

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

JULIO DELPHINO SALLES

**Pré-tratamento Organosolve de palha de soja visando a produção de etanol de segunda
geração**

Pirassununga

2022

JULIO DELPHINO SALLES

**Pré-tratamento Organosolve de palha de soja visando a produção de etanol de segunda
geração
(Versão corrigida)**

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciências dos Materiais.

Área de Concentração: Desenvolvimento, caracterização e aplicação de materiais voltados à agroindústria.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Gustavo Tonin

Pirassununga

2022

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP, com
os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

D168e Delphino Salles, Julio
Pré-tratamento organosolve da palha de soja
visando a produção de etanol de segunda geração
/ Julio Delphino Salles ; orientador Prof. Dr.
Fernando Gustavo Tonin. -- Pirassununga, 2022.
108 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação
em Engenharia e Ciência de Materiais) -- Faculdade
de Zootecnia e Engenharia de Alimentos,
Universidade de São Paulo.

1. Pré-tratamento Organosolve. 2. Palha de soja.
3. Biorrefinaria. 4. Etanol 2G. 5. Celulose. I.
Gustavo Tonin, Prof. Dr. Fernando, orient. II.
Título.

Dedico esse trabalho à minha família, que sempre me apoiou e esteve ao meu lado nas minhas maiores dificuldades e também ao meu orientador e professor, Dr. Fernando Gustavo Tonin, que me capacitou e tornou possível gerar esse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais que me deram forças, conselhos e estrutura para enfrentar as diversidades da vida e a Deus por estar sempre comigo nessa caminhada.

À minha esposa e filha que estão ao meu lado, me motivando a buscar meus objetivos.

Ao meu orientador, professor Dr. Fernando Gustavo Tonin, que me passou conhecimento, me auxiliou nas manipulações experimentais e possibilitou o término deste trabalho diante das limitações da pandemia que se passaram no momento do desenvolvimento deste trabalho.

À técnica do Laboratório de Biocombustíveis e Química Aplicada da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Zootecnia (FZEA), Dra. Josiane Gonçalves Borges, que me auxiliou nos experimentos no laboratório.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo auxílio financeiro.

Agradeço de forma geral a todos que estiveram comigo para o desenvolvimento e término deste trabalho.

RESUMO

SALLES, J. D. **Pré-tratamento organosolve de palha de soja visando a produção de etanol de segunda geração.** 2022. 107 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2022.

Os biocombustíveis constituem alternativa promissora aos combustíveis fósseis quando se tem como objetivo o desenvolvimento sustentável e a independência com relação às fontes finitas de petróleo, colocando o desenvolvimento e viabilização comercial do etanol de segunda geração (2G) em local de destaque. Para tal, se faz necessário a busca por matérias-primas alternativas de baixo custo e abundantes, além de processos otimizados, onde todos os componentes da biomassa possam ser aproveitados, dentro do conceito moderno de biorrefinaria. Para obtenção do etanol 2G, é necessário a execução de uma etapa de pré-tratamento da biomassa, cujo objetivo é romper a alta recalcitrância dos materiais lignocelulósicos e expor os polissacarídeos a uma etapa posterior de hidrólise. Os materiais lignocelulósicos possuem diferentes composições e estruturas, o que implica na necessidade de otimização de condições de pré-tratamento para cada fonte de matéria-prima e processo. Dentro deste contexto, o objetivo deste trabalho foi estudar condições operacionais do pré-tratamento Organosolve (utilizando etanol) aplicado à palha de soja, visando a máxima sacarificação da biomassa pré-tratada após hidrólise enzimática, além de caracterizar preliminarmente a lignina recuperada a partir dos licores de pré-tratamento obtidos nas melhores condições encontradas. Inicialmente, estudou-se por metodologia de superfície de resposta as principais variáveis ligadas ao processo de pré-tratamento Organosolve: temperatura, tempo de reação e porcentagem de etanol. A partir dos resultados obtidos, otimizou-se sequencialmente a porcentagem de etanol, e posteriormente a concentração de um catalisador alcalino (NaOH). A influência da adição de ácido bórico (H_3BO_3), reconhecido agente complexante de substâncias fenólicas, ao meio Organosolve alcalino também foi estudado, vislumbrando possíveis efeitos na estrutura da lignina recuperada dos licores de pré-tratamento. Nas três melhores condições encontradas, o meio teve composição (m/v) de 3,20% de NaOH (ausência de H_3BO_3), 4,5% de NaOH com 1,0% de ácido bórico e 4,5% de NaOH com 2,0% de ácido bórico, sendo que em todas as condições, a porcentagem de etanol foi de 20% (v/v), temperatura de 170°C e tempo de pré-tratamento de 50 minutos. Nas três condições a recuperação de glicose foi de

