logo, 10 % (v/v) de pré-inóculo foram transferidos para o inóculo composto de glicose (30 g L⁻¹), extrato de levedura (1,27 g L⁻¹), KH₂PO₄ (1,0 g L⁻¹), ureia (5,0 g L⁻¹), KCl (1,0 g L⁻¹), CaCl₂.2H₂O (1,0 g L⁻¹), oligo-elementos (1,0 mL L⁻¹) e tiamina (1,0 g L⁻¹) empregando-se as mesmas condições utilizadas para o pré-inóculo. A solução de oligo-elementos continha: H₃BO₃ (0,3 g L⁻¹), CoCl₂.6H₂O (0,2 g L⁻¹), ZnSO₄.7H₂O (0,1 g L⁻¹), MnCl₂.4H₂O (0,03 g L⁻¹), Na₂MoO₄.2H₂O (0,03 g L⁻¹), NiCl₂.6H₂O (0,02 g L⁻¹), CuSO₄.5H₂O (0,01 g L⁻¹). Após o tempo de inóculo, todas as células crescidas foram centrifugadas em centrífuga refrigerada a 11634 g por 30 min, lavadas com água peptonada estéril e ressuspensas em 70 mL de água estéril para inoculação no biorreator.

O biorreator foi esterilizado com água a 121 °C por 30 min e, após o resfriamento, a água foi bombeada por meio de uma bomba peristáltica para sua completa remoção. Em seguida, foram adicionados 2,25 g de extrato de levedura e 25 mL de KH₂PO₄ (30 g L⁻¹) ao hidrolisado enzimático. Para a realização da primeira fermentação em batelada, adicionou-se inicialmente ao biorreator, por meio de uma bomba peristáltica, 630 mL de hidrolisado enzimático e, em seguida, os 70 mL de suspensão celular. O crescimento celular foi estimado pela leitura da absorbância a 600 nm, por espectrofotometria no UV-Visível, que foi correlacionada a uma curva de calibração (peso seco *versus* densidade óptica), previamente estabelecida, e também por análise gravimétrica. O processo fermentativo foi monitorado por meio da determinação da concentração de açúcares redutores por espectroscopia no infravermelho médio (MIR) em um espectrômetro modelo Brucker Alpha FTIR. Foram realizadas 5 fermentações em batelada, com reciclo de células, em um biorreator modelo Bioflo 115, New Brunswick, USA, com 700 mL de volume de trabalho a 250 rpm, 33 °C e pH entre 4,5 e 5,0. Os ciclos foram realizados sucessivamente e da mesma forma que a primeira fermentação, de acordo com Andrade et al. (2013) modificado, em que ao término de cada fermentação todas as células de leveduras eram centrifugadas a 11634 g por 30 min a 4 °C, lavadas uma vez e ressuspensas para servir de inóculo para a próxima fermentação.

As amostras coletadas durante as fermentações foram submetidas a análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), segundo a metodologia descrita no item

4.5.1, quanto à composição de glicose, xilose, furfural, hidróximetilfurfural, ácido acético, glicerol e etanol, nos tempos 0h e a cada 4h, até o término da concentração de glicose.

A partir destes resultados, foram efetuadas análises dos seguintes parâmetros: rendimento em etanol ($Y_{P/S}$, g/g), o qual foi calculado pela razão entre a concentração de etanol produzida (g/L) e o substrato (glicose) consumido (g/L); rendimento celular ($Y_{X/S}$, g/g), o qual foi determinado pela razão entre a concentração celular obtida (g/L) e o substrato (glicose) consumido (g/L); produtividade volumétrica de etanol (QP, $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), a qual foi definida pela razão entre a máxima concentração de etanol obtida (g/L) e o respectivo tempo de fermentação (h); rendimento da fermentação alcoólica em relação ao rendimento teórico ($Y_{P/S}/0,51 \times 100$).

4.10 Estudo das ligninas obtidas dos processos de deslignificação alcalina do bagaço de cana-de-açúcar

Como forma de agregar valor à lignina presente no licor negro proveniente dos processos de deslignificação em escala piloto, foi proposto um estudo complementar de caracterização destas ligninas de forma a estabelecer uma metodologia que propicie uma previsão de aplicação industrial dessas ligninas. O licor negro rico em lignina, obtido das duas reações de deslignificação alcalina do bagaço de cana em reator piloto de 350 L, foi precipitado com H_2SO_4 98 % (m/v) até pH 2. Após precipitação, a lignina foi lavada para neutralização do ácido, sendo posteriormente seca em estufa de ventilação a 50°C.

4.10.1 Análise físico-química das ligninas

As ligninas obtidas foram analisadas quanto aos teores de carboidratos, lignina insolúvel e insolúvel em meio ácido e cinzas, de acordo com a metodologia analítica empregada para caracterização do bagaço de cana-de-açúcar, descrita no tópico 4.5 deste trabalho (ROCHA et al., 1997; GOUVEIA et al., 2009).

4.10.2 Análise elementar

As análises elementares foram realizadas em um aparelho da Elementar Instruments modelo vario EL CUBE. A técnica é baseada na combustão de uma amostra do material a

ser analisado para a determinação das quantidades de carbono, enxofre, hidrogênio e nitrogênio; a quantidade de oxigênio foi obtida por diferença entre a massa inicial da amostra de lignina e o somatório da quantidade dos outros elementos previamente determinados (WÖRMEYER et al., 2011).

4.10.3 Cromatografia de permeação em gel (GPC)

A lignina proveniente de diferentes pré-tratamentos pode apresentar diferenças significativas em relação a sua estrutura. As propriedades físico-químicas e de reatividade da lignina podem ser influenciadas pela sua distribuição de massa molar. Neste caso, a cromatografia de permeação em gel é uma técnica que pode ser utilizada para determinar o peso molecular dos fragmentos de lignina (MOUSAVIOUN; DOHERTY, 2010; DOHERTY; MOUSAVIOUN; FELLOWS, 2011).

A distribuição de massa molar foi determinada pela técnica de cromatografia de exclusão por tamanho utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) com 0.1% (m/m) de brometo de lítio como eluente, a um fluxo de 0,5 mL/min. A separação foi realizada em duas colunas PolarGel-M (8 µm, Varian) a 60°C. O volume de injeção foi de 100 µL com a concentração da amostra de 1 mg/mL. A detecção foi realizada com uma combinação de detectores (Jasco UV 2077 (280 nm) e índice de refração (RI-101, Shodex). Para calibração da coluna, foram utilizados os padrões polietilenoglicol e óxido de polietileno (1010 g/mol a 22450 g/mol) e glicose (180 g/mol) de acordo com metodologia descrita por Ringena et al. (2006). O pico máximo de glicose foi usado para definir um limite de integração uniforme nos cromatogramas de baixa massa molar. A curva de calibração foi baseada no sinal do detector por índice de refração, enquanto que os perfis de eluição das ligninas foram obtidos a partir do sinal do detector de UV.

4.10.4 Análise de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^{31}P

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) tem facilitado investigações sobre aspectos estruturais de macromoléculas complexas, tais como a lignina. No presente trabalho, a análise de RMN- ^{31}P foi realizada, de acordo com metodologia descrita por Granata e Argyropoulos (1995), para se obter informações sobre o teor de grupos funcionais (hidroxilas alifáticas e fenólicas, carboxila) presentes nos

fragmentos de lignina. Para isto, as amostras de lignina foram derivatizadas com 2-cloro-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxafosfolano (TMDP) utilizando colesterol (19mg/mL) como padrão interno. Os espectros de RMN-³¹P foram adquiridos em um espectrômetro de ressonância magnética nuclear Varian (modelo Mercury 400) de 400 MHz.

Os valores calculados referentes aos grupos funcionais seguem a fórmula:

$$\text{mmol de grupo funcional/g de lignina} = (C \cdot A \cdot IS \cdot P) / M \cdot L$$

onde: C = 19 mg/mL do padrão interno (IS); A = área do pico; IS = 0,2 mL; M = 388,66 g/mol (peso molecular do IS); L = massa de lignina (g); P = 0,99 (pureza do IS).

4.10.5 Análise termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica é uma das técnicas termoanalíticas onde é medida a perda de massa de uma amostra em função do tempo, ou em função da temperatura, fornecendo informações sobre o conteúdo dos componentes voláteis como solventes ou água, sobre o comportamento de decomposição e conteúdo de cinzas. As análises foram realizadas em um equipamento Mettler Toledo DSC 821^e. Para o estudo de degradação térmica da lignina foi utilizado porta-amostra de platina, razão de aquecimento de 10 °C/min, sob atmosfera de oxigênio (50 mL/min), num intervalo de temperatura ambiente a 700 °C (LEHNEN et al., 2006).

Para a determinação do ponto de transição vítrea (T_g) da lignina foi utilizado porta-amostra de alumínio. As medidas foram conduzidas em atmosfera de nitrogênio (50 mL/min) de acordo com a seguinte programação de temperatura: 1^a corrida – partindo da temperatura ambiente com aquecimento até 140 °C, com razão de aquecimento de 10 °C/min, seguido por um recozimento a 140 °C por 30 min e resfriamento até a temperatura ambiente; 2^a corrida – partindo da temperatura ambiente com aquecimento até 220 °C, com razão de aquecimento de 10 °C/min (LEHNEN et al., 2006).

O T_g foi definido como a temperatura no ponto de intersecção entre as tangentes desenhadas no ponto de inflexão da transição e na parte plana da curva antes da transição (LEHNEN et al., 2006).

4.10.6 Determinação do poder calorífico superior (PCS)

O poder calorífico superior (PCS), o qual se refere à energia liberada por massa do sólido durante a oxidação, com a presença de água líquida nos produtos da reação química (SÁNCHEZ, 2010), foi determinado por uma bomba calorimétrica (Parr 6200 Isoperibol), a qual permite medir o calor liberado pela combustão da lignina na presença de oxigênio. A decomposição das amostras de lignina foi realizada em um vaso de combustão modelo 1108, de 350 mL (SILVA, 2012).

4.10.7 Pirólise acoplada à cromatografia gasosa e espectrometria de massas (Pyr-GC/MS)

A pirólise acoplada à cromatografia gasosa e espectrometria de massas tem sido aplicada para analisar os produtos de degradação térmica da lignina. É considerada como uma alternativa rápida e fácil aos trabalhosos procedimentos de degradação química para a análise da composição de monolignóis em amostras de lignina. Esta técnica requer pequenas quantidades de amostra para a análise (< 1mg) e a mesma não precisa ser isolada dos polissacarídeos para se ter uma análise efetiva (GHAFAR; FAN, 2013).

A pirólise das amostras de lignina foi conduzida a 500°C em um sistema Py-GC/MS-FID que consiste de um microforno pirolisador Py-202iD 2020 (Frontier Laboratories Ltd.) acoplado em um sistema GC da Agilent 6890. A identificação dos produtos de degradação térmica das ligninas foi realizada pela comparação com os picos de pirogramas (cromatogramas dos produtos de decomposição por pirólise) identificados por espectrometria de massa e descritos na literatura (MEIER; FAIX, 1992; BUTLER et al., 2013).

4.10.8 Espectroscopia na região do infravermelho

A espectroscopia no infravermelho (IV) tem sido uma ferramenta analítica bastante utilizada para a caracterização química da lignina e seus derivados. Esta técnica apresenta alta sensibilidade e seletividade, alta razão sinal ruído e precisão, podendo dar informações sobre grupos químicos alterados, removidos e/ou adicionados durante os processos de pré-tratamento e deslignificação (MARABEZEI, 2009; GHAFAR; FAN, 2013).

No presente trabalho, amostras de lignina previamente secas, foram preparadas como pastilhas de KBr e compactadas a $10 - 12 \text{ kgf.cm}^{-2}$ sob pressão reduzida. Os espectros das ligninas foram obtidos na região de $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ em um espectrofotômetro marca PerkinElmer (modelo: Spectrum 400), a partir de pastilhas de KBr (1 mg de amostra para 100 mg de KBr) (GHAFAR; FAN, 2013).

4.10.9 Determinação de grupos metoxila

Esta técnica consiste na determinação do teor de metoxila (importante grupo funcional presente na estrutura da lignina), sendo utilizado o procedimento modificado de Zeisel-Vieböck-Schwappach (ZAKIS; JOYCE; BREZNY, 1994), descrito a seguir: 25-30 mg de lignina foi adicionado a um balão contendo uma mistura previamente preparada de fósforo vermelho (cerca de 0,5 g), fenol (alguns cristais), anidrido acético (1 mL) e ácido iodídrico (10 mL). Ao balão contendo a mistura reacional foi conectado um fluxo contínuo de N_2 (10 mL/min) e um condensador de refluxo, cuja extremidade superior foi ligada a um frasco de lavagem contendo 10 mL de uma solução 15 % de bromo e 10 % de acetato de sódio em ácido acético. O balão foi aquecido a 150°C com um banho de óleo e a reação se processou durante 45 min, liberando o iodeto de metila que reagiu com a mistura do frasco de lavagem. Ao final da reação, o frasco de lavagem foi retirado do sistema e o seu conteúdo transferido quantitativamente para um frasco Erlenmeyer, ao qual se adicionou 20-30 mL de água, 1 g de acetato de sódio, cerca de 2 mL de ácido fórmico (até descoloração da solução) e 1 g de iodeto de potássio. O Erlenmeyer foi mantido em ambiente escuro por 5 min. Após esse tempo, a mistura foi titulada com uma solução de tiosulfato de sódio 0,5 M previamente padronizada, usando-se amido como indicador. Uma vez que seis átomos de iodo são liberados para cada grupo alcóxi, o teor deste componente pode ser determinado quantitativamente (GONÇALVES, 1995).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar em reator piloto

Após as reações de pré-tratamento do bagaço, uma com H_3PO_4 1,5 % (m/v) e outra utilizando H_2SO_4 1,0 % (m/v), ambos os materiais obtidos foram lavados até pH neutro para remoção dos resíduos de ácido, obtendo-se um rendimento em massa de 84 % para a reação com o ácido fosfórico e 68 % para o processo utilizando o ácido sulfúrico.

Analizando o material pré-tratado (celulignina) (figura 5.1) obtido pelo processo com ácido fosfórico, verifica-se que o mesmo ainda apresentou aspecto visual bastante fibroso (B) quando comparado com o bagaço de cana “in natura” (A) e também em relação ao bagaço pré-tratado com ácido sulfúrico diluído (C), o qual ficou mais desagregado.

Figura 5.1 – Foto do bagaço de cana “in natura” (A), pré-tratado com H_3PO_4 1,5 % (m/v) (B) e pré-tratado com H_2SO_4 1,0 % (m/v) (C).

Fonte: Arquivo pessoal.

Os resultados de caracterização química do bagaço de cana “in natura”, reportados na tabela 5.1, a seguir, mostraram que este material apresenta aproximadamente 42,6 % de celulose, 26,2 % de hemicelulose, 22,5 % de lignina, 5,3 % de extrativos e 4,3 % de cinzas, sendo estes valores próximos aos encontrados na literatura (ROCHA et al., 2012a). Embora a composição química do bagaço dependa de uma forma geral, da variedade e maturidade da cana-de-açúcar, bem como dos métodos de colheita utilizados, não há diferenças significativas em relação à estrutura química, quando comparadas várias amostras de bagaço de cana de diferentes regiões (ROCHA et al., 2012a). Observa-se também pela tabela 5.1 que a quantidade de celulose e lignina do bagaço de cana pré-tratado, tanto por ácido fosfórico diluído quanto pelo ácido sulfúrico, aumentou em relação ao bagaço de cana “in natura”, indicando um aumento proporcional destas frações devido à solubilização da fração hemicelulósica.

Devido à hemicelulose apresentar 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 anidroaçúcar), faz com que esta fração se torne muito mais susceptível à hidrólise no pré-tratamento ácido do que a fração celulósica (FENGEL; WEGENER, 1989; PITARELO, 2007; QIN, 2010; CHANDEL et al., 2012a). Além disso, o pré-tratamento com ácido diluído tem a vantagem de não apenas solubilizar a hemicelulose, mas também de convertê-la em açúcares fermentáveis de baixo peso molecular (monômeros de xilose), o que elimina ou reduz a necessidade de se utilizar hemicelulases nos complexos enzimáticos durante a etapa de hidrólise enzimática (SAHA; BOTHAST, 1999; SAHA et al. 2005; BLANCH; SIMMONS; KLEIN-MARCUSCHAMER, 2011).

Tabela 5.1 - Composição química do bagaço de cana “in natura”, e após os pré-tratamentos com H_3PO_4 1,5 % (m/v) e H_2SO_4 1,0 % (m/v), juntamente com o balanço de material após as etapas de processamento desta biomassa.

Composição química do bagaço de cana	“in natura” (%)	Pré-tratado H_3PO_4 (%)	Corrigido pelo rendimento do pré-tratamento (%)	Pré-tratado H_2SO_4 (%)	Corrigido pelo rendimento do pré-tratamento (%)
Rendimento	-	-	84%	-	68%
Celulose	42,6 ± 0,2	48,5 ± 0,1	40,7 ± 0,2	53,3 ± 0,1	36,2 ± 0,2
Hemicelulose	26,2 ± 0,5	17,0 ± 0,1	14,3 ± 0,3	9,4 ± 0,3	6,4 ± 0,2
Lignina	22,5 ± 0,3	28,8 ± 0,1	24,2 ± 0,2	33,6 ± 0,3	22,8 ± 0,1
Cinzas	4,3 ± 0,1	3,8 ± 0,0	3,2 ± 0,1	3,0 ± 0,0	2,0 ± 0,1
Extrativos	5,3 ± 0,5	-	-	-	-
Total	100,9 ± 1,6	98,1 ± 0,3	-	99,3 ± 0,7	-

Memória de cálculo (pré-tratamento: $48,5 \times 0,84 = 40,7$)

Comparando-se os dois processos de pré-tratamento utilizados para o bagaço de cana nota-se que o processo utilizando H_2SO_4 1,0 % (m/v) a 120 °C por 20 min fez com que a maior parte da fração hemicelulósica fosse hidrolisada em açúcares (xilose, arabinose, entre outros), chegando a aproximadamente 75 % de solubilização. Já o processo utilizando ácido fosfórico proporcionou uma solubilização de 45,5 % da fração hemicelulósica mantendo-se ainda grande quantidade de hemicelulose sem hidrolisar (tabela 5.1 e figura 5.2).

Figura 5.2 – Solubilização dos componentes do bagaço de cana-de-açúcar após as etapas de pré-tratamento com H_3PO_4 1,5 % (m/v) e H_2SO_4 1,0 % (m/v).

Fonte: Arquivo pessoal.

Gámez et al. (2006) realizaram estudos de hidrólise de bagaço de cana com H_3PO_4 4 %, em autoclave, a 122 °C, por 300 min, conseguindo mais de 55 % dos sólidos solúveis na forma de açúcares, mostrando que solubilizações maiores de hemicelulose empregando ácido fosfórico diluído podem ser alcançadas com tempos maiores de reação. Por outro lado, Vasconcelos et al. (2013) conseguiram uma solubilização de aproximadamente 96 % da fração hemicelulósica de bagaço de cana pré-tratado em reator de 20 L com H_3PO_4 0,2 % (m/v), 8 minutos de reação, porém empregando 186 °C.

Gomez-Rueda (2010) comparou a utilização de H_3PO_4 0,5 % (m/v) e H_2SO_4 0,5 % (m/v) como agente catalisador na etapa de pré-tratamento para a remoção de hemicelulose de bagaço de cana. Os resultados mostraram que tanto o ácido fosfórico quanto o ácido sulfúrico podem promover elevadas solubilizações de hemicelulose. Porém, foi necessário trabalhar com maior temperatura (140 °C) e tempo (120 min) empregando H_3PO_4 0,5 % (m/v) do que para o H_2SO_4 0,5 % (m/v), o qual se utilizou 100 °C e 15 min. Em geral, condições de pré-tratamento mais severas proporcionam maior solubilização da fração hemicelulósica, porém conduzem à maior produção de compostos tóxicos à fermentação do hidrolisado hemicelulósico, tais como o ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural e aromáticos, provenientes de fragmentos da lignina e dos extrativos. Analisando a figura 5.2, além da remoção da hemicelulose, ambos os pré-tratamentos proporcionaram solubilização de uma pequena fração da celulose, sendo esta mais pronunciada após a reação com ácido sulfúrico diluído (14,9 %), o que pode ser explicado pelo fato do ácido sulfúrico ser mais forte que o fosfórico facilitando a hidrólise de grande parte de celulose amorfa ou de baixa cristalinidade (HODGE et al., 2008).

Estudos mostram que o uso de ácidos diluídos como agentes catalíticos no pré-tratamento do bagaço de cana também provocam a solubilização de uma pequena parte da lignina, além de redistribuir a estrutura química da lignina remanescente no bagaço (GUO et al., 2009; GOMEZ-RUEDA, 2010). Entretanto, no presente trabalho verificou-se que ambos os pré-tratamentos empregados não promoveram solubilização da lignina. Provavelmente o pré-tratamento ácido utilizou proporcionou a formação de reações de condensação na estrutura molecular da lignina, entre seus grupos fenólicos e fragmentos fenólicos de outros compostos presentes na biomassa, oriundos dos extrativos (YANG; WYMAN, 2004; CHEN; HAN; CHU, 2008; OLIVEIRA, 2010), fazendo com que a concentração destas macromoléculas aumentasse ou permanecesse inalteradas no bagaço de cana pré-tratado.

Durante o pré-tratamento ácido reações quase que simultâneas de despolimerização e repolimerização da lignina ocorrem devido à acidificação do hidrolisado. Estes dois tipos de reação são originados a partir de um intermediário comum, o íon carbônio (C^+) o qual é formado a partir da estrutura do álcool benzílico da lignina. Este intermediário pode reagir promovendo a clivagem das ligações β -O-4 (despolimerização) e ou reagir com fragmentos solubilizados de lignina ou furfural e 5-hidroximetilfurfural, formando estruturas condensadas mantidas por ligações do tipo C-C (repolimerização) (LI; HENRIKSSON; GELLERSTEDT, 2007; BELGACEM; GANDINI, 2008; LI; GELLERSTEDT; TOVEN, 2008). Alguns estudos propõem que, em processos de pré-tratamento ácido diluído, seria mais vantajoso a utilização de um processo de pré-tratamento em fluxo contínuo onde os fragmentos de lignina solubilizados no pré-tratamento poderiam ser removidos do reator antes que pudessem reagir e condensar na superfície da biomassa, resultando em uma quantidade maior de lignina removida (LIU; WYMAN, 2003). Este fato coloca em discussão a necessidade de implementação de um processo de deslignificação, já que tanto a hemicelulose quanto a lignina presentes no material formam uma camada protetora ao redor da celulose, reduzindo a eficiência do ataque enzimático (ÖHGREN et al., 2007; ROCHA et al., 2013).

5.2 Deslignificação alcalina do bagaço de cana-de-açúcar em reator de bancada

5.2.1 Deslignificação do bagaço de cana pré-tratado com ácido fosfórico

O processo de deslignificação alcalina foi realizado de acordo com o planejamento fatorial proposto no item 4.3.1 deste trabalho. A tabela 5.2 apresenta valores de

composição química para o bagaço deslignificado após o pré-tratamento com ácido fosfórico.

Tabela 5.2 - Composição do bagaço de cana pré-tratado com ácido fosfórico e deslignificado

Ensaio	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Cinzas	Total (%)
1 80°C, 30 min, NaOH 0,5% (m/v), S/L 1:5	53,6 ± 0,2	13,4 ± 0,1	29,9 ± 0,1	1,2 ± 0,0	98,1 ± 0,4
2 120°C, 30 min, NaOH 0,5% (m/v), S/L 1:5	57,1 ± 0,6	14,5 ± 0,1	24,7 ± 0,3	1,0 ± 0,0	97,3 ± 1,0
3 80°C, 90 min, NaOH 0,5% (m/v), S/L 1:5	55,8 ± 0,7	14,2 ± 0,1	26,6 ± 0,1	1,1 ± 0,0	97,7 ± 0,9
4 120°C, 90 min, NaOH 0,5% (m/v), S/L 1:5	55,7 ± 0,0	11,8 ± 0,1	28,3 ± 0,1	2,1 ± 0,0	97,9 ± 0,2
5 80°C, 30 min, NaOH 1,5% (m/v), S/L 1:5	67,3 ± 0,2	12,6 ± 0,1	17,0 ± 0,2	2,1 ± 0,1	99,0 ± 0,6
6 120°C, 30 min, NaOH 1,5% (m/v), S/L 1:5	60,1 ± 0,3	13,2 ± 0,1	22,6 ± 0,1	2,6 ± 0,0	98,5 ± 0,5
7 80°C, 90 min, NaOH 1,5% (m/v), S/L 1:5	65,5 ± 0,1	10,0 ± 0,0	23,3 ± 0,1	1,0 ± 0,0	99,8 ± 0,2
8 120°C, 90 min, NaOH 1,5% (m/v), S/L 1:5	67,1 ± 0,1	9,5 ± 0,2	20,0 ± 0,1	2,9 ± 0,0	99,5 ± 0,4
9 80°C, 30 min, NaOH 0,5% (m/v), S/L 1:15	67,2 ± 0,3	11,9 ± 0,1	15,5 ± 0,2	2,9 ± 0,1	97,5 ± 0,7
10 120°C, 30 min, NaOH 0,5% (m/v), S/L 1:15	65,9 ± 0,1	10,6 ± 0,1	17,9 ± 0,1	3,0 ± 0,0	97,4 ± 0,3
11 80°C, 90 min, NaOH 0,5% (m/v), S/L 1:15	68,3 ± 0,2	11,4 ± 0,1	17,1 ± 0,2	2,0 ± 0,1	98,8 ± 0,6
12 120°C, 90 min, NaOH 0,5% (m/v), S/L 1:15	62,8 ± 0,2	13,4 ± 0,0	20,9 ± 0,0	1,8 ± 0,0	98,9 ± 0,2
13 80°C, 30 min, NaOH 1,5% (m/v), S/L 1:15	72,7 ± 0,7	9,5 ± 0,2	11,8 ± 0,2	3,5 ± 0,0	97,5 ± 1,1
14 120°C, 30 min, NaOH 1,5% (m/v), S/L 1:15	78,7 ± 0,2	7,4 ± 0,1	9,4 ± 0,3	2,7 ± 0,0	98,2 ± 0,6
15 80°C, 90 min, NaOH 1,5% (m/v), S/L 1:15	77,2 ± 0,1	7,8 ± 0,1	10,9 ± 0,2	2,7 ± 0,1	98,6 ± 0,5
16 120°C, 90 min, NaOH 1,5% (m/v), S/L 1:15	78,3 ± 0,2	7,5 ± 0,1	9,2 ± 0,3	3,3 ± 0,1	98,3 ± 0,7
100°C, 60 min, 17	74,4 ± 0,1	8,6 ± 0,3	12,7 ± 0,1	1,9 ± 0,1	97,6 ± 0,6
NaOH 1,0% (m/v), S/L 18	71,7 ± 0,0	11,1 ± 0,1	15,6 ± 0,2	0,7 ± 0,0	99,1 ± 0,3
1:10 19	73,6 ± 0,1	9,8 ± 0,2	14,8 ± 0,1	1,3 ± 0,1	99,5 ± 0,5

Já a tabela 5.3, apresenta os valores de composição do bagaço deslignificado, porém corrigidos pelos rendimentos das etapas de pré-tratamento e deslignificação alcalina. Dessa forma, é possível comparar o bagaço de cana após o pré-tratamento/deslignificação com o bagaço “in natura” em relação aos componentes macromoleculares que foram removidos e os que estão ainda presentes na estrutura química.

Tabela 5.3 – Valores de composição química corrigidos pelos rendimentos do pré-tratamento com ácido fosfórico/deslignificação alcalina e comparados com o bagaço de cana “in natura”.

Ensaio	Rendimento da etapa de deslignificação	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Cinzas
1	89,9%	40,3 ± 0,2	10,1 ± 0,1	22,6 ± 0,1	0,9 ± 0,0
2	97,9%	46,9 ± 0,6	12,0 ± 0,1	20,3 ± 0,3	0,8 ± 0,0
3	94,7%	44,4 ± 0,7	11,3 ± 0,1	21,2 ± 0,1	0,9 ± 0,0
4	75,5%	35,3 ± 0,0	7,5 ± 0,1	17,9 ± 0,1	1,3 ± 0,0
5	75,1%	42,5 ± 0,2	7,9 ± 0,1	10,7 ± 0,2	1,3 ± 0,1
6	77,2%	38,9 ± 0,3	8,6 ± 0,1	14,7 ± 0,1	1,7 ± 0,0
7	75,1%	41,3 ± 0,1	6,3 ± 0,0	14,7 ± 0,1	0,6 ± 0,0
8	78,9%	44,5 ± 0,1	6,3 ± 0,2	13,3 ± 0,1	1,9 ± 0,0
9	82,9%	46,8 ± 0,3	8,3 ± 0,1	10,8 ± 0,2	2,0 ± 0,1
10	73,7%	40,8 ± 0,1	6,6 ± 0,1	11,1 ± 0,1	1,9 ± 0,0
11	72,9%	41,8 ± 0,2	6,9 ± 0,1	10,5 ± 0,2	1,2 ± 0,1
12	70,3%	37,1 ± 0,2	7,9 ± 0,0	12,3 ± 0,0	1,1 ± 0,0
13	65,5%	39,9 ± 0,7	5,2 ± 0,2	6,5 ± 0,2	1,9 ± 0,0
14	57,2%	37,8 ± 0,2	3,6 ± 0,1	4,5 ± 0,3	1,3 ± 0,0
15	54,2%	35,1 ± 0,1	3,6 ± 0,1	4,9 ± 0,2	1,2 ± 0,1
16	53,4%	35,1 ± 0,2	3,4 ± 0,1	4,1 ± 0,3	1,5 ± 0,1
17	67,6%	42,2 ± 0,1	4,9 ± 0,3	7,2 ± 0,1	1,1 ± 0,1
18	68,6%	41,3 ± 0,0	6,4 ± 0,1	8,9 ± 0,2	0,4 ± 0,0
19	73,3%	45,3 ± 0,1	6,0 ± 0,2	9,1 ± 0,1	0,8 ± 0,1
Bagaço de cana “in natura”		42,6 ± 0,2	26,2 ± 0,5	22,5 ± 0,3	4,3 ± 0,1

Exemplo de Memória de cálculo – Ensaio 1 (valor da composição química corrigido pelos rendimentos do pré-tratamento (0,84) e deslignificação (0,899): $53,6 \times 0,84 \times 0,899 = 40,3$)

Após as reações de deslignificação alcalina verificou-se um aumento na solubilização da hemicelulose e lignina principalmente nas condições em que foram empregadas maiores concentrações de NaOH e maiores proporções de líquido em relação à massa de bagaço de cana empregada (tabelas 5.3 e 5.4).

Tabela 5.4 – Solubilização total dos componentes do bagaço de cana após o pré-tratamento com ácido fosfórico diluído e deslignificação alcalina

Ensaio	Celulose	Hemicelulose	Lignina
1	4,9%	61,4%	0
2	0	54,5%	9,7%
3	0	56,9%	5,9%
4	17,1%	71,4%	20,2%
5	0,3%	69,7%	52,3%
6	8,5%	67,3%	34,9%
7	3,0%	75,9%	34,7%
8	0	75,9%	41,1%
9	0	68,4%	52,0%
10	4,2%	74,5%	50,7%
11	1,8%	73,4%	53,5%
12	12,9%	69,8%	45,1%
13	6,1%	80,1%	71,1%
14	11,2%	86,4%	79,9%
15	17,5%	86,4%	77,9%
16	17,6%	87,2%	81,7%
17	0,8%	81,4%	67,9%
18	3,0%	75,6%	60,0%
19	0	76,9%	59,6%

Elevadas concentrações de álcali, juntamente com altos tempos de reação e baixas relações sólido-líquido tendem a proporcionar grande solubilização da lignina. Apesar disto, uma deslignificação completa da biomassa é dificultada devido a fatores como localização da lignina na parede celular, a hidrofobicidade, rigidez física, fortes ligações do tipo C-O-C, C-C, e tendência de recondensação.

A fragmentação e dissolução alcalina da lignina depende principalmente da clivagem de dois tipos de ligações aril éter: $C_{\text{alifático}}-O-C_{\text{aromático}}$ e $C_{\text{aromático}}-O-C_{\text{aromático}}$ (ordenada do menos ao mais estável), as quais frequentemente correspondem às ligações α - e β -aril éter (Figura 5.3) (SÁNCHEZ; SIERRA; ALMÉCIGA-DÍAZ, 2011).

Figura 5.3 - Formação de uma estrutura metídeo-quinona pela clivagem alcalina de uma ligação α -aril éter em uma unidade fenólica de lignina (Linha pontilhada: possível ligação β -C em outra unidade).

Fonte: adaptado de FENGEL; WEGENER, 1989.

Embora a presença de lignina na biomassa seja uma das dificuldades mais notórias para o ataque enzimático à estrutura da celulose, não é necessária uma deslignificação completa da biomassa para que ela tenha alta digestibilidade (GOMEZ-RUEDA, 2010; SIQUEIRA et al., 2013).

5.2.1.1 - Estudo da influência das variáveis: temperatura, tempo, concentração de NaOH e relação sólido-líquido, na deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido fosfórico e na conversão enzimática da polpa celulósica obtida

A tabela 5.5 apresenta a matriz de planejamento fatorial 2^4 com 3 repetições no ponto central. Encontram-se os fatores das variáveis quantitativas, temperatura (T), tempo (t), concentração de NaOH (C) e relação sólido-líquido (R) contendo as condições experimentais na forma de valores reais, tendo a remoção de lignina do bagaço de cana e a conversão enzimática da celulose como fatores respostas.

Tabela 5.5 - Matriz do planejamento fatorial 2^4 para a deslignificação alcalina do bagaço de cana pré-tratado com ácido fosfórico contendo as variáveis repostas: conversão enzimática da fração celulósica e porcentagem em massa de lignina removida.

Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (min)	NaOH (% m/v)	Relação Sólido-líquido	*Total de Lignina Removido (% massa)	Conversão Enzimática (% massa)
01	80	30	0,5	1:5	0	18,8 ± 0,4
02	120	30	0,5	1:5	9,7	30,0 ± 1,2
03	80	90	0,5	1:5	5,9	26,0 ± 0,6
04	120	90	0,5	1:5	20,2	31,6 ± 0,7
05	80	30	1,5	1:5	52,3	44,4 ± 1,2
06	120	30	1,5	1:5	34,9	48,4 ± 0,3
07	80	90	1,5	1:5	34,7	42,7 ± 0,4
08	120	90	1,5	1:5	41,1	46,6 ± 0,7
09	80	30	0,5	1:15	52,0	35,6 ± 0,2
10	120	30	0,5	1:15	50,7	46,6 ± 1,0
11	80	90	0,5	1:15	53,5	39,8 ± 0,2
12	120	90	0,5	1:15	45,1	38,5 ± 0,4
13	80	30	1,5	1:15	71,1	56,5 ± 0,5
14	120	30	1,5	1:15	79,9	81,1 ± 0,7
15	80	90	1,5	1:15	77,9	60,8 ± 0,2
16	120	90	1,5	1:15	81,7	65,1 ± 0,5
17	100	60	1,0	1:10	67,9	56,4 ± 0,1
18	100	60	1,0	1:10	60,0	50,4 ± 0,6
19	100	60	1,0	1:10	59,6	52,9 ± 0,3

*Memória de cálculo: Total de lignina removido/ensaio 16: $(1 - 0,84 \times 0,534 (9,2/22,5)) \times 100 = 81,7 \%$

* Variável remoção de lignina

O diagrama de Pareto foi usado para determinar o efeito das variáveis e suas interações sobre a remoção de lignina do bagaço de cana pré-tratado com ácido fosfórico, de acordo com o planejamento fatorial 2^4 completo com 3 repetições no ponto central, permitindo a identificação dos efeitos de interação de acordo com sua importância. Em conjunto com o diagrama de Pareto, a análise de Variância (ANOVA) foi usada para determinar a significância estatística de cada uma das variáveis e suas interações sobre a remoção de lignina do bagaço de cana.

A interpretação dos resultados foi simplificada com a remoção das variáveis e suas interações não significativas no nível de 90 % de confiança ($p \leq 0,1$). O diagrama de Pareto apresenta os valores absolutos dos efeitos dos fatores que são importantes no delineamento de experimentos para otimização. Ele apresenta uma linha de referência para indicar que os fatores que se estendem além desta linha são potencialmente importantes. Em relação à remoção de lignina, somente os fatores principais concentração de NaOH e relação sólido-líquido, juntamente com a interação temperatura, concentração de NaOH e relação sólido-líquido apresentaram significância a um nível de 90 % de confiança (Figura 5.4).

Figura 5.4 - Diagrama de Pareto com os efeitos estimados das variáveis significativas no nível de 90 % de confiança para a remoção de lignina do bagaço de cana pré-tratado com ácido fosfórico de acordo com o planejamento fatorial completo 2^4 com 3 repetições no ponto central.

Fonte: Arquivo pessoal.

A tabela 5.6 apresenta os valores de p-valor, coeficientes do modelo e análise dos efeitos e interações para a variável resposta remoção de lignina, considerando 90 % de confiança.

Tabela 5.6 – Valores dos coeficientes do modelo e de p-valor para as variáveis independentes e suas interações, considerando uma significância de 90 %, para a variável resposta remoção de lignina do bagaço de cana.

Fator	Coefficiente	p- valor
Média	47,27368	0,000516
[NaOH] (3)	14,78125	0,006209
Relação Sólido-líquido (4)	19,56875	0,003557
Temperatura (1)*3*4	3,58125	0,092237

Analisando a Figura 5.4 e a tabela 5.6 verifica-se que nem todas as variáveis e os efeitos de interação entre elas foram significativos estatisticamente a 90 % de confiança. Logo, estes efeitos e as interações foram eliminados do modelo e considerados erros aleatórios experimentais.

Com os valores dos coeficientes de regressão estatisticamente significativos pode-se estimar a Equação 5.1 que representa o modelo linear. Os valores de temperatura (T), [NaOH] (C) e relação sólido-líquido (R) apresentam na equação valores codificados.

$$\text{Remoção de lignina (\% m/m)} = 47,27368 + 14,78125 C + 19,56875 R + 3,58125 T*C*R$$

(Eq.5.1)

Para determinar se o modelo era estatisticamente significativo fez-se necessário fazer a análise da variância (ANOVA) como mostra a Tabela 5.7.

Tabela 5.7 - Análise dos efeitos principais no planejamento fatorial 2⁴, utilizando o erro puro para a remoção de lignina do bagaço de cana.

Fonte de variação	Soma Quadrática (SS)	Graus de Liberdade	Média Quadrática (MS)	Teste F
Regressão (R)	10150,13	14	725,01	3,27 ^a
Resíduos (r)	888,03	4	222,01	
Falta de ajuste (faj)	844,21	2	422,11	19,27 ^b
Erro puro (ep)	43,82	2	21,91	
Total (T)	11038,16	18		
Valor do F _{tabelado}				F _{14,4} ^a = 3,88 F _{2,2} ^b = 9,0

F^a = Teste F para determinação da significância estatística da regressão (MS_R/MS_r)

F^b = Teste F para falta de ajuste (MS_{faj}/MS_{ep})

De acordo com a tabela 5.7, o valor de $F_{\text{calculado}}$ (3,27) apresentou-se menor que o obtido pelo F_{tabelado} (3,88), não satisfazendo a condição de significância estatística da regressão. Já no teste F para a falta de ajuste, o valor de $F_{\text{calculado}}$ (19,27) apresentou-se maior que o F_{tabelado} (9,0), indicando que os dados não se ajustam à regressão linear proposta.

Com estes resultados, a superfície de resposta (Figura 5.5) não pode ser utilizada para fins preditivos, mas somente como indicativo do comportamento das variáveis.

Figura 5.5 - Superfície de resposta para a remoção de lignina em função da relação sólido-líquido e concentração de NaOH (% m/v) empregados no processo de deslignificação do bagaço pré-tratado com ácido fosfórico. Tempo fixo em 60 min.

Fonte: Arquivo pessoal.

A partir dos resultados apresentados verifica-se que os fatores relação sólido-líquido e concentração de NaOH exercem uma influência significativa na remoção de lignina. Nos experimentos em que foram empregados relação sólido-líquido 1:15 e NaOH 1,5 % (m/v) foram obtidas remoções de lignina entre 70 e 80%, comparando-se com o teor de lignina presente no bagaço de cana “in natura”. Estudos realizados por Silva (1995), referentes à deslignificação de bagaço de cana, mostram que para soluções com concentração de NaOH entre 1 e 2 % (m/v) a deslignificação aumenta com a diminuição da relação sólido-líquido.

O efeito destes dois fatores em interação com altas temperaturas de trabalho tendem a potencializar a remoção de lignina. De acordo com os resultados apresentados anteriormente pela tabela 5.5, a interação destes três fatores em nível alto possibilitou uma remoção de lignina próxima a 80 % em relação ao bagaço “in natura”. Outros trabalhos relacionados à deslignificação alcalina de materiais lignocelulósicos atribuem a porcentagem de solubilização de lignina aos fatores: temperatura, concentração de álcali e tempo de residência (MCINTOSH; VANCOV, 2011). Já no presente trabalho, o fator tempo não apresentou efeito significativo, uma vez que o mesmo, trabalhando em nível baixo (30 minutos) ou nível alto (90 minutos), proporcionou solubilizações de lignina próximas a 80 % (tabela 5.5) empregando-se 120 °C, NaOH 1,5 % (m/v) e relação sólido-líquido 1:15. Uma hipótese para este comportamento é de que a deslignificação alcalina do bagaço de cana alcança uma determinada extensão e mesmo empregando tempos maiores de reação, é dificultada esta remoção.