aproximadamente 73% (m/m) com relação às glicanas presentes na biomassa bruta, o que demonstra a alta eficiência dos processos. As ligninas recuperadas nos processos apresentaram diferenças marcantes: na ausência de H_3BO_3 a massa molar numérica média foi de 2318 g/mol e a polidispersidade de 4,43, enquanto que na condição onde se tem 1,0% de H_3BO_3 presente a massa molar numérica média foi de 1826 g/mol e a polidispersidade de 3,17. No pré-tratamento onde se tem 2,0% de H_3BO_3 obteve-se um resultado intermediário, com a lignina apresentando massa molar numérica média foi de 2188 g/mol e polidispersidade de 3,67. A hipótese proposta é que o H_3BO_3 forma complexos com os fragmentos de lignina solubilizados durante o processo, impedindo sua repolimerização e nova deposição na biomassa sólida. Os resultados sugerem ainda que na condição onde se tem H_3BO_3 presente, a deslignificação e remoção de hemicelulose é mais acentuada, restando mais hemicelulose e lignina na biomassa pré-tratada somente com NaOH, o que justifica recuperações de glicose similares em todas as condições. Análises morfológicas e estruturais comparativas realizadas pelas técnicas de MEV, FTIR, DRX e TG/DTG dão suporte às hipóteses acima formuladas.

Palavras-chave: Deslignificação. Lignocelulose. Biocombustíveis. Lignina. Biorrefinaria. Organosolve. Palha de soja.

ABSTRACT

SALLES, J. D. **Organosolve pretreatment of soybean straw aiming at the production of second generation ethanol.** 2022. 107 p. Dissertation (Master) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2022.

Biofuels are a promising alternative to fossil fuels when the objective is sustainable development and independence from finite oil sources, placing the development and commercial viability of second generation ethanol (2G) in a prominent position. To this end, it is necessary to search for low-cost and abundant alternative raw materials, in addition to optimized processes, where all the components of the biomass can be used within the modern concept of biorefinery. To obtain 2G ethanol, it is necessary to perform a biomass pretreatment step, whose objective is to break the high recalcitrance of the lignocellulosic materials and expose the polysaccharides to a subsequent hydrolysis step. Lignocellulosic materials have different compositions and structures, which implies the need to optimize the pretreatment conditions for each source of raw material and process. In this context, the objective of this work was to study the operational conditions of Organosolv pretreatment (using ethanol) applied to soybean straw, with the aim of achieving maximum saccharification of the pretreated biomass after enzymatic hydrolysis, in addition to preliminarily characterization of the lignin recovered from pretreatment liquors obtained under the best conditions. Initially, the main variables related to the Organosolv process were studied using response surface methodology: temperature, time, and percentage of ethanol. From the results obtained, the percentage of ethanol and the concentration of an alkaline catalyst (NaOH) were sequentially optimized. The influence of the addition of boric acid (H_3BO_3), a recognized complexing agent of phenolic substances, to the alkaline Organosolv medium was also studied, assuming possible effects on the structure of the lignin recovered from the pretreatment liquors. In the three best conditions found, the medium had a composition (w/v) of 3.20% NaOH (absence of H_3BO_3), 4.5% NaOH with 1.0% boric acid and 4.5% NaOH with 2.0% boric acid, and under all conditions the percentage of ethanol was 20% (v/v), temperature 170 ° C and pretreatment time of 50 minutes. In all three conditions, glucose recovery was approximately 73% (w/w) in relation to the glycans present in the raw biomass, demonstrating the high efficiency of the processes. The recovered lignins in the processes showed marked differences: In the absence of H_3BO_3 , the