Este comportamento também foi observado por Silva (1995), onde foi verificado que as reações de deslignificação de bagaço de cana pré-tratado são praticamente concluídas em um curto período de tempo, independente da concentração de NaOH. Entretanto, em soluções alcalinas mais concentradas, a velocidade de intumescimento das fibras celulósicas de bagaço de cana é acelerada, facilitando a difusão dos íons hidroxila, contribuindo para o aumento da velocidade de deslignificação.

*** Variável conversão enzimática**

O diagrama de Pareto apresenta os valores absolutos dos efeitos dos fatores que são importantes no delineamento de experimentos para otimização. Em relação à conversão enzimática da polpa celulósica bruta de bagaço de cana pré-tratado com ácido fosfórico, somente os fatores principais concentração de NaOH, relação sólido-líquido, temperatura, juntamente com a interação temperatura e tempo, apresentaram significância a um nível de 90 % de confiança (Figura 5.6).

A seguir, é apresentada também a tabela 5.8 com os valores de p-valor, coeficientes do modelo e análise dos efeitos e interações para a variável resposta conversão enzimática, considerando 90 % de confiança.

Figura 5.6 - Diagrama de Pareto com os efeitos estimados das variáveis significativas no nível de 90 % de confiança para a conversão enzimática da polpa bruta de bagaço de cana pré-tratado com ácido fosfórico de acordo com o planejamento fatorial completo 2^4 com 3 repetições no ponto central.

Estimativa dos efeitos (valor absoluto)

Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 5.8 – Valores dos coeficientes do modelo e de p-valor para as variáveis independentes e suas interações, considerando uma significância de 90 %, para a variável resposta conversão enzimática da fração celulósica de bagaço de cana.

Fator	Coefficiente	p- valor
Média	45,90526	0,000227
Temperatura (1)	3,95625	0,034410
[NaOH] (3)	11,16875	0,004520
Relação Sólido-Líquido (4)	8,46875	0,007823
(1)* Tempo (2)	-2,39375	0,086425

Com os valores dos coeficientes de regressão estatisticamente significativos pode-se estimar a Equação 5.2 que representa o modelo linear. Vale ressaltar que os valores de temperatura (T), tempo (t), [NaOH] (C) e relação sólido-líquido (R) apresentam na equação valores codificados.

$$\text{Conversão enzimática (\% m/m)} = 45,90526 + 3,95625T + 11,16875C + 8,46875R - 2,39375T * t \text{ (Eq.5.2)}$$

Para determinar se o modelo era estatisticamente significativo fez-se necessário fazer a análise da variância (ANOVA) como mostra a Tabela 5.9.

Tabela 5.9 - Análise dos efeitos principais no planejamento fatorial 2⁴, utilizando o erro puro para a conversão enzimática da fração celulósica de bagaço de cana.

Fonte de variação	Soma Quadrática (SS)	Graus de Liberdade	Média Quadrática (MS)	Teste F
Regressão (R)	3706,183	14	264,73	4,79 ^a
Resíduos (r)	220,866	4	55,22	
Falta de ajuste (faj)	202,699	2	101,35	11,16 ^b
Erro puro (ep)	18,167	2	9,08	
Total (T)	3927,049	18		
Valor do F _{tabelado}				F _{14,4} ^a = 3,88 F _{2,2} ^b = 9,0

F^a = Teste F para determinação da significância estatística da regressão (MS_R/MS_r)

F^b = Teste F para falta de ajuste (MS_{faj}/MS_{ep})

De acordo com a tabela 5.9, o valor de F_{calculado} (4,79) apresentou-se maior que o obtido pelo F_{tabelado} (3,88) satisfazendo a condição da significância estatística da regressão. Porém, no teste F para a falta de ajuste, o valor de F_{calculado} (11,16) apresentou-se maior que o F_{tabelado} (9,0), indicando falta de ajuste com evidências de que os dados não se ajustam à regressão linear proposta. A partir dessas premissas, a superfície de resposta (Figura 5.7) não pode ser utilizada para fins preditivos, mas somente como indicativo do comportamento das variáveis.

Estudos têm mostrado que o emprego de álcali em soluções aquosas conduz ao intumescimento da parede celular do material lignocelulósico, contribuindo para o aumento da hidrólise enzimática, uma vez que a matriz lignocelulósica torna-se mais acessível às enzimas (HAQUE et al., 2013).

O fato de se trabalhar com altas concentrações de álcali (NaOH 1,5 % m/v), juntamente com relação sólido-líquido 1:15 (nível alto) e altas temperaturas (120 °C) fez com que grande parte da lignina presente no bagaço de cana fosse removida. Isso refletiu em um aumento considerável na conversão enzimática das polpas celulósicas obtidas destas condições de deslignificação, conforme mostrado na tabela 5.5 pelo ensaio 14. Foi observado também que um maior tempo de reação (90 min) juntamente com os outros fatores em nível alto (ensaio 16), não contribuiu para uma conversão enzimática tão alta quanto no ensaio 14. Este fato poderia ser explicado por reações de condensação de lignina que aconteceram no processo de deslignificação, proporcionando uma redistribuição dessa lignina modificada sobre as fibras celulósicas e com isso afetando a acessibilidade das enzimas celulolíticas ao substrato. As reações de condensação da lignina acontecem com maior intensidade quando são combinados altos tempos residência com elevadas

temperaturas de pré-tratamento e/ou deslignificação (RAMOS, 2003; DOHERTY; RAINEY, 2006).

Figura 5.7 - Superfície de resposta para a conversão enzimática da celulose em função da relação sólido-líquido e concentração de NaOH (% m/v) no processo de deslignificação do bagaço pré-tratado com ácido fosfórico. Tempo fixo em 60 min.

Fonte: Arquivo pessoal.

5.2.2 Deslignificação do bagaço de cana pré-tratado com ácido sulfúrico

O processo de deslignificação alcalina do bagaço proveniente do pré-tratamento com ácido sulfúrico também foi realizado de acordo com o planejamento fatorial proposto no item 4.3.1 deste trabalho. Na tabela 5.10 são apresentados os valores de composição química para as polpas celulósicas obtidas dos 19 ensaios realizados.

Na sequência, é apresentada a tabela 5.11 com os valores de composição química do bagaço já corrigidos pelos rendimentos do pré-tratamento e da deslignificação. Desta forma, pode-se ter um comparativo, com o bagaço de cana “in natura”, do quanto de cada componente macromolecular ainda está contido no bagaço após o seu pré-tratamento e deslignificação (tabela 5.11) e o quanto foi removido ao longo destes processos (tabela 5.12).

Tabela 5.10 - Composição química do bagaço de cana deslignificado após pré-tratamento com ácido sulfúrico.

Ensaios	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Cinzas	Total
1 80°C, 30 min, NaOH 0,5% (m/v), S/L 1:5	60,2 ± 0,1	9,6 ± 0,1	26,4 ± 0,2	2,3 ± 0,1	98,5 ± 0,5
2 120°C, 30 min, NaOH 0,5% (m/v), S/L 1:5	57,4 ± 0,2	10,9 ± 0,1	28,1 ± 0,2	3,5 ± 0,0	99,9 ± 0,5
3 80°C, 90 min, NaOH 0,5% (m/v), S/L 1:5	57,3 ± 0,2	10,4 ± 0,2	27,3 ± 0,1	3,5 ± 0,0	98,5 ± 0,5
4 120°C, 90 min, NaOH 0,5% (m/v), S/L 1:5	59,0 ± 0,2	7,6 ± 0,3	29,3 ± 0,2	3,5 ± 0,1	99,4 ± 0,8
5 80°C, 30 min, NaOH 1,5% (m/v), S/L 1:5	66,9 ± 0,3	7,8 ± 0,2	20,2 ± 0,1	3,5 ± 0,1	98,4 ± 0,7
6 120°C, 30 min, NaOH 1,5% (m/v), S/L 1:5	66,7 ± 0,1	8,7 ± 0,2	19,6 ± 0,2	3,5 ± 0,1	98,5 ± 0,6
7 80°C, 90 min, NaOH 1,5% (m/v), S/L 1:5	67,3 ± 0,2	9,6 ± 0,1	19,1 ± 0,1	2,8 ± 0,0	98,8 ± 0,4
8 120°C, 90 min, NaOH 1,5% (m/v), S/L 1:5	67,9 ± 0,2	4,3 ± 0,2	22,5 ± 0,3	2,8 ± 0,1	97,5 ± 0,8
9 80°C, 30 min, NaOH 0,5% (m/v), S/L 1:15	68,4 ± 0,1	7,8 ± 0,3	19,6 ± 0,2	3,0 ± 0,1	98,8 ± 0,7
10 120°C, 30 min, NaOH 0,5% (m/v), S/L 1:15	69,6 ± 0,2	7,9 ± 0,3	16,7 ± 0,3	3,5 ± 0,0	97,7 ± 0,8
11 80°C, 90 min, NaOH 0,5% (m/v), S/L 1:15	70,1 ± 0,3	6,2 ± 0,1	19,7 ± 0,1	1,7 ± 0,1	97,7 ± 0,6
12 120°C, 90 min, NaOH 0,5% (m/v), S/L 1:15	74,4 ± 0,3	5,9 ± 0,2	19,4 ± 0,2	2,1 ± 0,1	101,8 ± 0,8
13 80°C, 30 min, NaOH 1,5% (m/v), S/L 1:15	75,9 ± 0,2	4,3 ± 0,1	16,3 ± 0,2	2,1 ± 0,1	98,6 ± 0,6
14 120°C, 30 min, NaOH 1,5% (m/v), S/L 1:15	74,0 ± 0,1	8,6 ± 0,1	11,3 ± 0,2	3,2 ± 0,1	97,1 ± 0,5
15 80°C, 90 min, NaOH 1,5% (m/v), S/L 1:15	77,7 ± 0,2	7,2 ± 0,1	12,4 ± 0,2	1,7 ± 0,2	99,0 ± 0,7
16 120°C, 90 min, NaOH 1,5% (m/v), S/L 1:15	83,4 ± 0,2	6,5 ± 0,1	6,7 ± 0,1	2,2 ± 0,0	98,8 ± 0,4
17 100°C, 60 min,	75,9 ± 0,2	4,6 ± 0,1	15,3 ± 0,2	2,2 ± 0,1	98,0 ± 0,6
NaOH 1,0% (m/v), 18	75,6 ± 0,3	5,2 ± 0,2	16,3 ± 0,2	2,7 ± 0,1	99,8 ± 0,8
S/L 1:10 19	76,1 ± 0,2	5,4 ± 0,1	17,1 ± 0,1	1,8 ± 0,1	100,4 ± 0,5

Tabela 5.11 – Valores de composição química corrigidos pelos rendimentos da deslignificação alcalina e comparados com o bagaço de cana “in natura”.

Ensaio	Rendimento	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Cinzas
1	91,2%	37,3 ± 0,1	5,9 ± 0,1	16,4 ± 0,2	1,4 ± 0,1
2	86,4%	33,7 ± 0,2	6,4 ± 0,1	16,5 ± 0,2	2,1 ± 0,0
3	99,5%	38,8 ± 0,2	7,0 ± 0,2	18,5 ± 0,1	2,4 ± 0,0
4	89,8%	36,0 ± 0,2	4,6 ± 0,3	17,9 ± 0,2	2,1 ± 0,1
5	73,1%	33,3 ± 0,3	3,9 ± 0,2	10,0 ± 0,1	1,7 ± 0,1
6	69,2%	31,4 ± 0,1	4,1 ± 0,2	9,2 ± 0,2	1,6 ± 0,1
7	67,5%	30,9 ± 0,2	4,4 ± 0,1	8,8 ± 0,1	1,3 ± 0,0
8	71,5%	33,0 ± 0,2	2,1 ± 0,2	10,9 ± 0,3	1,4 ± 0,1
9	76,1%	35,4 ± 0,1	4,0 ± 0,3	10,1 ± 0,2	1,6 ± 0,1
10	69,9%	33,1 ± 0,2	3,8 ± 0,3	7,9 ± 0,3	1,7 ± 0,0
11	75,8%	36,1 ± 0,3	3,2 ± 0,1	10,2 ± 0,1	0,9 ± 0,1
12	68,0%	34,4 ± 0,3	2,7 ± 0,2	8,9 ± 0,2	0,9 ± 0,1
13	70,3%	36,3 ± 0,2	2,1 ± 0,1	7,8 ± 0,2	1,0 ± 0,1
14	50,2%	25,3 ± 0,1	2,9 ± 0,1	3,9 ± 0,2	1,1 ± 0,1
15	62,9%	33,3 ± 0,2	3,1 ± 0,1	5,3 ± 0,2	0,7 ± 0,2
16	46,5%	26,4 ± 0,2	2,1 ± 0,1	2,1 ± 0,1	0,7 ± 0,0
17	63,4%	32,7 ± 0,2	1,9 ± 0,1	6,6 ± 0,2	0,9 ± 0,1
18	62,8%	32,3 ± 0,3	2,2 ± 0,2	6,9 ± 0,2	1,2 ± 0,1
19	59,9%	30,9 ± 0,2	2,2 ± 0,1	6,9 ± 0,1	0,7 ± 0,1
Bagaço de cana “in natura”		42,6 ± 0,2	26,2 ± 0,5	22,5 ± 0,3	4,3 ± 0,1

Memória de cálculo (pré-tratamento e deslignificação: $60,2 \times 0,68 \times 0,912 = 37,3$).

Tabela 5.12 – Solubilização total dos componentes do bagaço de cana após o pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído e deslignificação alcalina

Ensaio	Celulose	Hemicelulose	Lignina
1	12,4%	77,3%	27,2%
2	20,8%	75,6%	26,6%
3	8,9%	73,1%	17,9%
4	15,4%	82,3%	20,5%
5	21,9%	85,2%	55,4%
6	26,3%	84,4%	59,0%
7	27,5%	83,2%	61,0%
8	22,5%	92,0%	51,4%
9	16,9%	84,6%	54,9%
10	22,3%	85,7%	64,7%
11	15,2%	87,8%	54,9%
12	19,2%	89,6%	60,1%
13	14,8%	92,2%	65,4%
14	40,7%	88,8%	82,9%
15	21,9%	88,2%	76,4%
16	38,2%	92,2%	90,6%
17	23,2%	92,4%	70,7%
18	24,2%	91,5%	69,1%
19	27,2%	91,6%	69,0%

5.2.2.1 - Estudo da influência das variáveis: temperatura, tempo, concentração de NaOH e relação sólido-líquido, na deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido sulfúrico e na conversão enzimática da polpa celulósica obtida

A tabela 5.13 mostra a matriz de planejamento fatorial 2^4 com 3 repetições no ponto central. Encontram-se os fatores das variáveis quantitativas, temperatura (T), tempo (t), concentração de NaOH (C) e relação sólido-líquido (R) contendo as condições experimentais na forma de valores reais, tendo a remoção de lignina do bagaço de cana e a conversão enzimática da celulose como fatores respostas.

Tabela 5.13 - Matriz do planejamento fatorial 2^4 para a deslignificação alcalina do bagaço de cana pré-tratado com ácido sulfúrico contendo as variáveis repostas: porcentagem em massa de lignina removida e conversão enzimática da fração celulósica.

Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (min)	NaOH (% m/v)	Relação Sólido-líquido	*Total de Lignina removido (% massa)	Conversão Enzimática (% massa)
01	80	30	0,5	1:5	27,2	29,6 ± 0,9
02	120	30	0,5	1:5	26,6	29,5 ± 0,7
03	80	90	0,5	1:5	17,9	30,3 ± 0,7
04	120	90	0,5	1:5	20,5	36,5 ± 0,8
05	80	30	1,5	1:5	55,4	54,5 ± 0,5
06	120	30	1,5	1:5	59,0	46,8 ± 0,7
07	80	90	1,5	1:5	61,0	52,2 ± 0,2
08	120	90	1,5	1:5	51,4	45,8 ± 0,6
09	80	30	0,5	1:15	54,9	28,5 ± 0,3
10	120	30	0,5	1:15	64,7	41,7 ± 0,2
11	80	90	0,5	1:15	54,9	41,5 ± 0,7
12	120	90	0,5	1:15	60,1	53,9 ± 0,5
13	80	30	1,5	1:15	65,4	48,2 ± 0,3
14	120	30	1,5	1:15	82,9	79,1 ± 0,3
15	80	90	1,5	1:15	76,4	47,0 ± 0,5
16	120	90	1,5	1:15	90,6	84,1 ± 0,2
17	100	60	1,0	1:10	70,7	68,0 ± 0,2
18	100	60	1,0	1:10	69,1	65,7 ± 0,2
19	100	60	1,0	1:10	69,0	66,9 ± 0,4

*Memória de cálculo: Remoção de lignina/ensaio 16: $(1 - 0,68 \times 0,465 (6,7/22,5)) \times 100 = 90,6 \%$

* Variável remoção de lignina

Em relação à deslignificação do bagaço pré-tratado com ácido sulfúrico, o diagrama de Pareto mostra que somente o fator principal, tempo, e as interações: tempo/concentração de NaOH/relação sólido-líquido, temperatura/concentração de NaOH e

temperatura/tempo/relação sólido-líquido não apresentaram significância a um nível de 90 % de confiança (Figura 5.8).

Figura 5.8 - Diagrama de Pareto com os efeitos estimados das variáveis significativas no nível de 90 % de confiança para a remoção de lignina do bagaço de cana pré-tratado com ácido sulfúrico de acordo com o planejamento fatorial completo 2^4 com 3 repetições no ponto central.

Fonte: Arquivo pessoal.

Na sequência, é apresentada a tabela 5.14 com os valores de p-valor e coeficientes do modelo para os fatores significativos e suas interações, considerando 90 % de confiança.

Tabela 5.14 – Valores dos coeficientes do modelo e de p-valor para as variáveis independentes e suas interações, considerando uma significância de 90 %, para a variável resposta remoção de lignina do bagaço de cana.

Fator	Coefficiente	p- valor
Média	56,72105	0,000015
Temperatura (1)	2,66875	0,007891
[NaOH] (3)	13,45625	0,000314
Relação Sólido-líquido (4)	14,43125	0,000273
1* (2) Tempo	-1,11875	0,042562
1*4	3,16875	0,005617
2*3	2,29375	0,010638
2*4	1,96875	0,014358
3*4	-3,36875	0,004974
1*2*3	-0,94375	0,058326
1*3*4	1,54375	0,023044

Analisando a tabela 5.14 verifica-se que apenas a variável tempo e poucos efeitos de interação entre as variáveis não foram significativos estatisticamente a 90 % de confiança. Logo, a variável tempo e as interações não significativas foram eliminados do modelo e considerados erros aleatórios experimentais.

Com os valores dos coeficientes de regressão estatisticamente significativos pode-se estimar a Equação 5.3 que representa o modelo linear. Os valores de temperatura (T), tempo (t), [NaOH] (C) e relação sólido-líquido (R) apresentam na equação valores codificados.

$$\text{Remoção de lignina (\% m/m)} = 56,72105 + 2,66875 T + 13,45625 C + 14,43125 R - 1,11875 T*t + 3,16875 T*R + 2,29375 t*C + 1,96875 t*R - 3,36875 C*R - 0,94375 T*t*C + 1,54375 T*C*R \text{ (Eq.5.3)}.$$

Para determinar se o modelo era estatisticamente significativo fez-se necessário fazer a análise da variância (ANOVA) como mostra a Tabela 5.15.

Tabela 5.15 - Análise dos efeitos principais no planejamento fatorial 2^4 , utilizando o erro puro para a remoção de lignina do bagaço de cana.

Fonte de variação	Soma Quadrática (SS)	Graus de Liberdade	Média Quadrática (MS)	Teste F
Regressão (R)	6915,909	14	493,99	3,23 ^a
Resíduos (r)	612,303	4	153,08	
Falta de ajuste (faj)	610,483	2	305,24	335,43 ^b
Erro puro (ep)	1,820	2	0,91	
Total (T)	7528,212	18		
Valor do F_{tabelado}				$F_{14,4}^a = 3,88$ $F_{2,2}^b = 9,0$

F^a = Teste F para determinação da significância estatística da regressão (MS_R/MS_r)

F^b = Teste F para falta de ajuste (MS_{faj}/MS_{ep})

De acordo com a tabela 5.15, o valor de $F_{\text{calculado}}$ (3,23) apresentou-se menor que o obtido pelo F_{tabelado} (3,88), não satisfazendo a condição de significância estatística da regressão. Já no teste F para a falta de ajuste, o valor de $F_{\text{calculado}}$ (335,43) apresentou-se bem maior que o F_{tabelado} (9,0), indicando que os dados não se ajustam à regressão linear proposta.

Com estes resultados, a superfície de resposta (Figura 5.9) não pode ser utilizada para fins preditivos, mas somente como indicativo do comportamento das variáveis.

Figura 5.9 - Superfície de resposta para a remoção de lignina em função da relação sólido-líquido e concentração de NaOH (% m/v) empregados no processo de deslignificação do bagaço pré-tratado com ácido sulfúrico. Tempo fixo em 60 min.

Fonte: Arquivo pessoal.

Analisando os resultados de remoção de lignina em função das variáveis estudadas, verifica-se que os fatores relação sólido-líquido e concentração de NaOH tiveram influência significativa na remoção de lignina, conforme já explicado anteriormente, ou seja, independente do tipo de ácido utilizado na etapa de pré-tratamento, se fosfórico ou sulfúrico, os dois bagaços pré-tratados tiveram o mesmo comportamento de deslignificação em relação a estas duas variáveis estudadas.

Já a variável temperatura foi significativa estatisticamente a 90 % de confiança, no processo de deslignificação do bagaço pré-tratado com ácido sulfúrico. Em processos de pré-tratamento ácido e ou álcali de materiais lignocelulósicos, são desejadas altas temperaturas de trabalho a fim de acelerar o processo reacional (SILVA, 1995). No presente trabalho, as reações de deslignificação do bagaço pré-tratado com ácido sulfúrico apresentaram um melhor controle de temperatura em relação às reações de deslignificação do bagaço pré-tratado com ácido fosfórico, proporcionado pelo reator de bancada em que foi utilizado para a execução dos planejamentos experimentais. Este fato poderia explicar o porquê do fator temperatura ter significância apenas no planejamento experimental do bagaço pré-tratado por ácido sulfúrico.

A partir da tabela 5.13, pode-se observar que o ensaio 16 promoveu a maior remoção de lignina em relação ao bagaço de cana “in natura”, chegando a 90 %. Neste ensaio, o tempo de reação empregado de 90 minutos promoveu um aumento de aproximadamente 8,5 % na remoção de lignina em relação ao ensaio 14, onde apenas o fator tempo foi mantido no nível baixo (30 min). Mesmo assim, verifica-se que o aumento da solubilização da lignina é baixo quando é aumentado o tempo de reação (de 30 para 90 min), corroborando com a explicação anterior de que o processo de deslignificação alcalina do bagaço de cana é praticamente concluído a um curto período tempo.

* Variável conversão enzimática

O diagrama de Pareto apresenta os valores absolutos dos efeitos dos fatores que são importantes no delineamento de experimentos para otimização. Em relação à conversão enzimática da polpa celulósica bruta de bagaço de cana pré-tratado com ácido sulfúrico, todos os fatores avaliados apresentaram significância a um nível de 90 % de confiança, com exceção apenas das interações temperatura/tempo, tempo/concentração de NaOH/relação sólido-líquido, temperatura/tempo/relação sólido-líquido e temperatura/tempo/concentração de NaOH (Figura 5.10).

Figura 5.10 - Diagrama de Pareto com os efeitos estimados das variáveis significativas, e suas interações, no nível de 90 % de confiança para a conversão enzimática da polpa celulósica do bagaço de cana pré-tratado com ácido sulfúrico de acordo com o planejamento fatorial completo 2^4 com 3 repetições no ponto central.

Fonte: Arquivo pessoal.

A seguir, é apresentada a tabela 5.16 com os valores de p-valor, coeficientes do modelo e análise dos efeitos e interações para a variável resposta conversão enzimática, considerando 90 % de confiança.

Tabela 5.16 – Valores dos coeficientes do modelo e de p-valor para as variáveis independentes e suas interações, considerando uma significância de 90 %, para a variável resposta conversão enzimática da fração celulósica de bagaço de cana.

Fator	Coefficiente	p- valor
Média	49,98947	0,000028
Temperatura (1)	5,35000	0,002877
Tempo (2)	2,08750	0,018456
[NaOH] (3)	10,38750	0,000766
Relação S/L ^a (4)	6,17500	0,002162
1*3	1,38750	0,040378
1*4	6,35000	0,002045
2*3	-2,02500	0,019579
2*4	1,53750	0,033253
3*4	1,21250	0,051916
1*3*4	3,91250	0,005360

^aS/L: sólido/líquido

Com os valores dos coeficientes de regressão estatisticamente significativos pode-se estimar a Equação 5.4 que representa o modelo linear. Os valores de temperatura (T), tempo (t), [NaOH] (C) e relação sólido-líquido (R) apresentam na equação valores codificados.

$$\text{Conversão enzimática (\% m/m)} = 49,98947 + 5,35 T + 2,08750 t + 10,38750 C + 6,17500 R + 1,38750 T*C + 6,35 T*R - 2,025 t*C + 1,53750 t*R + 1,21250 C*R + 3,91250 T*C*R \text{ (Eq.5.4)}$$

Para determinar se o modelo era estatisticamente significativo fez-se necessário fazer a análise da variância (ANOVA) como mostra a Tabela 5.17.

Tabela 5.17 - Análise dos efeitos principais no planejamento fatorial 2⁴, utilizando o erro puro para a conversão enzimática da fração celulósica de bagaço de cana.

Fonte de variação	Soma Quadrática (SS)	Graus de Liberdade	Média Quadrática (MS)	Teste F
Regressão (R)	3929,89	14	280,71	1,09 ^a
Resíduos (r)	1026,388	4	256,60	
Falta de ajuste (faj)	1023,741	2	511,87	386,75 ^b
Erro puro (ep)	2,647	2	1,3235	
Total (T)	4956,278	18		
Valor do F _{tabelado}				F _{14,4} ^a = 3,88 F _{2,2} ^b = 9,0

F^a = Teste F para determinação da significância estatística da regressão (MS_R/MS_r)

F^b = Teste F para falta de ajuste (MS_{faj}/MS_{ep})

De acordo com a tabela 5.17, o valor de F_{calculado} (1,09) apresentou-se menor que o obtido pelo F_{tabelado} (3,88) não satisfazendo a condição da significância estatística da regressão. Já, no teste F para a falta de ajuste, o valor de F_{calculado} (386,75) apresentou-se bem maior que o F_{tabelado} (9,0), indicando falta de ajuste com evidências de que os dados não se ajustam à regressão linear proposta.

A partir desses resultados, a superfície de resposta (Figura 5.11) não pode ser utilizada para fins preditivos, mas somente como indicativo do comportamento das variáveis. Sendo assim, o comportamento da variável resposta conversão enzimática para o planejamento fatorial em questão apresentou-se semelhante ao planejamento fatorial anterior, de forma que a conversão de celulose em glicose foi favorecida pela remoção de grande parte de lignina presente na biomassa, que por sua vez é alcançada por processos de deslignificação que trabalham a elevadas temperaturas, altas concentrações de NaOH e baixas razões sólido/líquido (1:15). Quando comparados os ensaios 14 e 16, cujas conversões enzimáticas da celulose foram as maiores obtidas, verifica-se que o emprego do fator tempo no nível alto (90 min) permitiu um acréscimo de aproximadamente 6 % no ensaio 16, onde todos os fatores foram empregados em nível alto.

Embora o fator tempo tenha apresentado significância ao nível de 90 %, quando comparado aos demais fatores em relação ao efeito proporcionado na variável resposta, foi o que menos apresentou influência na conversão enzimática da celulose.

Figura 5.11 - Superfície de resposta para a conversão enzimática da celulose em função da relação sólido-líquido e concentração de NaOH (% m/v) empregados no processo de deslignificação do bagaço pré-tratado com ácido sulfúrico. Tempo fixo em 60 min.

Fonte: Arquivo pessoal.

5.3 Deslignificação alcalina do bagaço de cana-de-açúcar em reator piloto

5.3.1 Reação de deslignificação do bagaço pré-tratado com ácido fosfórico

Após a realização do planejamento fatorial 2^4 para a deslignificação do bagaço de cana pré-tratado com ácido fosfórico, mesmo não sendo possível a otimização, em termos estatísticos, da melhor condição experimental que seria reproduzida em reator piloto, optou-se em escolher o ensaio 14 deste planejamento fatorial para a sequência do trabalho. O ensaio 14 resultou em uma elevada remoção de lignina em relação ao bagaço “in natura” (79,9 %), valor este bem próximo ao do ensaio 16 (81,7 %) e possibilitou a maior conversão enzimática da polpa celulósica deste processo em comparação com os demais ensaios, chegando a 81,1% de conversão. Dessa forma, o ensaio escolhido para a reação em reator piloto de 350 L, teve as seguintes condições experimentais: 120 °C, 30 min, NaOH 1,5 % (m/v) e relação sólido-líquido de 1:15.

Após a realização da reação, foi possível obter o gráfico (Figura 5.12) com o perfil de aquecimento e resfriamento do reator, a partir dos dados coletados do periférico do equipamento (A). Também é mostrado o gráfico para a reação em laboratório (B), como um comparativo.

Figura 5.12 - Perfis de temperatura em função do tempo durante o processo de deslignificação alcalina, em reator piloto de 350 L (A) e de laboratório (2 L) (B), do bagaço de cana pré-tratado com ácido fosfórico diluído.

Fonte: Arquivo pessoal.

Analisando o gráfico (A) acima, tem-se o comportamento da temperatura em função do tempo ao longo dos procedimentos realizados para carregamento do reator, primeiramente com água, depois com o bagaço pré-tratado com ácido fosfórico (10 kg base seca) e por fim, a adição de solução de NaOH e água para lavagem do sistema. Pode-se observar também que este reator possui um sistema de aquecimento e resfriamento rápido, quando comparado com o gráfico B, justamente para evitar a formação de longas rampas de aquecimento/resfriamento que poderiam causar interferências significativas no tempo de reação a que o bagaço de cana foi submetido. Após a reação de deslignificação, o material obtido foi filtrado para remoção do licor negro e a polpa celulósica bruta lavada até pH próximo de 6, para remoção dos resíduos de hidróxido de sódio, determinado-se um rendimento em massa de 58,9 %. Posteriormente, a polpa celulósica foi armazenada para a realização do ensaio de hidrólise enzimática e o licor negro reservado para precipitação e estudo da lignina obtida.

A seguir é apresentada a tabela de composição química da polpa celulósica em comparação com os bagaços “in natura” e pré-tratado com ácido fosfórico, juntamente com balanço de material após cada etapa de processamento da biomassa (Tabela 5.18). A partir destes resultados, é possível ter um comparativo de cada componente químico que ainda se manteve presente durante as etapas de pré-tratamento e deslignificação. Dessa forma, a polpa celulósica bruta (material final) apresentou aproximadamente 39 % de celulose, 3 % de hemicelulose e 5 % de lignina.

Tabela 5.18 - Composição química do bagaço de cana, juntamente com o balanço de material após o pré-tratamento com ácido fosfórico diluído e deslignificação alcalina, ambos em escala piloto.

Composição química	Bagaço “in natura” (%)	Bagaço pré-tratado (%)	Correção pelo rendimento do pré-tratamento (%)	Bagaço pré-tratado e deslignificado (%)	Correção pelo rendimento do pré-tratamento e deslignificação (%)
Rendimento	-	-	84 %	-	58,9 %
Celulose	42,6 ± 0,2	48,5 ± 0,1	40,7 ± 0,1	79,2 ± 0,3	39,2 ± 0,3
Hemicelulose	26,2 ± 0,5	17,0 ± 0,1	14,3 ± 0,1	6,5 ± 0,2	3,2 ± 0,2
Lignina	22,5 ± 0,3	28,8 ± 0,1	24,2 ± 0,1	10,3 ± 0,6	5,1 ± 0,6
Cinzas	4,3 ± 0,1	3,8 ± 0,0	3,2 ± 0,0	2,9 ± 0,0	1,4 ± 0,0
Extrativos	5,3 ± 0,5	-	-	-	-
Total	100,9 ± 1,6	98,1 ± 0,3	-	98,9 ± 1,1	-

Memória de cálculo (pré-tratamento: $48,5 \times 0,84 = 40,7$); (deslignificação: $79,2 \times 0,84 \times 0,589 = 39,2$)

Foi efetuado um comparativo do ensaio 14 (realizado no laboratório e em escala piloto) referente à solubilização de celulose, hemicelulose e lignina apenas na etapa de deslignificação alcalina. Observou-se que as solubilizações de celulose e lignina foram mais pronunciadas na reação em escala de laboratório do que na escala piloto, ocorrendo o inverso na solubilização da fração hemicelulósica.

Figura 5.13 - Comparação da reação de deslignificação do bagaço de cana pré-tratado com ácido fosfórico (Ensaio 14) entre as escalas de laboratório e piloto em relação à solubilização dos componentes químicos.

Fonte: Arquivo pessoal.

Há algumas explicações para este comportamento: a reação efetuada no reator de laboratório apresentou dificuldades no controle da rampa de aquecimento, uma vez que este equipamento possui uma parede espessa, dificultando o aquecimento e resfriamento

em um tempo pré-estabelecido para a reação desejada. Outra questão envolvida foi o fato deste equipamento não ser totalmente adequado para o trabalho com materiais sólidos, sendo dificultada sua operação. Desta forma, as maiores solubilizações de celulose e lignina poderiam ser explicadas pelo maior tempo de reação relacionado às elevadas rampas de aquecimento do reator de laboratório, mascarando o tempo pré-estabelecido pela condição experimental (Figura 5.12 B). Já a reação realizada em escala piloto, foi efetuada em um reator projetado para trabalhar com biomassas vegetais, dispondo de sistemas de aquecimento/resfriamento rápidos, evitando degradações indesejadas da biomassa pelas acentuadas rampas de aquecimento/resfriamento (Figura 5.12 A), refletindo em uma menor solubilização dos componentes do bagaço de cana.

Analisando os resultados obtidos do gráfico da figura 5.14, verifica-se que ao longo dos processos de pré-tratamento e deslignificação do bagaço de cana, aproximadamente 8 % de celulose foi solubilizado. De uma forma geral os pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos não são seletivos o suficiente para promover a remoção ou preservação total de um ou mais componentes presentes na sua composição química, fazendo com que haja perdas ou solubilizações destes materiais durante o seu processamento (CANDIDO; GODOY; GONÇALVES, 2012).

Figura 5.14 - Solubilização dos componentes do bagaço de cana-de-açúcar após as etapas de pré-tratamento com H_3PO_4 1,5 % (m/v), deslignificação com NaOH 1,5 % (m/v), e o total solubilizado.

Fonte: Arquivo pessoal.

De acordo com o gráfico da figura 5.14, pode-se verificar também que a deslignificação alcalina contribui tanto para a remoção de lignina (78,9 %) quanto para a hemicelulose (77,5 %), chegando a 87,7 % de remoção quando comparado com o bagaço

de cana “in natura”. Este fato pode ser explicado pelo efeito do uso de soluções alcalinas no tratamento de biomassas lignocelulósicas proporcionando a clivagem das ligações da lignina com hemicelulose e celulose, com consequente dissolução da maior parte da lignina presente na biomassa, juntamente com ácidos urônicos, promovendo a remoção de parte da hemicelulose e um intumescimento das microfibrilas de celulose (KHUONG et al., 2014).

A questão referente ao aumento da remoção de hemicelulose em processos de deslignificação alcalina, conforme observado no gráfico da figura 5.14, tem sido abordada por outros autores em experimentos de polpação alcalina de materiais lignocelulósicos. Colodetti et al. (2011), em trabalho realizado com pré-tratamentos de cavacos de eucalipto, mencionaram que a xilana removida na etapa de pré-hidrólise, como etapa prévia à polpação alcalina, reduz a estabilidade da xilana remanescente no material lignocelulósico, fazendo com que esta estrutura seja bastante solúvel na posterior etapa de deslignificação alcalina.

5.3.2 Reação de deslignificação do bagaço pré-tratado com ácido sulfúrico

Após a realização do planejamento fatorial 2^4 para a deslignificação do bagaço de cana pré-tratado com ácido sulfúrico, mesmo não sendo possível a otimização em termos estatísticos da melhor condição experimental que seria reproduzida em reator piloto, optou-se em escolher o ensaio 14 deste planejamento fatorial para a sequência do trabalho. Embora este ensaio tenha representado a segunda melhor condição experimental, atrás apenas do ensaio 16, que proporcionou uma remoção de aproximadamente 90% de lignina com uma conversão enzimática de 84,1% da fração celulósica, o ganho de conversão enzimática foi relativamente pequeno (aproximadamente 6%) em relação ao ensaio 14, para se trabalhar com um tempo de reação de 1h 30min. Dessa forma, foram utilizadas as condições reacionais do ensaio 14, para a reação em reator piloto de 350 L.

Após a realização da reação, foi possível obter o gráfico (Figura 5.15) com o perfil de aquecimento e resfriamento do reator, a partir dos dados coletados do periférico do equipamento. A partir deste gráfico, tem-se o comportamento da temperatura em função do tempo ao longo dos procedimentos realizados para carregamento do reator, primeiramente com água, depois com o bagaço pré-tratado com ácido sulfúrico (10 kg base seca) e por fim, a adição de solução de NaOH e água para lavagem do sistema. Foi construído também

o gráfico (B) para a reação efetuada em laboratório, de forma a comparar os dois resultados.

Figura 5.15 - Perfis de temperatura em função do tempo durante o processo de deslignificação alcalina, em reator piloto de 350 L (A) e de laboratório (2 L) (B), do bagaço de cana pré-tratado com ácido sulfúrico diluído.

Fonte: Arquivo pessoal.

Analisando o gráfico da figura 5.15 A, verifica-se que este apresentou comportamento semelhante ao do gráfico da figura 5.12 A em relação ao tempo de aquecimento e resfriamento do reator, que foi relativamente curto se comparado com a rampa de aquecimento para a reação no laboratório (Figura 5.15 B). Após a reação de deslignificação, o material obtido foi filtrado para remoção do licor negro e a polpa celulósica bruta lavada até pH neutro para remoção dos resíduos de hidróxido de sódio, determinando-se um rendimento em massa de 48,4 %. Posteriormente, a polpa celulósica foi armazenada para a realização do ensaio de hidrólise enzimática e o licor negro reservado para precipitação e estudo da lignina obtida.

A seguir é apresentada a tabela de composição química da polpa celulósica em comparação com os bagaços “in natura” e pré-tratado com ácido fosfórico, juntamente com balanço de material após cada etapa de processamento da biomassa (Tabela 5.19). A partir destes resultados, é possível ter um comparativo de cada componente químico que ainda se manteve presente durante as etapas de pré-tratamento e deslignificação. A polpa celulósica bruta (material final) apresentou aproximadamente 80,5 % de celulose, 3,9 % de hemicelulose e 9,8 % de lignina.

Tabela 5.19 - Composição química do bagaço de cana, juntamente com o balanço de material após o pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído e deslignificação alcalina, ambos em escala piloto.

Composição química	Bagaço “in natura” (%)	Bagaço pré-tratado (%)	Correção pelo rendimento do pré-tratamento (%)	Bagaço pré-tratado e deslignificado (%)	Correção pelo rendimento do pré-tratamento e deslignificação (%)
Rendimento	-	-	68 %	-	48,4 %
Celulose	42,6 ± 0,2	53,3 ± 0,1	36,2 ± 0,2	80,5 ± 0,2	26,5 ± 0,2
Hemicelulose	26,2 ± 0,5	9,4 ± 0,3	6,4 ± 0,2	3,9 ± 0,1	1,3 ± 0,1
Lignina	22,5 ± 0,3	33,6 ± 0,3	22,8 ± 0,1	9,8 ± 0,3	3,2 ± 0,3
Cinzas	4,3 ± 0,1	3,0 ± 0,0	2,0 ± 0,1	4,3 ± 0,0	1,4 ± 0,0
Extrativos	5,3 ± 0,5	-	-	-	-
Total	100,9 ± 1,6	99,3 ± 0,7	-	98,5 ± 0,6	-

Memória de cálculo (pré-tratamento: $53,3 \times 0,68 = 36,2$); (deslignificação: $80,5 \times 0,68 \times 0,484 = 26,5$)

Também foi efetuado um comparativo do ensaio 14 (realizado no laboratório e em escala piloto) referente à solubilização de celulose, hemicelulose e lignina apenas na etapa de deslignificação alcalina (Figura 5.16). Observou-se que as solubilizações de celulose foram bem elevadas, sendo maior para a reação em laboratório (30,2 %). Para a solubilização de hemicelulose, verificou-se que a remoção deste componente foi bem mais intensa na reação em reator piloto do que a reação em laboratório. Já o teor de lignina removido na reação de deslignificação em escala de laboratório ficou bem próximo ao da reação efetuada em escala piloto.

Figura 5.16 - Comparação da reação de deslignificação do bagaço de cana pré-tratado com ácido sulfúrico (Ensaio 14) entre as escalas de laboratório e piloto em relação à solubilização dos componentes químicos.

Fonte: Arquivo pessoal.

Comparando os resultados dos gráficos das figuras 5.13 e 5.16 quanto à solubilização de celulose na reação de deslignificação, percebe-se que o bagaço

proveniente do pré-tratamento com ácido fosfórico apresentou menor remoção de celulose do que o pré-tratado com ácido sulfúrico. O fato de o ácido sulfúrico ser mais forte do que o fosfórico contribuiu para a obtenção de um material pré-tratado (celulignina) mais susceptível à etapa de deslignificação alcalina, o que justificaria uma maior solubilização das frações de celulose, hemicelulose e lignina para o bagaço de cana.

Analizando o gráfico da figura 5.16, verificou-se que a solubilização da hemicelulose na reação efetuada em reator piloto foi 32 % maior do que a reação efetuada no laboratório. Este aumento pode ser explicado por um melhor controle do tempo de reação na temperatura desejada (120 °C), sendo estes fatores difíceis de serem controlados na reação de laboratório (Figura 5.15).