number average molecular weight was 2318 g/mol and the polydispersity was 4.43, while in the condition where 1.0% H_3BO_3 was present, the number average molecular weight was 1826 g/mol and the polydispersity was 3.17. In the pretreatment where there was 2.0% H_3BO_3 , an intermediate result was obtained, with lignin presenting a number average molecular weight of 2188 g/mol and a polydispersity of 3.67. The proposed hypothesis is that H_3BO_3 forms complexes with solubilized lignin fragments during the process, preventing its repolymerization and new deposition in solid biomass. The results also suggest that in the condition where H_3BO_3 is present, the delignification and removal of hemicellulose is more pronounced, leaving more hemicellulose and lignin in the pretreated biomass in the absence of H_3BO_3 , which justifies similar glucose recoveries under both conditions. Comparative morphological and structural analyzes performed using SEM, FTIR, XRD, and TG/DTG techniques support the hypotheses formulated above.

Keywords: Delignification. Lignocellulose. Biofuels. Lignin. Biorefinery. Organosolv. Soybean straw.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Tipos de biocombustíveis e suas fontes.....	19
Figura 2 - Estrutura da biomassa lignocelulósica.....	22
Figura 3 – Estrutura da celulose	24
Figura 4 - Interações intermoleculares do material celulósico	25
Figura 5 - Representação estrutural da hemicelulose	26
Figura 6 - Principais monolignóis precursores da estrutura da lignina	27
Figura 7- Possíveis produtos gerados a partir de uma biorrefinaria de segunda geração.....	30
Figura 8 – Fluxograma resumido de uma biorrefinaria de biomassa lignocelulósica.....	31
Figura 9 - Pré-tratamento em materiais lignocelulósicos	32
Figura 10 - Mecanismos de clivagem das ligações (α -O-4).....	40
Figura 11 - Proposta de mecanismos de clivagem das ligações (α -O-4) catalisada por base ..	41
Figura 12 - Proposta de clivagem das ligações (β -O-4) catalisada por ácido	41
Figura 13 - Proposta de clivagem de ligações (β -O-4) catalisada por ácido com liberação de formaldeído.....	42
Figura 14 - Proposta de clivagem de ligações (β -O-4) por catálise básica	42
Figura 15 - Etapas iniciais deste trabalho	46
Figura 16 – Estudo das condições do pré-tratamento organosolve	46
Figura 17 – Caracterização da biomassa pré-tratada e da lignina recuperada a partir do licor de pré-tratamento.....	47
Figura 18 - Fluxograma da caracterização da palha de soja segundo a NREL	48
Figura 19 - Análises gráficas do planejamento de superfície de resposta - (continua)	65
Figura 20 - Gráfico de contorno obtido para o rendimento em glicose – (a) tempo fixo em 50 minutos; (b) temperatura fixa em 170°C.	66
Figura 21 - Espectro de FTIR da biomassa bruta (sem pré-tratamento)	77
Figura 22 - Espectros de FTIR das biomassas bruta e pré-tratada com de NaOH	78
Figura 23 - Espectros de FTIR das biomassas bruta e pré-tratadas com NaOH e H ₃ BO ₃	79
Figura 24 - Espectros de FTIR das biomassas bruta e pré-tratadas com NaOH e NaOH/H ₃ BO ₃	80
Figura 25 - Micrografia da biomassa sem pré-tratamento.....	84
Figura 26 - Micrografia da biomassa pré-tratada com 3,20% de NaOH.....	85
Figura 27 - Micrografia da biomassa pré-tratada com 4,5% de NaOH e 1,0% de H ₃ BO ₃	85
Figura 28 - Micrografia da biomassa pré-tratada com 4,5% de NaOH e 2,0% de H ₃ BO ₃	86
Figura 29 – Espectros de FTIR de ligninas brutas precipitadas a partir dos licores de pré-tratamento	90
Figura 30 –Cromatogramas de exclusão por tamanho de ligninas obtidas a partir dos licores de pré-tratamento	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Matriz de experimentos utilizada nos estudos preliminares segundo metodologia de superfície de resposta.....	52
Tabela 2 – Pré-tratamentos com variações da concentração de etanol em condições de temperatura e tempo fixos	54
Tabela 3 - Pré-tratamentos com variações da concentração de base (NaOH).....	55
Tabela 4 - Pré-tratamentos com variações da concentração de base (NaOH) e ácido (H ₃ BO ₃)	56
Tabela 5 - Composição química da palha de soja com base na biomassa seca.....	60
Tabela 6 - Caracterização de biomassa estudadas para a produção de etanol 2G.....	61
Tabela 7 – Resultados de rendimento obtidos no planejamento de superfície de resposta	62
Tabela 8 – Resumo dos melhores valores de rendimento e recuperação de glicose após pré-tratamento e hidrólise enzimática obtidos no presente trabalho.....	72
Tabela 9 - Índice de cristalinidade das amostras pré-tratadas e bruta	88
Tabela 10 - Valores de massas molares e polidispersidade das ligninas obtidas a partir dos licores de pré-tratamento	92