A seguir, é apresentado o gráfico da figura 5.17 com um comparativo dos componentes solubilizados em cada etapa de processamento da biomassa, porém levando-se em consideração as duas etapas em escala piloto (pré-tratamento e deslignificação).

Figura 5.17 - Solubilização dos componentes do bagaço de cana-de-açúcar após as etapas de pré-tratamento com H_2SO_4 1,0 % (m/v), deslignificação com NaOH 1,5 % (m/v), e o total solubilizado.

Fonte: Arquivo pessoal.

Os resultados apresentados confirmam um aumento da remoção dos componentes químicos do bagaço de cana após cada etapa de seu processamento, com uma solubilização maior do que os componentes do bagaço proveniente do pré-tratamento com ácido fosfórico, de acordo com os dados anteriormente apresentados no gráfico da figura 5.14.

5.4 Análise morfológica do bagaço de cana-de-açúcar por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As fotomicrografias abaixo apresentam a estrutura morfológica do bagaço de cana-de-açúcar “in natura”, pré-tratado com os ácidos fosfórico e sulfúrico e os respectivos bagaços deslignificados oriundos do pré-tratamento ácido diluído. As micrografias dos bagaços deslignificados representam as melhores condições experimentais de deslignificação (120 °C, 30 min, NaOH 1,5 % (m/v), relação sólido:líquido 1:15).

Figura 5.18 - Fotomicrografias do bagaço de cana-de-açúcar “in natura” (A); pré-tratado com ácido fosfórico diluído (B) e deslignificado (C); pré-tratado com ácido sulfúrico diluído (D) e deslignificado (E).

Fonte: Arquivo pessoal.

Fazendo uma análise comparativa das fotomicrografias observa-se que não houve uma mudança significativa na estrutura morfológica do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido fosfórico diluído em relação ao bagaço “in natura”. O pré-tratamento utilizado não foi severo o suficiente para a remoção dos flocos de medula (células de parênquima) e também das células da casca (figuras 5.18 A e 5.18 B) as quais se caracterizam por serem compostas por fibras muito lignificadas com larga parede celular, elevado comprimento e estrutura rígida.

Quando o bagaço de cana é submetido ao processo de pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído (figura 5.18 D), grande parte das células vegetais, que corresponde às células de parênquima (células de formato achatado e floculoso formando uma camada sobre as fibras celulósicas), é danificada, expondo os elementos porosos (pits) contidos interiormente no tecido parenquimático e nos feixes fibrovasculares. Os pits são estruturas presentes entre as células de parênquima tendo a função de difundir reagentes químicos e enzimas a fim de promover um aumento da hidrólise dos carboidratos da biomassa (HIMMEL et al., 2007). Após a etapa de deslignificação alcalina (figuras 5.18 C e 5.18 E) é possível observar grandes quantidades de fibras celulósicas livres de flocos de medula (células de parênquima), mostrando que a etapa de pré-tratamento seguido da deslignificação pode proporcionar uma melhor disponibilidade das fibras celulósicas para processos subsequentes, tais como para a conversão enzimática da celulose em glicose, no processo de obtenção de etanol celulósico.

5.5 Análise do bagaço de cana-de-açúcar por termoporometria com calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Os resultados de termoporometria para o bagaço de cana “in natura”, pré-tratado com os ácidos fosfórico e sulfúrico, e as respectivas polpas celulósicas são apresentados no gráfico da figura 5.19. Observando as curvas obtidas para cada amostra de bagaço de cana, verificou-se que todas as amostras apresentaram diâmetros de poro dos mais variados tamanhos (desde menores que 1 nm até maiores que 100 nm).

Ambas as etapas de pré-tratamento ácido diluído contribuíram para o aumento da área dos poros com diâmetros menores que 100 nm. Já o processo de deslignificação, tanto do bagaço pré-tratado com ácido fosfórico quanto com sulfúrico, contribuiu para o aumento

do número de poros com diâmetros maiores que 100 nm, em relação ao bagaço de cana “in natura” e pré-tratado.

Figura 5.19 - Relação entre água confinada congelável e o diâmetro equivalente dos poros, obtida com calorimetria diferencial de varredura.

Fonte: Arquivo pessoal.

Estudos relacionados à determinação de poros na estrutura da celulose tem mostrado que poros com diâmetro elevado (maiores que 100 nm) são atribuídos ao lúmen das fibras, poros inter-fibras desenvolvidos a partir da geometria da rede de fibras (MAZIERO et al., 2013). A própria estrutura da fibra celulósica já apresenta poros e estes podem ser gerados durante tratamentos químicos e mecânicos da biomassa vegetal (PARK et al., 2006).

Acredita-se que os poros são formados quando a hemicelulose e a lignina, localizadas entre as microfibrilas de celulose, são removidas ao longo do processamento da biomassa, o que tem sido observado em diversos estudos relacionados à conversão de biomassa lignocelulósica (MALONEY; PAULAPURO, 1999; ISHIZAWA et al., 2007; MOHAMMED, 2012; BEHERA et al., 2014).

Deve-se levar também em consideração que os poros são muitas vezes de forma irregular, sendo difícil de defini-los por um único número. Sendo assim, uma provável explicação para a variabilidade na medida de volume dos poros para o bagaço de cana é a heterogeneidade das amostras, sendo este fato já observado em outros estudos relacionados à porosidade de materiais lignocelulósicos (ISHIZAWA et al., 2007).

5.6 Análise da celulose de bagaço de cana-de-açúcar por difração de raios X

A partir desta análise foi possível obter um comparativo (Tabela 5.20) do grau de cristalinidade (x_{cr}) e o tamanho médio dos cristais (L_{200}) para a celulose do bagaço de cana em seus diferentes estágios: “in natura”, pré-tratado (com os ácidos fosfórico e sulfúrico) e posteriormente deslignificado (em escala piloto).

Tabela 5.20 – Parâmetros de difração de raios X para a celulose de bagaço de cana “in natura” e após as etapas de pré-tratamento e deslignificação.

Amostra	Grau de cristalinidade (x_{cr}) g/g	Largura dos cristais (L_{200}) nm
Bagaço “in natura”	0,31	2,95
Bagaço pré-tratado com H_3PO_4	0,44	3,27
Bagaço pré-tratado com H_2SO_4	0,43	3,26
Bagaço pré-tratado (H_3PO_4) e deslignificado	0,49	3,48
Bagaço pré-tratado (H_2SO_4) e deslignificado	0,53	3,70

Analisando a tabela 5.20 pode-se observar um aumento crescente do grau de cristalinidade, quando se compara o bagaço de cana “in natura” com os bagaços pré-tratado e deslignificado. Mesmo empregando ácidos diferentes no pré-tratamento, não se observou diferenças no grau de cristalinidade e tamanho médio de cristais quando comparadas as amostras de bagaço pré-tratado. De uma forma geral, o aumento do grau de cristalinidade pode ser explicado pelo aumento da exposição da celulose proporcionada pelas remoções de hemicelulose e lignina ao longo do processamento da biomassa vegetal (KUMAR; WYMAN, 2013).

Os resultados obtidos referentes às larguras dos cristais de celulose de todas as amostras de bagaço de cana estudadas no presente trabalho mostraram valores na faixa entre 2,95 e 3,70 nm, sendo estes próximos aos encontrados por Driemeier e Bragatto (2013) em estudos com celulose de bagaço de cana, os quais variaram entre 3,28 e 3,75. Segundo estes autores, o tamanho médio dos cristais depende do material lignocelulósico e do processamento pelo qual o material foi submetido, variando de aproximadamente 3 nm,

para materiais lignocelulósicos “in natura”, até aproximadamente 9 nm para celuloses de algodão, por exemplo.

5.7 Hidrólise enzimática da polpa celulósica de bagaço de cana-de-açúcar obtida em escala piloto

As polpas celulósicas obtidas em reator piloto, provenientes dos bagaços pré-tratados com os ácidos fosfórico e sulfúrico, foram submetidas à hidrólise enzimática conforme metodologia descrita no item 4.4 (Material e Métodos) desta tese. Devido à grande quantidade de polpa celulósica obtida no processo deslignificação, optou-se por realizar os ensaios de hidrólise enzimática deste material em frascos de 2 L, mantendo-se as mesmas condições de reação empregadas na metodologia descrita. Já os ensaios de hidrólise enzimática dos bagaços “in natura” e pré-tratado foram realizados em frascos Erlenmeyer de 125 mL.

A tabela 5.21 faz um comparativo da hidrólise enzimática do bagaço de cana “in natura” com a hidrólise enzimática dos bagaços pré-tratados e das polpas celulósicas obtidas em escala piloto.

Comparando-se a conversão enzimática dos bagaços pré-tratados com o bagaço “in natura”, verificou-se um aumento da conversão da celulose proporcionado pela remoção de uma parte da fração hemicelulósica. A conversão enzimática da celulose para o bagaço de cana “in natura”, a qual foi de 10,8%, chegou a 40,4% para o bagaço pré-tratado com ácido sulfúrico diluído e 29,5% para o bagaço pré-tratado com ácido fosfórico diluído.

Correlacionando os resultados de porosidade e difração de raios X com a conversão enzimática da celulose, observa-se que provavelmente a remoção da hemicelulose proporcionou uma alteração na estrutura da celulose, aumentando sua porosidade e, conseqüentemente, deixou este polissacarídeo mais disponível à atuação das celulasas resultando em um aumento na conversão enzimática da biomassa (HUANG et al., 2010; MASARIN et al., 2011; KUMAR; WYMAN, 2013).

Porém, a conversão enzimática da celulose nos bagaços pré-tratados ficou abaixo do esperado, por se tratar de processos que utilizam ácidos como agentes catalíticos, os quais em geral fornecem boas conversões enzimáticas.

Os valores de rendimento das etapas de pré-tratamento (tanto empregando o ácido fosfórico quanto o sulfúrico), juntamente com os valores de solubilização dos componentes

macromoleculares nestas etapas, já mostraram anteriormente que quase não houve solubilização de frações de lignina de baixo peso molecular, e que apenas a solubilização de uma parte da hemicelulose não contribui para um aumento significativo da conversão enzimática da celulose, na etapa de pré-tratamento.

Este fato vem reforçar a hipótese de que a quantidade de lignina na biomassa vegetal está entre os principais fatores que interferem na digestibilidade da celulose (RAHIKAINEN et al., 2013; GUO et al., 2014), tendo maior influência até do que a quantidade de hemicelulose presente, o que tem sido mostrado em estudos de conversão de biomassa vegetal (HUANG et al., 2011; ROCHA et al., 2013).

Tabela 5.21 – Comparativo da hidrólise enzimática do bagaço de cana “in natura” com a hidrólise enzimática dos bagaços pré-tratado e deslignificado.

Bagaço de cana-de-açúcar	Condição do processo (em reator piloto)	Concentração de glicose no hidrolisado (g/L)	Conversão de celulose (%)
“in natura”	-	$8,6 \pm 0,1$	$10,8 \pm 1,1$
Pré-tratado	H ₂ SO ₄ 1,0 % (m/v), 120 °C, 20 min	$28,0 \pm 0,4$	$40,4 \pm 0,5$
	H ₃ PO ₄ 1,5 % (m/v), 120 °C, 20 min	$16,7 \pm 0,2$	$29,5 \pm 0,3$
Deslignificado	120 °C; 30 min; NaOH 1,5 % (m/v); S/L 1/15 (após pré-tratamento com H ₂ SO ₄)	$64,4 \pm 0,9$	$67,0 \pm 0,6$
	120 °C; 30 min; NaOH 1,5 % (m/v); S/L 1:15 (após pré-tratamento com H ₃ PO ₄)	$67,1 \pm 0,5$	$70,3 \pm 1,2$

Os processos de deslignificação dos bagaços pré-tratados resultaram em um aumento na conversão enzimática das polpas celulósicas obtidas, chegando a aproximadamente 70 %, conforme reportado na tabela 5.21. Após as etapas de processamento do bagaço de cana (pré-tratamento e deslignificação), maiores foram as remoções de hemicelulose e lignina contribuindo para uma maior exposição da celulose à ação das enzimas celulolíticas. Apesar da conversão enzimática elevada, verificou-se que este valor ficou abaixo dos valores de conversão para as melhores condições experimentais de deslignificação realizadas em laboratório, as quais chegaram a aproximadamente 80 %, conforme anteriormente mostrado nas tabelas 5.5 e 5.13 desta tese.

Tal fato pode ser explicado pela diferença em relação aos frascos utilizados na realização da hidrólise enzimática, uma vez que para as polpas celulósicas obtidas no laboratório usou-se frasco Erlenmeyer de 125 mL com 3 g de material (base seca) e para as polpas obtidas em escala piloto usou-se frascos de 2 L com 100 g de material (base seca). A influência da quantidade de massa utilizada e o tipo de agitação também foram observados por Palmqvist (2014) como fatores determinantes na variação da taxa de conversão enzimática de materiais lignocelulósicos.

5.8 Avaliação da fermentabilidade do hidrolisado celulósico de bagaço de cana-de-açúcar

Após a realização do processo fermentativo do hidrolisado celulósico empregando o reciclo de células de *S. cerevisiae* foi possível obter os gráficos da Figura 5.20 com o comportamento da levedura ao longo das fermentações.

Figura 5.20 - Perfil de glicose, (X) massa celular (base seca) e etanol com o tempo para fermentações em batelada com reciclo de células em hidrolisado celulósico usando *S.cerevisiae* Pe-2.

Fonte: Arquivo pessoal.

Analisando os gráficos da Figura 5.20 observa-se uma redução no tempo de fermentação a cada reciclo. A concentração de células foi aumentando ao longo dos ensaios, o que acarretou em um aumento da produtividade. Este fato mostra uma característica da técnica de fermentação empregando reciclos, a qual apresenta alta concentração de células dentro dos fermentadores, contribuindo para menores tempos de

fermentação, na ordem de 6 a 11 h (BASSO et al., 2008; ANDRADE, 2012). Pode-se observar também o consumo de praticamente toda a glicose presente no hidrolisado em todos os ensaios realizados, indicando que esta fonte de carbono foi bem assimilada pela levedura resultando em elevada produção de etanol, em que títulos da ordem de 50 g/L foram obtidos.

A seguir, é apresentada a Tabela 5.22 com os parâmetros avaliados durante a fermentação do hidrolisado celulósico concentrado de bagaço de cana. Verifica-se que a xilose presente no hidrolisado (em pequenas quantidades) manteve-se praticamente constante durante as fermentações, não sendo consumida pela levedura *S. cerevisiae*.

Tabela 5.22 – Parâmetros avaliados durante a fermentação alcoólica do hidrolisado celulósico concentrado

	Tempo	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Ácido acético (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)	X (g/L)	Consumo de glicose (g/L)	Produção de etanol (g/L)	Y _{PS} (g/g)	Produtividade (g/L.h)
Batelada 1	0	104,8	9,09	0,00	0,00	0,00	1,27	0,00	0,00	0,00	0,00
	4	99,57	9,23	0,00	2,76	0,43	1,73	5,23	2,76	0,53	0,69
	8	78,52	9,10	0,00	11,51	1,33	3,12	26,28	11,51	0,44	1,44
	12	51,89	9,13	0,29	23,66	2,73	4,12	52,91	23,66	0,45	1,97
	16	26,67	9,05	0,44	34,79	3,83	4,65	78,14	34,79	0,45	2,17
	20	6,07	8,93	0,52	43,39	4,54	5,58	98,73	43,39	0,44	2,17
	24	0,50	8,69	0,54	46,45	4,70	5,65	104,30	46,45	0,45	1,94
Batelada 2	0	112,85	10,24	0,00	1,76	0,16	5,23	0,00	0,00	0,00	0,00
	4	72,28	10,31	0,26	18,56	2,13	6,87	40,57	16,80	0,41	4,20
	8	24,59	10,28	0,40	42,23	4,25	8,72	88,26	40,47	0,46	5,06
	12	0,96	9,77	0,43	52,05	4,83	9,83	111,89	50,29	0,45	4,19
Batelada 3	0	108,57	10,38	0,00	3,98	0,35	7,10	0,00	0,00	0,00	0,00
	4	55,55	10,19	0,31	27,02	2,74	9,15	53,02	23,04	0,43	5,76
	8	7,11	10,02	0,41	48,97	4,51	11,72	101,46	44,99	0,44	5,62
Batelada 4	0	105,51	10,11	0,12	5,33	0,44	8,45	0,00	0,00	0,00	0,00
	4	44,96	10,27	0,35	30,30	3,15	11,08	60,55	24,87	0,41	6,22
	8	1,27	9,46	0,41	50,74	4,53	13,23	104,25	45,41	0,44	5,68
Batelada 5	0	105,02	10,43	0,00	5,05	0,42	10,47	0,00	0,00	0,00	0,00
	4	39,11	9,70	0,44	34,55	3,44	13,22	65,91	29,50	0,45	7,38
	8	0,71	9,17	0,47	51,57	4,59	14,57	104,31	46,52	0,45	5,81

Este fato pode ser explicado pela ausência da enzima xilose isomerase ou xilose redutase + xilitol desidrogenase em leveduras *S. cerevisiae* selvagens, enzimas responsáveis pelo metabolismo da xilose presente no hidrolisado (KIM et al., 2013).

Durante o processo fermentativo pôde-se observar também o aumento da produção de glicerol (até 5 g/L) em resposta ao aumento da concentração de etanol. De acordo com Taherzadeh e Karimi (2011), o glicerol é uma resposta metabólica das células do microrganismo às elevadas concentrações de etanol, tendo função protetora às células contra o estresse hídrico e rompimento de ligações de hidrogênio proporcionado pelo etanol. A produção de glicerol poderia ser diminuída a partir de um balanço redox no meio.

Os inibidores ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural, não foram detectados no hidrolisado celulósico, uma vez que permaneceram na corrente de C5 (hidrolisado hemicelulósico). Já em relação à produção do ácido acético, coproduto formado durante a fermentação alcoólica pela levedura, observou-se uma pequena concentração obtida, alcançando aproximadamente 0,5 g/L ao final de cada batelada.

De uma forma geral, a levedura *S. cerevisiae* utilizada nestes ensaios de fermentação apresentou bom desempenho quanto à produção de etanol, que podem ser observados pelos gráficos de rendimento e produtividade global mostrados na Figura 5.21 a seguir. Este fato comprova a robustez desta levedura em processos que simulam condições de estresse para o microrganismo, as quais expressam a realidade de processos industriais, com altas concentrações de açúcar no início do processo e elevadas concentrações de etanol no final (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011).

Figura 5.21 - Valores obtidos de rendimento e produtividade global para as cinco reações de fermentação alcoólica.

Fonte: Arquivo pessoal.

Andrade et al. (2013) conduziram fermentação em batelada com reciclo de células empregando uma mistura de melaço (22,22 % (v/v)) e hidrolisado celulósico (66,67 % (v/v)) para produção de etanol por *S. cerevisiae* (levedura utilizada em usinas de álcool brasileiras) em diferentes temperaturas. A quantidade total de açúcar no início da fermentação foi de 150 g L^{-1} , sendo investigadas as temperaturas de 30, 32, 34, 36 e 38 °C. As fermentações foram interrompidas ao cessar da quantidade de glicose, sendo que neste tempo, a agitação foi interrompida, o vinho foi recuperado, centrifugado e as células foram ressuspensas para serem utilizadas como inóculo na batelada subsequente. Em termos comparativos com o presente trabalho, a fermentação a 32 °C apresentou, em três bateladas subsequentes, produtividades de 2,33, 2,35 e $1,24 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectivamente. No presente trabalho, os valores de produtividade foram maiores do que os obtidos por Andrade et al. (2013), sendo 1,94, 4,19, 5,62, 5,68 e 5,81, para cada uma das cinco bateladas sequenciais realizadas, respectivamente. É importante destacar que a concentração inicial de células em ambos os trabalhos são similares, variando entre 2 a 14 g L^{-1} no presente trabalho e 6 a 12 g L^{-1} para Andrade et al. (2013).

No presente trabalho, todos os meios de fermentação foram suplementados com extrato de levedura e sais, enquanto que Andrade et al. (2013) não adicionaram nutrientes nas fermentações e sim, antibióticos, e este fator provavelmente contribuiu para os melhores resultados obtidos no presente trabalho. Andrade et al. (2013) utilizaram melaço (co-produto da indústria do açúcar) para atingir alta concentração de açúcar para a fermentação, o qual é composto de (% m/m) açúcares totais (54 ± 4), óxido de fósforo ($0,039 \pm 0,030$), óxido de cálcio ($0,475 \pm 0,325$), óxido de magnésio ($0,525 \pm 0,275$), óxido de potássio ($1,5 \pm 0,7$), dióxido de silício ($0,175 \pm 0,125$), óxido de alumínio ($0,025 \pm 0,015$), Fe_2O_3 ($0,0055 \pm 0,0045$), cinzas ($5,5 \pm 2$), nitrogênio ($0,29 \pm 0,21$), somatório dos ácidos cítrico, málico, succínico, mesacónico ($1,8 \pm 0,7$), ácido aconítico ($3,5 \pm 2,5$) (ZABRISKIE et al., 1980; JOHNSON et al., 1995). Outro fato que deve ser mencionado é em relação aos melhores resultados obtidos por Andrade et al. (2013), os quais estão associados às fermentações a 34 °C, sendo obtidas produtividades na faixa de $2,25$ a $3 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, com a realização de 6 bateladas.