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Concentração de celulose, hemicelulose e lignina em diferentes biomassas lignocelulósicas	22
Quadro 2 - Participação de monolignóis na composição de ligninas de diferentes tipos vegetais	27
Quadro 3 – Tipos de Lignina em função do processo de obtenção	28
Quadro 4 - Tipos de pré-tratamentos	33
Quadro 5 - Processo organosolve em diferentes tipos de biomassa e em diferentes condições	35
Quadro 6 - Comparação da caracterização da palha de soja	60
Quadro 7 – Resultados estatísticos obtidos para os coeficientes do modelo de superfície de resposta ajustado.....	63
Quadro 8 - Resultados obtidos para a estimativa dos coeficientes de regressão para o modelo de superfície de resposta.....	63
Quadro 9 - Resultados obtidos e análise estatística do efeito da porcentagem de etanol no rendimento de glicose – letras iguais no teste de Tukey significam resultados estatisticamente iguais ao nível de 95% de confiança	68
Quadro 10 - Resultados obtidos e análise estatística do efeito da adição de NaOH ao meio Organosolve – letras iguais no teste de Tukey significam resultados estatisticamente iguais ao nível de 95% de confiança.....	69
Quadro 11 – Resultados obtidos e análise estatística do efeito da adição de ácido bórico ao meio Organosolve alcalino – letras iguais no teste de Tukey significam resultados estatisticamente iguais ao nível de 95% de confiança.....	71
Quadro 12 – Valores de recuperação de glicose contida na palha de soja após pré-tratamento e hidrólise enzimática descritos na literatura	73
Quadro 13 – Atribuição de bandas de absorção em espectros de FTIR de biomassa lignocelulósica.....	75
Quadro 14 – Atribuição de bandas de absorção em espectros de FTIR de lignina	89

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Série histórica de produção de soja no Brasil (mil toneladas)	44
Gráfico 2 - Valores de rendimento obtidos em função da variação da concentração de etanol – intervalos de confiança ao nível de 95%	68
Gráfico 3 - Valores de rendimentos obtidos em função da porcentagem de NaOH – intervalo de confiança ao nível de 95%	70
Gráfico 4 - Valores de rendimentos de glicose em função da concentração de NaOH e H ₃ BO ₃ - intervalos de confiança ao nível de 95%	71
Gráfico 5 - Termograma obtido para a palha de soja bruta	81
Gráfico 6 - Análise termogravimétrica derivada da amostra não tratada	82
Gráfico 7 - Comparação dos perfis de DTG entre amostras tratadas e não tratada.....	83
Gráfico 8 - Difratoogramas de Raios X característicos das amostras bruta e pré-tratadas	87

LISTA DE SIGLAS

BTU – Unidade térmica britânica

1G – Primeira Geração

2G – Segunda Geração

3G – Terceira Geração

4G – Quarta Geração

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

DRX – Difração de raios X

FTIR – Espectroscopia na região do infravermelho

TG/DTG - Termogravimetria

C6 – monossacarídeo contendo 6 carbonos

C5 - monossacarídeo contendo 5 carbonos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	BIOCOMBUSTÍVEIS	18
2.2	BIOMASSA	21
2.2.1	Biomassa lignocelulósica	21
2.3	BIORREFINARIA	29
2.3.1	Pré-tratamento	31
2.4	SOJA	43
3	OBJETIVOS	45
3.1	OBJETIVO GERAL	45
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
4	MATERIAIS E MÉTODOS	46
4.1	OBTENÇÃO E PREPARO DA PALHA DE SOJA	47
4.2	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA PALHA DE SOJA.....	47
4.2.1	Umidade e extratíveis.....	48
4.2.2	Determinação da lignina solúvel, lignina insolúvel, glicanas, xilanas e cinzas	49
4.3	AVALIAÇÃO DOS PRINCIPAIS PARÂMETROS RELACIONADOS AO PRÉ- TRATAMENTO ORGANOSOLVE – ESTUDOS PRELIMINARES	51
4.3.1	Procedimento de execução do pré-tratamento	53
4.3.2	Procedimento de condução da hidrólise enzimática	53
4.3.3	Determinação da concentração de glicose	54
4.4	ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA PORCENTAGEM DE ETANOL	54
4.5	ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE CATALISADOR/ADITIVO.....	55
4.5.1	Porcentagem de hidróxido de sódio	55
4.5.2	Porcentagem de ácido bórico	55
4.6	OBTENÇÃO DE LIGNINA BRUTA A PARTIR DE LICORES ORGANOSOLVE ..	56
4.7	CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E MORFOLÓGICA.....	57
4.7.1	Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	57
4.7.2	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	57
4.7.3	Termogravimetria (TG/DTG)	57
4.7.4	Difração de Raios-X (DRX).....	58

4.7.5	Cromatografia líquida por exclusão de tamanho (SEC)	58
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA E CONFEÇÃO DE GRÁFICOS	59
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	60
5.1	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA BIOMASSA	60
5.2	ESTUDO PRELIMINAR – PRINCIPAIS VARIÁVEIS QUE AFETAM O PROCESSO ORGANOSOLVE - ANÁLISE DO PLANEJAMENTO DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA	61
5.3	OTIMIZAÇÃO DA PORCENTAGEM DE ETANOL E PRESENÇA DE ADITIVOS NO MEIO REACIONAL	67
5.3.1	Efeito da concentração de etanol no meio reacional	67
5.3.2	Estudo da presença de aditivos no pré-tratamento	69
5.3.3	Análise comparativa da recuperação de glicose com dados da literatura	72
5.4	CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E MORFOLÓGICA DA BIOMASSA PRÉ-TRATADA	74
5.4.1	Espectroscopia de infravermelho com transformada de fourier (FTIR)	75
5.4.2	Análise termogravimétrica (TG/DSC)	80
5.4.3	Análise de microscopia de varredura (MEV)	84
5.4.4	Análise de DRX	87
5.5	ANÁLISE DAS LIGNINAS RECUPERADAS DOS LICORES DE PRÉ-TRATAMENTO	88
5.5.1	Espectroscopia de infravermelho com transformada de fourier (FTIR)	89
5.5.2	Cromatografia por Exclusão de Tamanho (SEC)	91
6	CONCLUSÕES	94
	REFERÊNCIAS	96

1 INTRODUÇÃO

Os combustíveis tem sido foco de vários estudos atualmente, não só pela busca de uma fonte de produção de energia mais eficiente, mas também, por matérias-primas capazes de atenuar a dependência do petróleo. Os preços instáveis e os impactos ambientais, como aumento de gases do efeito estufa, tem levado a busca de novas alternativas para a produção de uma energia verde. A biomassa é alvo para essa produção de energia limpa, pois através dessa fonte de matéria-prima pode-se obter intermediários da indústria química, além de combustíveis (HOWARD et al., 2018).

A biomassa, sendo fonte de energia renovável de origem vegetal ou animal gerada pelo agronegócio, florestas ou resíduos, pode ser utilizada para a combustão na sua forma *in natura*, (exemplo: queima de lenha), ou processada para depois ser utilizada para geração de energia, como o caso dos biocombustíveis (exemplos: etanol, biodiesel, butanol, metanol) (LI; SAKURAGI; MAKINO, 2019).

Os biocombustíveis são gerados dentro do conceito de biorrefinaria, que é um paralelo à refinaria de petróleo, onde a matéria prima é processada de forma a obter vários produtos de interesse econômico, minimizando a geração de resíduos no processo. Os biocombustíveis, podendo ser classificados em primeira geração (1G), segunda geração (2G), terceira geração (3G) e quarta geração (4G) são alvos de diversos estudos atualmente para obter uma cadeia produtiva já existente na produção de biocombustíveis com um valor agregado, minimizando as perdas e os impactos ambientais e maximizando os lucros (KHOO; CHEW; YEW, 2020).

No Brasil, a produção de biocombustíveis 1G começou a partir da década de 70, com as instalações de plantas de produção de etanol a partir da biomassa cana de açúcar. Essas plantas promovem a fermentação do caldo da cana obtendo o biocombustível de primeira geração (CORREA; BEYER; FARGIONE, 2019).