Estes resultados mostram que o hidrolisado celulósico de bagaço de cana pode ser bem utilizado pela levedura, sem a necessidade de suplementação com melaço, no processo de fermentação alcoólica empregando a técnica de reciclo celular, com boas

possibilidades de ampliação de escala para este processo dentro da cadeia de produção do etanol de segunda geração.

5.9 Caracterização química das ligninas obtidas no processo de deslignificação em escala piloto dos bagaços pré-tratados com os ácidos fosfórico e sulfúrico.

Após a realização dos dois experimentos de deslignificação em reator piloto nas melhores condições reacionais escolhidas para ampliação de escala, além das polpas celulósicas, também foram obtidos os licores negros ricos em lignina, como subprodutos deste processo. Estes licores (obtidos em pH próximo de 12) foram precipitados até pH 2, com H_2SO_4 98 % comercial, em um tanque misturador, sendo posteriormente lavados até pH próximo de 6 para remoção do excesso de ácido. Após este procedimento, a lignina sólida obtida foi mantida em estufa de ventilação forçada, a 50 °C, para secagem e posteriormente reservada para as análises apresentadas a seguir.

5.9.1 Análise físico química

Esta análise foi conduzida de forma a avaliar principalmente a quantidade de carboidratos ainda presente nas ligninas. De acordo com Wörmeyer et al. (2011), os produtos de lignina devem ser livres de carboidratos, apresentar alta quantidade de lignina insolúvel em ácido, e não conterem enxofre, para que sejam aplicados na área de polímeros. A tabela 5.23 a seguir mostra um resumo da análise composicional das ligninas obtidas de bagaço pré-tratado com os ácidos fosfórico e sulfúrico.

Tabela 5.23 – Composição química das ligninas obtidas de bagaço pré-tratado e deslignificado

Amostras	Carboidratos (% m/m)	Lignina Insolúvel (% m/m)	Lignina Solúvel (% m/m)	Cinzas (% m/m)	Total (% m/m)
Lignina de bagaço pré-tratado (H_3PO_4)	1,2	94,0	3,1	0,2	98,5
Lignina de bagaço pré-tratado (H_2SO_4)	1,1	91,4	3,5	1,9	97,9

Analisando os resultados da tabela 5.23 vê-se que as ligninas apresentaram pequenas quantidades de carboidrato (aproximadamente 1 %). Já em relação ao teor de lignina insolúvel nas amostras, a lignina obtida do bagaço pré-tratado por H_3PO_4 e deslignificado apresentou 94 %, valor este um pouco maior do que o obtido para a lignina de bagaço pré-tratado por H_2SO_4 , que foi de 91,4 %. Os teores de lignina insolúvel nestas amostras ficaram relativamente próximos, diferindo apenas na quantidade de cinzas, a qual se apresentou maior na amostra proveniente do bagaço pré-tratado por H_2SO_4 .

De uma forma geral, estes resultados foram bem próximos aos encontrados por Wörmeyer et al. (2011) para ligninas obtidas de processo de polpação soda de palha de centeio. Estes autores mostram que o processo soda é satisfatório na obtenção de ligninas com alta pureza visando sua aplicação em química de polímeros.

5.9.2 Análise elementar

A análise elementar foi utilizada para avaliar os teores de carbono, hidrogênio, nitrogênio, enxofre e oxigênio nas ligninas, sendo este parâmetro muito importante na obtenção da fórmula mínima da lignina, conforme será mostrada no final desta tese.

A tabela 5.24 traz um resumo da análise elementar para as duas ligninas obtidas neste trabalho. Os teores de carbono foram corrigidos pelas cinzas e o conteúdo de oxigênio foi obtido por diferença.

Tabela 5.24 – Resultados de análise elementar para as ligninas obtidas.

Amostra	Carbono (% m/m)	Hidrogênio (% m/m)	Nitrogênio (% m/m)	Enxofre (% m/m)	Oxigênio (% m/m)
Lignina de bagaço pré-tratado (H_3PO_4)	62,77	6,10	0,52	0,18	30,43
Lignina de bagaço pré-tratado (H_2SO_4)	59,88	5,99	0,60	0,48	33,05

Todas as análises apresentadas acima foram realizadas em duplicata

Pode-se observar que as quantidades de carbono e hidrogênio nas ligninas ficaram em torno de 60 e 6 %, respectivamente, com teor de nitrogênio um pouco acima de 0,5 %. O teor de enxofre para a lignina de bagaço pré-tratado com H_2SO_4 apresentou-se maior em relação à lignina de bagaço pré-tratado por H_3PO_4 , como esperado devido ao ácido

utilizado no pré-tratamento. Calculado por diferença entre os demais componentes, o teor de oxigênio ficou próximo a 30 % para as amostras analisadas. Estes resultados são semelhantes aos encontrados em estudos de ligninas de bagaço de cana obtidas por processo organossolve (MOUSAVIOUN; DOHERTY, 2010) e em ligninas obtidas de diferentes frações de bagaço de cana (MARABEZI, 2009).

Devido ao fato da lignina apresentar três precursores (Figura 2.6) e não se conhecendo a proporção de cada um na macromolécula de lignina do bagaço, o teor de carbono pode variar entre 57,9, 60,9 e 63,2%, que correspondem aos teores de carbono do álcool sinapílico (unidade siringila), álcool coniferílico (unidade guaiacila) e álcool cumarílico (unidade p-hidroxifenila), respectivamente, acrescidos de uma molécula de água (MARABEZI, 2009). Sendo assim, os resultados apresentados na tabela 5.24 são compatíveis com a fórmula estrutural das ligninas, uma vez que possui um teor de carbono próximo de 60 %.

5.9.3 Cromatografia de permeação em gel (GPC)

A massa molar e a distribuição de massas molares são parâmetros importantes no estudo da estrutura e propriedades da lignina.

O cromatograma das amostras de lignina é apresentado na figura 5.22. Já os valores de massa molar média (M_w) e polidispersidade (D) são apresentados na tabela 5.25.

Figura 5.22 - Distribuição da massa molar média das ligninas obtidas por processo de deslignificação alcalina de bagaço pré-tratado por ácido fosfórico (Lignina H_3PO_4) e sulfúrico (Lignina H_2SO_4).

Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 5.25 – Massa molar das ligninas obtido por cromatografia de permeação em gel

Tipo de lignina	M_w (g/mol)	D
Obtida de deslignificação alcalina de bagaço pré-tratado com H_3PO_4	9500	5,9
Obtida de deslignificação alcalina de bagaço pré-tratado com H_2SO_4	10200	6,0

A partir dos resultados de cromatografia de permeação em gel, observa-se que ambas as ligninas apresentaram valores de massa molar média próximos de 10000 g/mol com polidispersidade 6,0. De acordo com a literatura, a distribuição de massa molar da lignina vai depender do material lignocelulósico de origem e do pré-tratamento pelo qual este material foi submetido (TOLBERT et al., 2014). Dessa forma, o emprego do pré-tratamento ácido diluído, seguido pela etapa de deslignificação alcalina, contribuiu para a obtenção de fragmentos de lignina com elevada massa molar.

Segundo Tejado et al. (2007), produtos de lignina com elevados valores de M_w são adequados para a obtenção de resinas fenólicas modificadas, favorecendo desta forma o uso das ligninas obtidas de bagaço pré-tratado pelos ácidos fosfórico e sulfúrico para esta aplicação.

5.9.4 Análise de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^{31}P

As análises de RMN proporcionaram um estudo estrutural das macromoléculas de lignina, sendo utilizadas neste trabalho para a determinação de importantes grupos funcionais presentes na estrutura das ligninas tais como, hidroxilas alifáticas e fenólicas, grupos carboxila, acetatos alifáticos e aromáticos,

As figuras 5.23 e 5.24 apresentam os espectros de RMN ^{31}P para as ligninas obtidas de bagaço pré-tratado pelos ácidos fosfórico e sulfúrico, respectivamente. Os espectros são acompanhados das tabelas 5.26 e 5.27 as quais trazem os valores calculados, em mmol, dos grupos funcionais por g de lignina. A quantidade de grupos OH foi determinada pela integração do espectro de RMN ^{31}P em relação ao padrão interno.

Figura 5.23 - Espectro quantitativo de RMN ^{31}P de lignina de bagaço de cana (pré-tratado com ácido fosfórico) derivatizada com 2-cloro-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxafosfolano (TMDP) e utilizando colesterol como padrão interno.

Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 5.26 – Valores calculados para os grupos funcionais (mmol/g de lignina).

Amostra	Massa da amostra (g)	OH alifático	OH fenólico condensado	OH siringila	OH guaiacila	p-hidroxifenila	Σ OH aromático	COOH
Lignina de bagaço pré-tratado (H_3PO_4)	0,0395	3,67	0,06	0,41	0,59	0,49	1,56	1,18

Analisando os espectros de RMN ^{31}P obtidos para as duas ligninas (Figuras 5.23 e 5.24), observa-se praticamente o mesmo perfil, independente do tipo de pré-tratamento pelo qual a lignina foi obtida. Também não foram observadas diferenças significativas em relação à quantidade (mmol/g de lignina) dos grupos funcionais encontrados (Tabelas 5.26 e 5.27). Os resultados mostraram que, tanto a lignina de bagaço pré-tratado com ácido fosfórico ou sulfúrico apresentam quantidades próximas dos grupos OH siringila, OH guaiacila e p-hidróxifenila. Este fato poderia ser explicado pela natureza das gramíneas em apresentar quantidades próximas das estruturas fenilpropanóides na lignina (p-hidróxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S)) (GUO et al., 2014).

Figura 5.24 - Espectro quantitativo de RMN ^{31}P de lignina de bagaço de cana (pré-tratado com ácido sulfúrico) derivatizada com 2-cloro-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxafosfolano (TMDP) e utilizando colesterol como padrão interno.

Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 5.27 – Valores calculados para os grupos funcionais (mmol/g de lignina).

Amostra	Massa da amostra (g)	OH alifático	OH fenólico condensado	OH siringila	OH guaiacila	p-hidroxifenila	Σ OH aromático	COOH
Lignina de bagaço pré-tratado (H_2SO_4)	0,0391	3,19	0,08	0,48	0,54	0,47	1,58	1,08

5.9.5 Análise termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica propôs demonstrar o perfil de degradação térmica das ligninas, como uma forma de elucidar as propriedades físico-químicas desta macromolécula. Os resultados desta análise, expressos nos gráficos da figura 5.25, mostraram que ambas as ligninas possuem um mesmo perfil de degradação térmica, com duas etapas diferentes de decomposição indicadas por dois sinais exotérmicos. Um primeiro estágio exotérmico (mais acentuado para a lignina de bagaço pré-tratado por H_2SO_4) ocorreu entre 200 e 370 °C. Abaixo de 200 °C praticamente não foram observadas degradações pronunciadas das ligninas.

Figura 5.25 - Termogramas obtidos para as ligninas de bagaço de cana provenientes dos pré-tratamento com os ácidos: fosfórico (A) e sulfúrico (B).

Fonte: Arquivo pessoal.

Um segundo estágio exotérmico apresentou-se na faixa de temperatura entre 410 e 450 °C, o qual foi mais acentuado do que o primeiro. De acordo com Lehnén et al. (2006), o segundo estágio exotérmico, muito comum em degradação térmica de ligninas, pode ser atribuído à combustão do carvão que é gerado pela decomposição de fragmentos de ligações inter-unidades ou compostos aromáticos condensados. Uma das características importantes da lignina é o fato dela ser uma macromolécula amorfa, e com isso se comportar como um material termoplástico (LIN; DENCE, 1992). Dessa forma, possui um ponto de transição vítrea (T_g) (ou de amolecimento), que varia consideravelmente conforme a origem e o método utilizado para o seu isolamento, geralmente variando entre as temperaturas de 140 e 165 °C (VARANASI et al., 2013).

A seguir, os gráficos da figura 5.26 apresentam as curvas de calorimetria diferencial de varredura juntamente com as temperaturas de transição vítrea para as ligninas, as quais foram de aproximadamente 140 °C para a lignina de bagaço pré-tratado por ácido fosfórico e 160 °C para a lignina de bagaço pré-tratado por ácido sulfúrico. Estes valores ficaram bem próximos aos encontrados na literatura para lignina de bagaço de cana obtida por processo organossolve (130 – 154 °C) (MOUSAVIOUN; DOHERTY, 2010) e por processo soda (156 °C) (LEHNEN et al., 2006). De uma forma geral, é bastante complexa a determinação precisa do ponto de transição vítrea para ligninas de biomassas vegetais em virtude da complexidade de sua estrutura macromolecular, a qual depende de diversos fatores como a origem da amostra, sua estrutura, flexibilidade e peso molecular, presença de componentes de baixo peso molecular e quantidade de água presente (LEHNEN et al., 2006).

Figura 5.26 - Curvas de calorimetria diferencial de varredura para as ligninas de bagaço de cana pré-tratado pelos ácidos: fosfórico (A) e sulfúrico (B).

Fonte: Arquivo pessoal.

5.9.6 Determinação do poder calorífico superior (PCS)

Os resultados referentes ao poder calorífico (Tabela 5.28) forneceram o potencial energético das ligninas. Embora a lignina tenha um potencial muito grande na obtenção de químicos de aplicação industrial, ela apresenta um alto poder calorífico sendo utilizada como combustível (DOHERTY; MOUSAVIOUN; FELLOWS, 2011).

Tabela 5.28 – Poder calorífico superior das ligninas de bagaço de cana-de-açúcar

Amostra	Poder calorífico (MJ/Kg)
Lignina de bagaço pré-tratado (H ₃ PO ₄)	25,3
Lignina de bagaço pré-tratado (H ₂ SO ₄)	24,5

Observando-se os resultados da tabela 5.28 vê-se que, independente do pré-tratamento empregado, o poder calorífico das ligninas de bagaço de cana ficaram bem próximos a 25 MJ/Kg, estando de acordo com estudos já realizados de poder calorífico de ligninas (GÜNTHER et al., 2012; HORST, 2013). Pelos resultados de análise elementar, verificou-se que as ligninas apresentam em média 60% de carbono e 30% de oxigênio em sua constituição.

De acordo com a literatura, a lignina apresenta maiores teores de carbono e menores teores de oxigênio em relação aos carboidratos presentes na constituição dos materiais lignocelulósicos (FENGEL; WEGENER, 1989). Altas quantidades de carbono e hidrogênio favorecem o maior poder calorífico, sendo o oposto para elevadas quantidades

de oxigênio (HORST, 2013). Dessa forma, quanto mais pura (livre de carboidratos) a lignina estiver maior será o seu poder calorífico.

5.9.7 Pirólise acoplada à cromatografia gasosa e espectrometria de massas (Pyr-GC/MS)

A técnica de pirólise analítica proporcionará a fragmentação da lignina por energia térmica, em atmosfera inerte, produzindo uma mistura de compostos oriundos das unidades p-hidroxifenila, guaiacila e siringila, os quais são separados por cromatografia gasosa e identificados por espectrometria de massas (BUTLER et al., 2013). No presente trabalho foi feito um estudo semiquantitativo diretamente através das áreas dos picos as quais foram obtidas por meio da integração dos sinais registrados nos cromatogramas.

As figuras 5.27 e 5.28 mostram os cromatogramas dos principais produtos de degradação por pirólise para as ligninas obtidas de bagaço de cana pré-tratado pelos ácidos fosfórico e sulfúrico, respectivamente. Na sequência, as tabelas 5.29 e 5.30 listam a distribuição dos compostos nas ligninas.

Figura 5.27 - Cromatograma representativo da lignina de bagaço de cana-de-açúcar (pré-tratado com H_3PO_4) com os principais picos identificados: (1) guaiacol, (2) 4-metilguaiacol, (3) 4-etilguaiacol, (4) 4-vinilguaiacol, (5) 4-vinilfenol, (6) siringol, (7) 4-propenilguaiacol, (8) 4-metilsiringol, (9) 4-vinilsiringol, (10) 4-(1-propenil)-trans siringol, (11) siringaldeído e (12) acetosiringona.

Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 5.29 – Distribuição dos compostos presentes na lignina de bagaço de cana-de-açúcar (proveniente do pré-tatamento com H₃PO₄).

Grupo de compostos	Área do cromatograma (%)
Não aromáticos	0,33
Aromáticos	97,09
Benzeno	0,81
Fenólicos derivados de lignina	31,32
Guaiacóis (metóxifenóis)	30,89
Siringóis (dimetóxifenóis)	34,07
Compostos não identificados	2,58
Total	100,00

Analizando os resultados de pirólise analítica, observam-se perfis cromatográficos muito parecidos para ambas as ligninas com a presença praticamente total de compostos aromáticos, os quais estão divididos em fenólicos derivados de lignina, guaiacóis, siringóis (em maior porcentagem) e uma pequena porcentagem de benzeno. Menos de 0,5 % das áreas dos cromatogramas foi atribuída a compostos não aromáticos.

As diferenças observadas em relação aos compostos não identificados e a melhor distribuição das unidades de fenólicos derivados, guaiacóis e siringóis na lignina de bagaço pré-tratado por ácido fosfórico em relação à lignina de bagaço pré-tratado por ácido sulfúrico podem ser atribuídas aos diferentes processos de pré-tratamento pelos quais o bagaço de cana foi submetido.

Os compostos derivados de lignina mais proeminentes nos cromatogramas foram o 4-vinilguaiacol e 4-vinilfenol, fato também observado por Lino et al. (2014) em estudos de pirólise de lignina extraída de bagaço de cana “in natura”. Estes autores atribuem a alta quantidade liberada de 4-vinilfenol principalmente devido à presença de unidades p-cumarato as quais são descarboxiladas eficientemente nas condições pirolíticas. Da mesma forma, 4-vinilguaiacol, presente em alta quantidade entre os produtos de pirólise, resulta de ferulatos depois da descarboxilação promovida pelo processo pirolítico.

A técnica de pirólise analítica vem comprovar também a presença de todas as unidades (p-hidroxifenila, guaiacila e siringila) como constituintes da fração aromática das amostras de lignina estudadas, sendo esta uma característica para ligninas provenientes de bagaço de cana-de-açúcar.

Figura 5.28 – Cromatograma representativo da lignina de bagaço de cana-de-açúcar (pré-tratado com H_2SO_4) com os principais picos identificados: (1) fenol, (2) guaiacol, (3) 4-metilguaiacol, (4) 4-etilguaiacol, (5) 4-vinilguaiacol, (6) 4-vinilfenol, (7) siringol, (8) 4-metilsiringol, (9) 4-vinilsiringol, (10) 4-(1-propenil)-trans siringol, (11) siringaldeído e (12) acetosiringona.

Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 5.30 - Distribuição dos compostos presentes na lignina de bagaço de cana-de-açúcar (proveniente do pré-tatamento com H_2SO_4).

Grupo de compostos	Área do cromatograma (%)
Não aromáticos	0,19
Aromáticos	99,44
Benzeno	1,51
Fenólicos derivados de lignina	24,31
Guaiacóis (metóxifenóis)	33,15
Siringóis (dimetóxifenóis)	40,47
Compostos não identificados	0,37
Total	100,00

5.9.8 Espectroscopia na região do infravermelho (IV)

A análise de espectroscopia na região do infravermelho (IV) foi também utilizada como ferramenta para a compreensão das estruturas de ligninas isoladas e informação sobre grupos químicos removidos e ou adicionados durante os processos de seu isolamento. Os espectros na região de 800 a 2000 cm^{-1} são apresentados na figura 5.29. Já os espectros na região de 4000 a 2000 cm^{-1} não foram apresentados, pois trata-se de uma região pouco diferenciada para as ligninas, onde aparecem bandas referentes a estiramentos de ligações O-H e C-H (GONÇALVES, 1995). A tabela 5.31 mostra um resumo das

bandas principais bem como dos valores relativos de absorbância. As atribuições foram feitas tomando-se como referência outros trabalhos já realizados com caracterização química de ligninas por espectroscopia no IV (FAIX, 1992; GONÇALVES, 1995; MARABEZI, 2009).

Figura 5.29 - Espectro de infravermelho para as ligninas obtidas

Fonte: Arquivo pessoal.

Analizando os espectros da figura 5.29, veem-se poucas diferenças entre as duas ligninas em relação às bandas esperadas e suas intensidades. Em geral as diferenças espectrais em ligninas são principalmente o resultado da variação nas razões entre as quantidades dos grupos H (hidroxifenila), G (guaiacila) e S (siringila), dependendo da origem do material lignocelulósico e do pré-tratamento pelo qual foi submetido.