Os biocombustíveis 2G são produzidos por meio de uma biomassa lignocelulósica, fonte de matéria prima rica em celulose, hemicelulose e lignina. Dentro do conceito da produção de biocombustíveis 2G, o foco está na conversão de celulose e hemicelulose em açúcares fermentescíveis, porém para ter acesso a essas biomoléculas de forma satisfatória faz-se necessário a implementação de processos suplementares com relação ao processo 1G. O principal processo suplementar é o pré-tratamento, que promove o acesso à hemicelulose e celulose antes de se submeter a biomassa à hidrólise enzimática. Essa etapa constitui um dos principais gargalos do desenvolvimento dos combustíveis 2G e por isso tem sido foco de um

grande número de estudos (SHAH et al., 2016; S SRIVASTANA; KHARWAR; MISHRA, 2019; TANG et al., 2020).

Atualmente, a produção de biocombustíveis de segunda geração (2G) possui grandes obstáculos, pois não se têm um processo otimizado com eficiência para o acesso aos açúcares da biomassa lignocelulósica que podem dar origem aos biocombustíveis (SHAH et al., 2016; SRIVASTANA; KHARWAR; MISHRA, 2019; TANG et al., 2020).

Dessa forma, a busca por um pré-tratamento otimizado que tenha uma máxima recuperação dos açúcares da biomassa lignocelulósica proporciona uma maior viabilidade para a produção de biocombustíveis de segunda geração (CORREA; BEYER; FARGIONE, 2019).

Além da celulose e hemicelulose, a lignina possui grande interesse comercial, pois em sua forma pura, possui um alto valor agregado no mercado. Nas indústrias de papel e celulose esse material é obtido de forma impura no licor negro, sendo prática comum sua queima para geração de energia, o que de certa forma limita suas potencialidades em aplicações onde se tem maior valor agregado (MAHMOOD et al, 2016; VISTHAL; KRASLAWSKI, 2011). Uma das diversas possibilidades de reutilização e valorização da lignina é seu emprego como matéria-prima renovável para a produção de polímeros parcialmente verdes (DOHERTY; MOUSAVIOUN; FELLOWS, 2011). Sua estrutura bastante complexa, composta por anéis aromáticos e funcionalidades como metóxi, carbonila, carboxila e hidroxila favorece essa aplicação, uma vez que esses sítios reativos, em especial os grupos hidroxilas, oferecem diversas possibilidades de utilização da lignina como monômeros para obtenção de polímeros, como poliuretanos (PUs) (DOHERTY; MOUSAVIOUN; FELLOWS, 2011).

Diante de um fracionamento eficiente na estrutura da biomassa lignocelulósica, a fim de aproveitar a celulose e hemicelulose na produção de biocombustíveis e segregar a lignina vislumbrando-se futuras aplicações na área de polímeros, neste trabalho estudou-se o pré-tratamento químico Organosolve de palha de soja. Para tal, foram selecionadas como variáveis do processo a temperatura, tempo de pré-tratamento, relação etanol/água e concentração de hidróxido de sódio e ácido bórico como catalisadores. Ao final do estudo, buscou-se condições operacionais de pré-tratamento onde se pode obter a máxima concentração de glicose após hidrólise enzimática da biomassa pré-tratada, bem como avaliou-se o efeito das condições operacionais na massa molecular da lignina recuperada do licor de pré-tratamento.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Com a crescente preocupação do aumento do consumo de petróleo pela redução de suas reservas, a fragilidade nas relações internacionais envolvendo principais países produtores de petróleo, pelo aumento e volatilidade de preços, pelas mudanças climáticas do planeta provocada pelo efeito estufa que tem como consequência o aquecimento global, tem-se buscado alternativas satisfatórias do ponto de vista ambiental, econômico e social para resolver essas questões (LI; SAKURAGI; MAKIBO, 2019).

Caso a dependência de combustíveis fósseis se mantenha no mundo todo a curto prazo, a concentração de gases geradores de efeito estufa irá aumentar consecutivamente, promovendo o aumento de temperatura média global, levando a derretimento de geleiras, aumento do nível do mar e alagamento de áreas costeiras, atingindo grande contingente de pessoas e animais silvestres (CORREA; BEYER; FARGIONE, 2019).