Por exemplo, as diferentes relações entre as intensidades das bandas de anéis aromáticos em aproximadamente 1504 e 1594 cm⁻¹ podem ser utilizadas para diferenciar as ligninas de coníferas e gramíneas. Se as intensidades entre estas bandas forem aproximadamente iguais (como mostrado no espectro acima), pode-se atribuir este comportamento para ligninas de gramíneas (BYKOV, 2008). Já para as coníferas, a intensidade da banda em 1504 tende a ser maior do que em 1594 cm⁻¹. Para as demais bandas apresentadas, verifica-se que as mesmas se enquadram dentro dos padrões estabelecidos para ligninas do tipo HGS, que correspondem às ligninas de bagaço de cana-de-açúcar.

Tabela 5.31 – Valores e atribuições dos picos característicos em ligninas.

Banda cm^{-1}		Atribuições
Lignina (H_2SO_4)	Lignina (H_3PO_4)	
1690	1690	Estiramento C=O de cetonas e grupos éster (frequentemente originados de carboidratos); aldeídos e ácidos carboxílicos absorvem na região de 1700 cm^{-1} .
-	1631	Estiramento C=O em cetonas conjugadas p-substituídas e em aril-cetonas.
1594	1594	Vibração do anel aromático.
1504	1507	Vibração do anel aromático.
1458	1458	Deformação assimétrica C-H, em $-\text{CH}_3$ e $-\text{CH}_2$.
1420	1420	Vibração do anel aromático combinado com deformação no plano de C-H.
1325	1325	Deformação C-O anel siringila e/ou anel guaiacila condensado.
1218	1218	Estiramento C-C e C-O.
1119	1119	Deformação C-H do anel aromático no plano (típico de unidades siringila)
1027	1027	Deformação no plano de C-H aromático; deformação C-O em álcoois primários; influenciada por estiramento C=O não conjugado.
833	833	Estiramento C-H fora do plano nas posições 2 e 6 de siringila, guaiacila e em todas as posições da unidade hidróxifenila.

Nos estudos de química de lignina é comum apresentar a fórmula empírica desta macromolécula a qual é referenciada como uma unidade estrutural hidróxifenila, conhecida como fórmula C_9 , com 6 átomos de carbono no anel benzênico juntamente com 3 átomos de carbono na cadeia propílica lateral. Além dos 9 átomos de carbono, apenas o átomo de carbono da unidade metoxila ($-\text{OCH}_3$) está presente na macromolécula. Dessa forma, para o cálculo da fórmula C_9 a primeira etapa é determinar o teor de grupos metoxila e subtrair do total de carbono presente. No presente trabalho, foram obtidos 16,28 e 14,29 % de grupos metoxila para as ligninas de bagaço pré-tratado com ácido fosfórico e sulfúrico, respectivamente. Subtraindo estes valores do total de átomos de carbono e oxigênio bem como descontando os átomos de hidrogênio correspondentes às unidades metoxila pode-se obter as fórmulas $\text{C}_9\text{H}_{8,57}\text{O}_{2,64}(\text{OCH}_3)_{1,00}$ para a lignina (ácido fosfórico) e $\text{C}_9\text{H}_{9,05}\text{O}_{3,19}(\text{OCH}_3)_{0,92}$ para a lignina (ácido sulfúrico).

6 CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho permitem concluir que:

- O ácido sulfúrico diluído, como catalisador na etapa de pré-tratamento do bagaço de cana, promoveu uma remoção cerca de 40 % maior da fração hemicelulósica do que o ácido fosfórico diluído, o qual preservou cerca de 10 % a mais de celulose, nesta etapa, do que o ácido sulfúrico. Os fatores concentração de NaOH e relação sólido-líquido apresentaram maior influência do que os fatores tempo e temperatura, no processo de deslignificação alcalina dos bagaços pré-tratados.
- Após cada etapa de processamento (pré-tratamento e deslignificação) do bagaço de cana-de-açúcar observou-se pela técnica de difração de raios X um aumento de cristalinidade da celulose, proporcionada pela remoção de hemicelulose e lignina. As fotomicrografias ilustraram uma maior exposição das fibras celulósicas no bagaço de cana após a deslignificação alcalina. Já a técnica de calorimetria diferencial de varredura mostrou um aumento da quantidade de poros de tamanho da ordem de 100 nm na estrutura da celulose do bagaço, ao longo de seu processamento.
- A conversão enzimática da fração celulósica do bagaço de cana-de-açúcar em glicose é aumentada consideravelmente à medida que são removidas maiores quantidades de hemicelulose e lignina.
- O ensaio de fermentabilidade mostrou que o hidrolisado celulósico foi bem assimilado pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* Pe-2, com a possibilidade da realização de cinco bateladas sucessivas, sendo obtidos valores de 0,45 g/g para $Y_{P/S}$ e 5,81 g L⁻¹h⁻¹ para produtividade.
- As ligninas obtidas mostraram características muito parecidas entre si sendo as diferenças atribuídas aos processos de pré-tratamento e deslignificação pelos quais o bagaço de cana-de-açúcar foi submetido. De forma geral, as ligninas apresentaram pureza (lignina total) entre 95-97 %, massa molar média entre 9500 e 10200 g mol⁻¹, ponto de transição vítrea entre 140 e 160 °C, poder calorífico na ordem de 25 MJ/kg, sendo obtidas razões H:G:S de 1:0,9:1,1 para a lignina de bagaço pré-tratado com ácido fosfórico e 1:1,4:1,7 para a lignina de bagaço pré-tratado com ácido sulfúrico.

REFERÊNCIAS

- ALCOOLBRAS. **A hora é agora**, 2005. Disponível em http://www.editoravalete.com.br/site_alcoolbras/edicoes/ed_95/ed_95a.html. Acesso em 13 de abril de 2012.
- ANDRADE, R. R. **Modelagem cinética do processo de produção de etanol a partir de hidrolisado enzimático de bagaço de cana-de-açúcar concentrado com melaço considerando reciclo de células**. 2012. 262p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.
- ANDRADE, R. R.; MAUGERI FILHO, F.; MACIEL FILHO, R.; COSTA, A. C. Kinetics of ethanol production from sugarcane bagasse enzymatic hydrolysate concentrated with molasses under cell recycle. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 351-359, 2013.
- ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, v.3, p.1-11, 2010.
- ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Cellulose accessibility limits the effectiveness of minimum cellulase loading on the efficient hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates. **Biotechnology for Biofuels**, v.4, p.1-16, 2011.
- BALLESTEROS, M.; OLIVA, J. M.; NEGRO, M. J.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, I. Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. **Process Biochemistry**, v.39, p.1843-1848, 2004.
- BASSO, L. C.; BASSO, T. O.; ROCHA, S. N. Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. In: BERNARDES, M. A. S. (Org.). **Biofuel production** – recent developments and prospects. Intech, 2011, p.85-100.
- BASSO, L. C.; DE AMORIM, H. V.; DE OLIVEIRA, A. J.; LOPES, M. L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 7, p. 1155-1163, 2008.
- BASTOS, V. D. **Etanol, álcoolquímica e Biorrefinarias**, 2007. Disponível em <http://www.bndes.gov.br>. Acesso em 06 de dezembro de 2008.
- BEHERA, S.; ARORA, R.; NANDHAGOPAL, N.; KUMAR, S. Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.36, p.91-106, 2014.
- BELGACEM, M. N.; GANDINI, A. **Monomers, polymers and composites from renewable resources**. Oxford: Elsevier, 2008.
- BERTONCINI, E. I. In: Workshop: ASPECTOS AMBIENTAIS DA CADEIA DO ETANOL DE CANA-DE-AÇÚCAR. Painel IV: Geração de Resíduos da Indústria da Cana-de-açúcar, 2008. Disponível em: <http://www.apta.sp.gov.br/cana>. Acesso em 17 de agosto de 2008.
- BIOETANOL de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável. Rio de Janeiro: BNDES, 2008. 316p.
- BIOMASS RESEARCH AND DEVELOPMENT TECHNICAL ADVISORY COMMITTEE, 2002. **Roadmap for biomass technologies in the United States**. Disponível em: <http://www.brdisolutions.com/pdfs/FinalBiomassRoadmap.pdf>. Acesso em 28 de janeiro de 2009.
- BLANCH, H. W.; SIMMONS, B. A.; KLEIN-MARCUSCHAMER, D. Biomass deconstruction to sugars. **Biotechnology Journal**, v.6, p.1086-1102, 2011.
- BNDES. **BNDES financiará 1ª unidade integrada de etanol de segunda geração do mundo**, 2013. Disponível em:

http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/bndes/bndes_pt/Institucional/Sala_de_Imprensa/Noticias/2013/Todas/20130912_raizen.html. Acesso em 8 de abril de 2014.

BONOMI, A.; FELIPE, M. G. A. **Novo modelo industrial e usos finais do etanol**. In: Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade. São Paulo: Blucher, 2010.

BRASIL. **Decreto no 47.700, de 11 de março de 2003**. Disponível em <http://www.al.sp.gov.br/norma/?id=1724>. Acesso em 25 de janeiro de 2009.

BRETHAUER, S.; WYMAN, C. E. Review: continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. **Bioresource Technology**. 101 (13), p.4862–4874, 2010.

BRITO, F. L. S. **Biodigestão anaeróbia em duplo estágio do bagaço de cana-de-açúcar para obtenção de biogás**. 2011. 184p. Dissertação (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

BUTLER, E.; DEVLIN, G.; MEIER, D.; MCDONNELL, K. Characterisation of spruce, salix, miscanthus and wheat straw for pyrolysis applications. **Bioresource Technology**, v.131, p.202-209, 2013.

BYKOV, I. **Characterization of Natural and Technical Lignins using FTIR Spectroscopy**. 2008. 41f. Master's Thesis – Lulea University of Technology, Lulea, 2008.

CANDIDO, R. G.; GODOY, G. G.; GONÇALVES, A. R. Study of sugarcane bagasse pretreatment with sulfuric acid as a step of cellulose obtaining. **World Academy of Science, Engineering and Technology**, v.6, p.79-83, 2012.

CANNELLA, D.; JORGENSEN, H. Do New Cellulolytic Enzyme Preparations Affect the Industrial Strategies for High Solids Lignocellulosic Ethanol Production? **Biotechnology and Bioengineering**, v.111, p.59-68, 2014.

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.

CHANDEL, A. K.; ANTUNES, F. A. F.; ARRUDA, P. V.; MILESSI, T. S. S.; SILVA, S. S.; FELIPE, M. G. A. Dilute acid hydrolysis of agro-residues for the depolymerization of hemicellulose: State-of-the-Art. In D-Xylitol, SILVA, S. S.; CHANDEL, A. K., Eds., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2012a, p.39-61.

CHANDEL, A. K.; JUNQUEIRA, T. L.; MORAIS, E. R.; GOUVEIA, V. L. R.; CAVALETT, O.; RIVERA, E. C.; GERALDO, V. C.; BONOMI, A.; SILVA, S. S. Techno-Economic Analysis of Second-Generation Ethanol in Brazil: Competitive, Complementary Aspects with First-Generation Ethanol. In Biofuels in Brazil, CHANDEL, A. K.; SILVA, S. S., Eds., Springer Verlag; Berlin, 2014, p.1.

CHANDEL, A. K.; SILVA, S. S.; CARVALHO, W.; SINGH, O. M. Sugarcane bagasse and leaves: foreseeable biomass of biofuel and bio-products. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.87, p.11-20, 2012b.

CHATURVEDI, V.; VERMA, P. An overview of key pretreatment processes employed for bioconversion of lignocellulosic biomass into biofuels and value added products. **3 Biotech**, v. X, p.1-17, 2013.

CHEN, H.; HAN, J.; XU, J. Simultaneous saccharification and fermentation of steam exploded wheat straw pretreated with alkaline peroxide. **Process Biochemistry**, p.5-9, 2008.

CHEN, M.; ZHAO, J.; XIA, L. Enzymatic hydrolysis of maize straw polysaccharides for the production of reducing sugars. **Carbohydrate Polymers**, v.71, p.411-415, 2008.

CHERUBINI, F.; STROMMAN, A. H. Chemicals from lignocellulosic biomass: opportunities, perspectives, and potential of biorefinery systems. **Biofuels, Bioproducts & Biorefining**, v. 5, p. 548-561, 2011.

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

COLODETTI, J. L.; LONGUE JR, PEDRAZZI, C.; OLIVEIRA, R. C.; GOMIDE, J. L.; GOMES, F. J. B. Pulpability and bleachability of xylan-depleted eucalyptus wood chips. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.50, p.1847-1852, 2011.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar, Terceiro Levantamento**, Brasília, dez. 2013, p.1-15.

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.

CORREDOR, D. Y.; BEAN, S.; WANG, D. Pretreatment and enzymatic hydrolysis of sorghum bran. **Cereal Chemistry**, v.84, p.61-66, 2007.

DANTAS FILHO, P. L. **Análise de custos na geração de energia com bagaço de cana-de-açúcar: um estudo de caso em quatro usinas de São Paulo**. 2009. 175p. Dissertação (Mestrado em Energia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

DARKU, I. D.; RICHARD, T. L. Biofuels: ethanol producers. John Wiley & Sons, 2011.

DEMIRBAS, A. Progress and recent trends in biofuels. **Progress in Energy and Combustion Science**, v.33, p.1–18, 2007.

DEMIRBAS, A. Products from lignocellulosic materials via degradation processes. **Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects**. v. 30, p. 27-37, 2008.

DEMIRBAS, A. Political, economic and environmental impacts of biofuels: A review. **Applied Energy**, v.86, p.108-117, 2009.

DOHERTY, W.; MOUSAVIOUN, P.; FELLOWS, C. Value-adding to cellulosic ethanol: Lignin polymers. **Industrial Crops and Products**, v.33, n.2, p.259-276, 2011.

DOHERTY, B.; RAINEY, T. Bagasse fractionation by the soda process. In HOGARTH, D (Ed.) THE AUSTRALIAN SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS 2006, 2-5 May 2006, Australia, Queensland, Mackway.

DRIEMEIER, C.; BRAGATTO, J. Crystallite width determines monolayer hydration across a wide spectrum of celluloses isolated from plants. **The Journal of Physical Chemistry B**, v.117, p.415-421, 2013.

DRIEMEIER, C.; CALLIGARIS, G. A. 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 to probe water in celluloses. **Cellulose**, 2012.

EERE - Office of Energy Efficiency and Renewable Energy and Office of Science. BIOMASS research and development board. Disponível em: <http://www.eere.energy.gov/>. Acesso em 15 de fevereiro de 2009.

ERDEI, B.; HANCZ, D.; GALBE, M.; ZACCHI, G. SSF of steam-pretreated wheat straw with the addition of saccharified of fermented wheat meal in integrated bioethanol production. **Biotechnology for Biofuels**, p.1-14, 2013.

ETANOL e bioeletricidade: a cana-de-açúcar no futuro da matriz energética, 2010. Disponível em <http://www.unica.com.br>. Acesso em 20 de junho de 2011.

FAIX, O. Fourier Transform Infrared Spectroscopy. In: LIN, S. Y.; DENCE, C. W. (Ed.) **Methods in lignin chemistry**. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, 1992, p.83-109.

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. **Um futuro com energia sustentável: iluminando o caminho**. Disponível em <http://www.fapesp.br/publicacoes/energia.pdf>. Acesso em 12 de fevereiro de 2012.

FELIPE, M. G. A. A qualidade da matéria-prima na produção de etanol de cana-de-açúcar. In: **BIOETANOL de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade**. São Paulo: Blucher, 2010.

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

FONTANA, J. D.; CORREA, J. B. C.; DUARTE, J. H.; BARBOSA, A. M.; BLUMEL, M. Aqueous Phosphoric Acid Hydrolysis of Hemicelluloses from Sugarcane and Sorghum Bagasses. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, n. 14, p.175-186, 1984.

FUTUROS DO PETRÓLEO OPERAM EM BAIXA. **O Estado de São Paulo**, São Paulo, 2014. Caderno Economia & Negócios. Disponível em <http://economia.estadao.com.br/noticias/mercados,futuros-do-petroleo-operam-em-baixa,178427e>. Acesso em 24 de fevereiro de 2014.

GÁMEZ, S.; GONZÁLEZ-CABRIALES, J. J.; RAMÍREZ, J. A.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. **Journal of Food Engineering**, v.74, p.78-88, 2006.

GARCÍA, A.; TOLEDANO, A.; SERRANO, L.; EGÜÉS, I.; GONZÁLEZ, M.; MARÍN, F.; LABIDI, J. Characterization of lignins obtained by selective precipitation. **Separation and Purification Technology**, v.68, p.193-198, 2009.

GHAFFAR, S. H.; FAN, M. Structural analysis for lignin characteristics in biomass straw. **Biomass and Bioenergy**, v.57, p.264-279, 2013.

GÓMEZ, E. O.; SOUZA, R. T. G.; ROCHA, G. J. M.; ALMEIDA, E.; CORTEZ, L. A. B. A palha de cana-de-açúcar como matéria-prima para processos de segunda geração. In: **BIOETANOL de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade**. São Paulo: Buchner, 2010.

GOMEZ-RUEDA, S. M. **Pré-tratamento e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar**. 2010. 130p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

GONÇALVES, A. R. **Oxidação de ligninas e modelos de lignina com oxigênio molecular em meio ácido**. 1995. 80 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1995.

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.

GRANATA, A.; ARGYROPOULOS, D. S. 2-Chloro-4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaphospholane, a reagent for accurate determination of the uncondensed and condensed phenolic moieties in lignins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.43, p.1538-1544, 1995.

GÜNTHER, B.; GEBAUER, K.; BARKOWSKI, R.; ROSENTHAL, M.; BUES, C-T. Calorific value of selected wood species and wood products. **European Journal of Wood and Wood Products**, v.70, p.755-757, 2012.

GUO, G.-L.; HSU, D.-C.; CHEN, W.-H.; CHEN, W.-H.; HWANG, W.-S. Characterization of enzymatic saccharification for acid-pretreated lignocellulosic materials with different lignin composition. **Enzyme and Microbial Technology**, v.45, p.80-87, 2009.

- GUO, F.; SHI, W.; SUN, W.; LI, X.; WANG, F.; ZHAO, J.; QU, Y. Differences in the adsorption of enzymes onto lignins from diverse types of lignocellulosic biomass and the underlying mechanism. **Biotechnology for Biofuels**, p.1-10, 2014.
- HAHN-HÄGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSLUND, M. F.; LIDÉN, G.; ZACCHI, G. Bioethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends in Biotechnology**, v.24, 2006.
- HAMELINCK, C. N.; HOOIJDONK, G. V.; FAAIJ, A. P. C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. **Biomass and Bioenergy**, v. 28, p.384-410, 2005.
- HAQUE, Md. A.; BARMAN, D. N.; KANG, T. H.; KIM, M. K.; KIM, J.; KIM, H.; YUN, H. D. Effect of dilute alkali pretreatment on structural features and enhanced enzymatic hydrolysis of *Miscanthus sinensis* at boiling temperature with low residence time. **Biosystems Engineering**, v.114, p.294-305, 2013.
- HARMSSEN, P. F. H.; HUIJGEN, W. J. J.; LÓPEZ, L. M. B.; BAKKER, R. R. C. Literature review of physical and chemical pretreatment processes for lignocellulosic biomass, 2010. Disponível em <http://www.ecn.nl/docs/library/report/2010/e10013.pdf>. Acesso em 14 de abril de 2012.
- 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.; JOHNSON, 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.
- HIMMEL, M. E.; RUTH, M. F.; WYMAN, C. E. **Current Opinion in Biotechnology**, v.10, p.358-364, 1999.
- HODGE, D. B.; KARIM, M. N.; SCHELL, D. J.; MCMILLAN, J. D. Soluble and insoluble solids contributions to high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Bioresource Technology**, v.99, p.8940-8948, 2008.
- HORST, D. J. **Avaliação da produção energética a partir de ligninas contidas em biomassas**. 2013. 106p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) – Universidade Federal Tecnológica do Paraná, Ponta Grossa, 2013.
- HUANG, R.; SU, R. X.; QI, W.; HE, Z. M. Understanding the key factors for enzymatic for enzymatic conversion of pretreated lignocelluloses by partial least square analysis. **Biotechnology Progress**, v.26, p.384-392, 2010.
- HUANG, R.; SU, R.; QI, W.; HE, Z. Bioconversion of lignocellulose into bioethanol: process intensification and mechanism research. **Bioenergy Research**, v.4, p.225-245, 2011.
- INTERNATIONAL ENERGY AGENCY, 2010. **CO₂ emissions from fuel combustion**. 2010.
- ISHIZAWA, C. I.; DAVIS, M. F.; SCHELL, D. F.; JOHNSON, D. K. Porosity and Its Effect on the Digestibility of Dilute Sulfuric Acid Pretreated Corn Stover. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.2575-2581, 2007.
- JOHNSON, V. W.; SINGH, M.; SAINI, V. S.; ADHIKARI, D. K.; SISTA, V.; YADAV, N. K. Utilization of molasses for the production of fat by an oleaginous yeast, *Rhodotorula glutinis* IIP-30. **Journal of Industrial Microbiology**, v.14, p.1-4, 1995.
- KAMM, B.; KAMM, M. Principles of biorefineries. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.64, p.137–145, 2004.
- KELLER, F. A. Integrated bioprocess development. In: WYMAN, C.E. (Ed.). **Handbook on bioethanol: production and utilization**, Washington: Taylor & Francis, 1996. Cap. 17, p. 381-394.

KHUONG, L. D.; KONDO, R.; LEON, R. D.; ANH, T. K.; SHIMIZU, K.; KAMEI, I. Bioethanol production from alkaline-pretreated sugarcane bagasse by consolidated bioprocessing using *Phlebia* sp. MG-60. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.88, p.62-68, 2014.

KIM, S.; HOLTZAPPLE, M. T. Effect of structural features on enzyme digestibility of corn stover. **Bioresource Technology**, v.97, p.583-591, 2006.

KIM, S. R.; PARK, Y. C.; JIN, Y. S.; SEO, J. H. Strain engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced xylose metabolism. **Biotechnology Advances**, v.31, p.851-861, 2013.

KUMAR, R.; WYMAN, C. E. Pretreated biomass that influence macro-/micro-accessibility and biological processing. In: WYMAN, C. E. (Ed.), **Aqueous pretreatment of plant biomass for biological and chemical conversion to fuels and chemicals**. John Wiley & Sons, 2013, p.281-310.

LANDAETA, R.; AROCA, G.; ACEVEDO, F.; TEIXEIRA, J. A.; MUSSATTO, S. I. Adaptation of a flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strain to lignocellulosic inhibitors by cell recycle batch fermentation. **Applied Energy**, v.102, p.124-130, 2013.

LEHNEN, R.; HEITMANN, M.; ABÄCHERLI, A.; ZIEGLER, B.; SAAKE, B. The effect of sample preparation on the thermal analysis of technical lignins by differential scanning calorimetry. In: EUROPEAN WORKSHOP ON LIGNOCELLULOSICS AND PULP "ADVANCES IN CHEMISTRY AND PROCESSING OF LIGNOCELLULOSICS", 9., 2006. Wien/Österreich, p.354-357.

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

LI, J.; GELLERSTEDT, G.; TOVEN, K.. Elucidation and quantification of pseudolignin structures formed during steam explosion. **Proceedings of International Conference on Pulp, Papermaking and Biotechnology**, p.631-636, 2008.

LIGNOWORKS, 2012. **What is lignin?** Disponível em <http://www.lignoworks.ca/content/what-lignin>. Acesso em 17 de abril de 2012.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotechnologia industrial**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001, v.3.

LIN, S. Y.; DENCE, C. W. **Methods in lignin chemistry**. Berlin: Springer-Verlag, 1992. 568p.

LINO, A. G.; RENCORET, J.; GUTIÉRREZ, A.; COLODETTE, J. L.; LIMA, C. F.; MARTÍNEZ, A. T.; DEL RÍO, J. C. Structural characterization of the lignins from sugarcane bagasse and straw. In: EUROPEAN WORKSHOP ON LIGNOCELLULOSICS AND PULP, 13., 2014. Sevilha, Espanha

LIU, C.; WYMAN, C. E. The effect of flow rate of compressed hot water on xylan, lignin and total mass removal from corn stover. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.42, p.5409-5416, 2003.

LOUREIRO, M. E.; BARBOSA, M. H. P.; LOPES, F. J. P.; SILVÉRIO, F. O. Sugarcane breeding and selection for efficient biomass conversion in cellulosic ethanol. In: BUCKERIDGE, M. S., GOLDMAN, G. H. (Eds), **Routes to cellulosic ethanol**. New York: Springer, 2011, p.199-239.

MALONEY, T. C.; PAULAPURO, H. The formation of Pores in the Cell Wall. **Journal of Pulp and Paper Science**, v.25, p.430-436, 1999.

MANDELS, M.; ANDREOTTI, R.; ROCHE, C. Measurement of saccharifying cellulase. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, v.6, p.21-33, 1976.

MARABEZI, K. **Estudo sistemático das reações envolvidas na determinação dos teores de Lignina e Holocelulose em amostras de Bagaço e Palha de Cana-de-Açúcar**. 2009. 158p. Dissertação (Mestrado em

Ciências Físico-Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

MASARIN, F.; GURPILHARES, D. B.; BAFFA, D. C. F.; BARBOSA, M. H. P.; CARVALHO, W.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. Chemical composition and enzymatic digestibility of sugarcane clones selected for varied lignin content. **Biotechnology for Biofuels**, p.1-10, 2011.

MATANO, Y.; HASUNUMA, T.; KONDO, A. Cell recycle batch fermentation of high-solid lignocellulose using a recombinant cellulose-displaying yeast strain for high yield ethanol production. **Bioresource Technology**, v.135, p.403-409, 2013.

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

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.

McINTOSH, S.; VANCOR, T. Optimisation of dilute alkaline pretreatment for enzymatic saccharification of wheat straw. **Biomass and Bioenergy**, v.35, p.3094-3103, 2011.

McMILLAN, J. D. Pretreatment of lignocellulosic biomass, In: HIMMEL, M. E.; BAKER, J. O.; OVEREND, R. P. (Eds.). *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production*, p.292-324, 1994. ACS Symposium Series.

MEDINA, K. J. D. **Produção de bioetanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar empregando as leveduras *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* NRRL Y-7124 e *Candida shehatae* UFMG HM 52.2 visando à aplicação em bioprocessos com campo eletromagnético**. 2013. 172p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2013.

MEIER, D.; FAIX, O. Pyrolysis-Gas Chromatography-Mass Spectrometry In: LIN, S. Y.; DENCE, C. W. (Eds.) **Methods in Lignin Chemistry**, Berlin: Springer, Berlin, 1992, p.177-199.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p.426-428, 1959.

MIRANDA JÚNIOR, M.; BATISTOTE, M.; CILLI, E. M.; ERNANDES, J. R. Sucrose fermentation by Brazilian ethanol production yeasts in media containing structurally complex nitrogen sources. **J. Inst. Brew**, v. 115, n. 3, p. 191-197, 2009.

MOHAMMED, A. H. **Conversion of lignocellulosic material into fermentable sugars**. 2012. 149p. Tese (Doutorado em Engenharia) - Technischen Universität Berlin, Berlin, 2012.

MONGKOLTHANARUK, W.; DHARMSTHITI, S. Biodegradation of lipid-rich wastewater by a mixed bacterial consortium. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.50, p.101-105, 2002.

MONOT, F.; MARGEOT, A.; HAHN-HÄGERDAL, B.; LINDSTEDT, J.; SLADE, R. The NILE Project – Advances in the Conversion of Lignocellulosic Materials into Ethanol. **Oil & Gas Science and Technology – Rev. IFP Energies nouvelles**, v.68, p.693-705, 2013.

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

MOUSAVIOUN, P.; DOHERTY, W. O. S. Chemical and thermal properties of fractionated bagasse soda lignin. **Industrial Crops and Products**, v.31, p.52-58, 2010.

MUSSATTO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F.; ROBERTO, I. C. Effect of hemicelluloses and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, p. 124-129, 2008.

MUSSATO, S. I.; TEIXEIRA, J. A. Lignocellulose as raw material in fermentation processes. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.). **Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology**, Badajoz: Formatex, 2010, p.897-907.

NIGAM, P. S.; SINGH, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. **Progress in Energy and Combustion Science**, v.37, p.52-68, 2011.

ODEBRECHT Informa, 2011. Química – Visão Ampla. Disponível em: <http://www.odebrechtonline.com.br/materias/02601-02700/2700/?lang=pt>. Acesso em 24 de fevereiro de 2012.

ÖHGREN, K.; BURA, R.; SADDLER, J.; ZACCHI, G. Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover. **Bioresource Technology**, v.98, p.2503-2510. 2007.

OLIVEIRA, F. M. V. **Estudo de diferentes condições de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar no processo de obtenção de bioetanol**. 2007. 49p. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Ciências Biológicas) - Universidade de Pernambuco, Recife, 2007.

OLIVEIRA, F. M. V. **Avaliação de diferentes pré-tratamentos e deslignificação alcalina na sacarificação da celulose de palha de cana**. 2010. 98p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2010.

OLIVEIRA, L. R. M. **Estudo de alternativas de pré-tratamento e hidrólise do bagaço e palha de cana-de-açúcar para obtenção de etanol a partir de celulose**. 2012. 109p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2012.

PALMQVIST, B. **Processing lignocellulosic biomass into ethanol**. 2014. 91p. Tese (Doutorado em Engenharia) – Lund University, Sweden, 2014.

PAN, X.; XIE, D.; GILKES, N.; GREGG, D. J.; SADDLER, J. N. Strategies to enhance the enzymatic hydrolysis of pretreated softwood with high residual lignin content. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p.1069-1079, 2005.

PARK, S.; VENDITTI, R. A.; JAMEEL, H.; PAWLAK, J. J. Changes in pore size distribution during the drying of cellulose fibers as measured by differential scanning calorimetry. **Carbohydrate Polymers**, v.66, p.97-103, 2006.

PERES, J. G.; SOUZA, C. F.; LAVORENTI, N. A. Avaliação dos efeitos da cobertura de palha de cana-de-açúcar na umidade e na perda de água do solo. **Engenharia Agrícola**, v.30, p.875-886, 2010.

PETERSEN, M. O.; LARSEN, J.; THOMSEN, M. H. 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.

PITARELO, A. P. **Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha de cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática**. 2007. 142p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

POLOBIO, 2009. **Biocombustíveis**. Disponível em: <http://www.polobio.esalq.usp.br/biocombustiveis.html>. Acesso em 01 de fevereiro de 2009.

PORTAL DO AGRONEGÓCIO, 2011. **Cana-de-açúcar**. Disponível em <http://www.portaldoagronegocio.com.br/conteudo.php?id=58897>. Acesso em 13 de abril de 2012.

QIN, W. **High consistency enzymatic hydrolysis of lignocellulose**. 2010. 156p. Thesis (Master of Applied Science) – University of British Columbia, Vancouver, 2010.

RAHIKAINEN, J. L.; MARTIN-SAMPEDRO, R.; HEIKKINEN, H.; ROVIO, S.; MARJAMAA, K.; TAMMINEN, T.; ROJAS, O. J.; KRUUS, K. Inhibitory effect of lignin during cellulose bioconversion: The effect of lignin chemistry on non-productive enzyme adsorption. **Bioresource Technology**, v.133, p.270-278, 2013.

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

REDDY, N.; YANG, Y. Biofibers from agricultural byproducts for industrial applications. **Trends in Biotechnology**, v.23, p.22–27, 2005.

REZENDE, C. A.; LIMA, M. A.; MAZIERO, P.; AZEVEDO, E. R.; GARCIA, W.; POLIKARPOV, I. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to delignification process for enhanced enzymatic digestibility. **Biotechnology for Biofuels**, p.1-18, 2011.

RINGENA, O.; LEBIODA, S.; LEHNEN, R.; SAAKE, B. Size-exclusion chromatography of technical lignins in dimethyl sulfoxide/water and dimethylacetamide. **Journal of Chromatography A**, v.1102, p.154-163, 2006.

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, 2012a.

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

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.

ROCHA, G. J. M.; SILVA, V. F. N.; MARTÍN, C.; GONÇALVES, A. R.; NASCIMENTO, V. M.; SOUTO-MAIOR, A. M. Effect of xylan and lignin removal by hydrothermal pretreatment on enzymatic conversion of sugarcane bagasse cellulose for second generation ethanol production. **Sugar Tech**, v.15, p.390-398, 2013.

RODRIGUES, J. A. R. Do engenho à biorrefinaria. A usina de açúcar como empreendimento industrial para a geração de produtos bioquímicos e biocombustíveis. **Química Nova**, v.34, p.1242-1254, 2011.

ROSSELL, C. E. V. Fermentação do Hidrolisado. In: WORKSHOP TECNOLÓGICO SOBRE HIDRÓLISE PARA PRODUÇÃO DE ETANOL, 3., 2007, São Paulo.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.30, p.279–291, 2003.

SAHA, B. C.; BOTHAST, R. J. Pretreatment and Enzymatic Saccharification of corn fiber. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.76, p.65-77, 1999.

SAHA, B. C.; ITEN, L. B.; COTTA, M. A.; WU, Y. V. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. **Process Biochemistry**, v.40, p.3693-3700, 2005.

SÁNCHEZ, C. G. **Tecnologia da gaseificação de biomassa**. Campinas, SP. Editora: Átomo, p.189, 2010.

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

- SÁNCHEZ, O.; SIERRA, R.; ALMÉCIGA-DÍAZ, C. J. Delignification process of agro-industrial wastes an alternative to obtain fermentable carbohydrates for producing fuel. **Alternative Fuel**, p.111-154, 2011.
- SANDA, T.; HASUNUMA, T.; MATSUDA, F.; KONDO, A. Repeated-batch fermentation of lignocellulosic hydrolysate to ethanol using a hybrid *Saccharomyces cerevisiae* strain metabolically engineered for tolerance to acetic and formic acids. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 17, p. 7917-7924, 2011.
- SARKAR, N.; GHOSH, S. K.; BANNERJEE, S.; AIKAT, K. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**, v.37, p.19-27, 2012.
- SCHUCHARDT, U.; RIBEIRO, M. L.; GONÇALVES, A. R. A indústria petroquímica no próximo século: como substituir o petróleo como matéria-prima? **Química Nova**, n.2, v.24, 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.
- SHEN, X. L.; XIA, L. M. Production and immobilization of cellobiase from *Aspergillus niger* ZU-07. **Process Biochemistry**, v.39, p.1363-1367, 2004.
- SHEVCHENKO, S. M.; BEATSON, R. P.; SADDLER, J. N. The nature of lignin from steam explosion/enzymatic hydrolysis of softwood. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p.867–876, 1999.
- SILVA, A. R. **Las podas de olivo como materia prima para La producción de derivados de las hemicelulosas, pastas celulósicas y bioetanol**. 2012. 377p. Tesis (Doctorado en Ciencias) – Universidad de Córdoba, Córdoba, 2012.
- SILVA, F. T. **Obtenção de insumos químicos a partir do aproveitamento integral do bagaço de cana**. 1995. 106p. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1995.
- SILVA, V. F. N.; ARRUDA, P. V.; FELIPE, M. G. A.; GONÇALVES, A. R.; ROCHA, G. J. M. Fermentation of cellulosic hydrolysates obtained by enzymatic saccharification of sugarcane bagasse pretreated by hydrothermal processing. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.38, p.809-817, 2011.
- SIQUEIRA, G.; VÁRNAI, A.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. Enhancement of cellulose hydrolysis in sugarcane bagasse by the selective removal of lignin with sodium chlorite. **Applied Energy**, v.102, p.399-402, 2013.
- SLUITER, J. B.; RUIZ, R. O.; SCARLATA, C. J.; SLUITER, A. D.; TEMPLETON, D. W. Compositional Analysis of Lignocellulosic Feedstocks. 1. Review and Description of Methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, p.9043-9053, 2010.
- SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 1 – 11, 2002.
- TABKA, M. G.; HERPOËL-GIMBERT, I.; MONOD, F.; ASTHER, M.; SIGOILLOT, J. C. Enzymatic saccharification of wheat straw for bioethanol production by a combined cellulose xylanase and feruloyl esterase treatment. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, p.897-902, 2006.
- TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. **Bioresources**, v.2, p.707-738, 2007.
- TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Fermentation inhibitors in ethanol processes and different strategies to reduce their effects. In: **BIOFUELS: Alternative Feedstocks and Conversion Processes**, Elsevier, 2011, p.287-311.
- TAYLOR, G. Biofuels and the biorefinery concept. **Energy Policy**, v.36, p. 4406-4409, 2008.

TEJADO, A.; PENA, C.; LABIDI, J.; ECHEVERRIA, J. M.; MONDRAGON, I. Physico-chemical characterization of lignins from different sources for use in phenolformaldehyde resin synthesis. **Bioresource Technology**, v.98, p.1655–1663, 2007.

TOLBERT, A.; AKINOSHO, H.; KHUNSUPAT, R.; NASKAR, A. K.; RAGAUSKAS, A. J. Characterization and analysis of the molecular weight of lignin for biorefining studies. **Biofuel, Bioproducts and Biorefining**, p.1-21, 2014.

UDOP – União dos Produtores de Bioenergia. **CTC enfrenta desafio de tornar competitivo o Etanol 2G**. Disponível em <http://www.udop.com.br/index.php?item=noticias&cod=1099179#nc>. Acesso em 8 de abril de 2014.

ÚNICA – União da Indústria de Cana-de-açúcar. **Protocolo Agroambiental do Setor Sucroalcooleiro**. Disponível em <http://www.unica.com.br>. Acesso em 13 de abril de 2012.

VARANASI, P.; SINGH, P.; AUER, M.; ADAMS, P. D.; SIMMONS, B. A.; SINGH, S. Survey of renewable chemicals produced from lignocellulosic biomass during ionic liquid pretreatment. **Biotechnology for Biofuels**, p.6-14, 2013.

VASCONCELOS, S. M.; SANTOS, A. M. P.; ROCHA, G. J. M.; SOUTO-MAIOR, A. M. Diluted phosphoric acid pretreatment for production of fermentable sugars in a sugarcane-based biorefinery. **Bioresource Technology**, v.135, p.46-52, 2013.

YANG, B.; WYMAN, C. E. Effect of xylan and lignin removal by batch and flowthrough pretreatment on the enzymatic digestibility of corn stover cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, v.86, p.88-95, 2004.

YANG, B.; WYMAN, C. E. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. **Biofuels, Bioproducts & Biorefining**, v.2, p. 26-40, 2008.

YU, Y.; LOU, X.; WU, H. Some Recent Advances in Hydrolysis of Biomass in Hot-Compressed Water and Its Comparisons with Other Hydrolysis Methods. **Energy & Fuels**, v.22, p.46–60, 2008.

WALKER, G. M. **Bioethanol: science and technology of fuel alcohol**. ISBN 978-87-7681-681-0, p.1-114. Graeme M. Walker & Ventus Publishing ApS, 2010.

WOOD, T. M.; SADDLER, J. N. Increasing the availability of cellulose in biomass materials. **Methods in Enzymology**. v.160, p.3-11, 1988.

WOOLEY, R.; RUTH, M.; SHEEHAN, J.; IBSEN, K.; MAJDESKI, H.; GALVEZ, A. **Lignocellulosic biomass to ethanol—Process design and economics utilizing co-current dilute acid prehydrolysis and enzymatic hyrolysis—Current and futuristic scenarios**. Golden Colorade, USA. National Renewable Energy Laboratory, 1999. 130p. Report No. TP-580-26157.

WMO - WORLD METEOROLOGICAL ORGANIZATION. **Greenhouse gas bulletin**. Disponível em <http://pt.slideshare.net/LearnMoreAboutClimate/ghg-bulletin-no9en>. Acesso em 6 de agosto de 2014.

WÖRMAYER, K.; INGRAM, T.; SAAKE, B.; BRUNNER, G.; SMIRNOVA, I. Comparison of different pretreatment methods for lignocellulosic materials. Part II: Influence of pretreatment on the properties of rye straw lignin. **Bioresource Technology**, v.102, p.4157-4164, 2011.

WYMAN, C. E. Ethanol from lignocellulosic biomass: technology, economics, and opportunities. **Bioresource Technology**, v. 50, p.3-16, 1994.

WYMAN, C. E. **Handbook on bioethanol: production and utilization**. Washington , DC: Taylor & Francis, 1996.

WYMAN, C. E. Biomass ethanol: technical progress, opportunities, and commercial challenges. **Annual Review of Energy and the Environment**, v.24, p.189-226, 1999.

WYMAN, C. E. Potential synergies and challenges in refining cellulosic biomass to fuels, chemicals, and power. **Biotechnology Progress** v.19, p.254–262, 2003.

WYMAN, C. E.; DALE, B. E.; ELANDER, R. T.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. R.; LEE, Y. Y. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. **Bioresource Technology**. v. 96, p. 1959 – 1966, 2005.

ZABRISKIE, D. W.; AMINGER, W. B.; PHILLIPS, D. H.; ALBANO, P. A. **Traders' guide to fermentation media formulation**. Fort Worth, TX: Traders Protein Division, Traders Oil Mill, 1980. 60 p.

ZAKIS, G. F.; JOYCE, T.; BREZNY, R. **The functional analysis of lignins and their derivatives**. Atlanta: TAPPI Press, 1994.94p.

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

ZHANG, Y. H. P. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.35, p.367–375, 2008.

APÊNDICE

APÊNDICE A- Rampas de aquecimento referentes ao processo de deslignificação alcalina (planejamento experimental) do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido fosfórico.

(Continuação)

(Continuação)

(Continuação)

(Continuação)

Figura A. Rampas de aquecimento provenientes do processo de deslignificação alcalina (planejamento experimental) do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido fosfórico. O gráfico do ensaio 14 encontra-se no texto da tese.

(Conclusão)

APÊNDICE B- Rampas de aquecimento referentes ao processo de deslignificação alcalina (planejamento experimental) do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido sulfúrico.

(Continuação)

(Continuação)

(Continuação)

(Continuação)

Figura B. Rampas de aquecimento provenientes do processo de deslignificação alcalina (planejamento experimental) do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido sulfúrico. O gráfico do ensaio 14 encontra-se no texto da tese.

(Conclusão)