Para controlar uma economia global próspera e um ambiente sustentável é preciso buscar por fontes de energias renováveis para deixar a dependência a curto prazo de combustíveis fósseis (CORREA; BEYER; FARGIONE, 2019).

Uma das alternativas que surge para resolver estas questões é a utilização de biocombustíveis, tendo como foco o etanol que vem sendo utilizado e estudado no Brasil desde a década de 70, quando em 14 de dezembro de 1975, por meio do Decreto de lei 76.593 instituiu-se o Programa Nacional do Álcool (Proálcool). Este programa governamental tinha como objetivo garantir o suprimento de etanol no processo de substituição da gasolina, reduzindo a dependência do petróleo importado, devido aos sucessivos aumentos no preço do combustível fóssil (JAWAID et al., 2017).

O etanol, biocombustível de fonte renovável, tem diversas vantagens por ser produzido a partir de diversas fonte vegetais, além de ser eficiente como combustível e favorável ambientalmente e economicamente (JAWAID et al., 2017).

2.1 BIOCOMBUSTÍVEIS

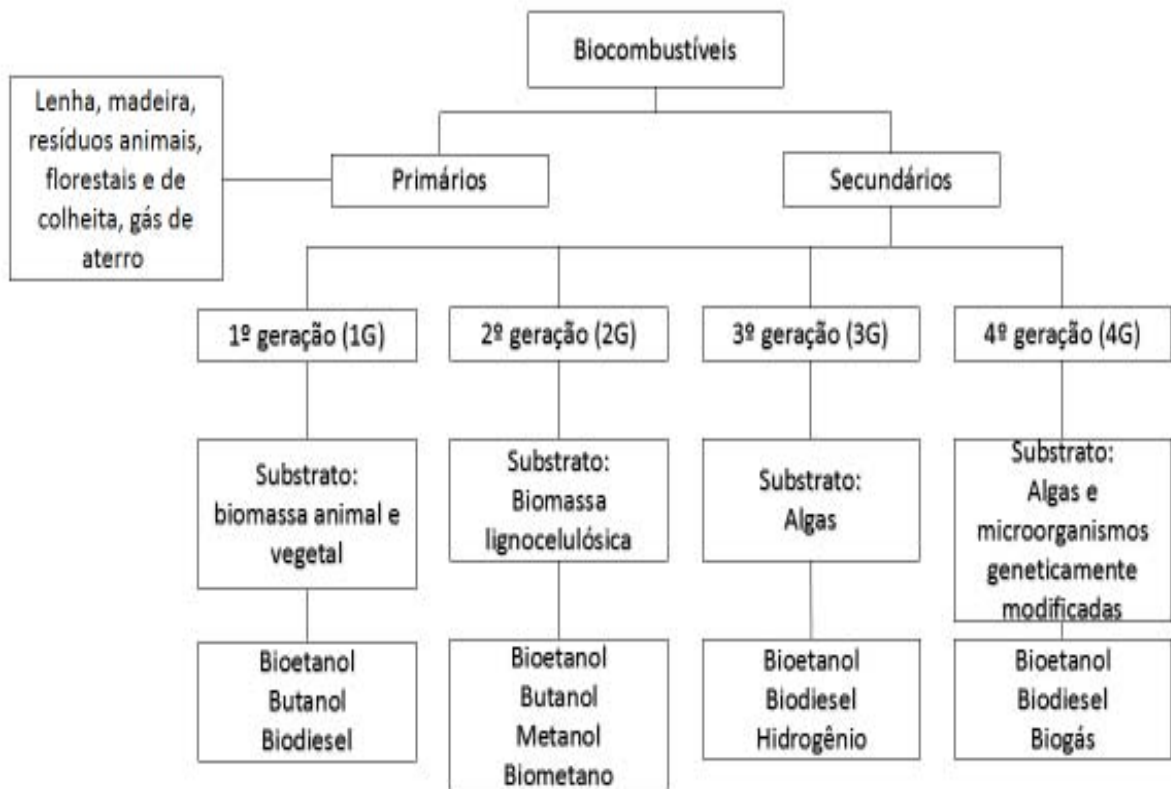
Os biocombustíveis são produzidos a partir de fontes biológicas renováveis que podem ser de origem vegetal (Ex.: milho, soja, mamona, cana de açúcar, palma, algodão, lenha, bagaço da cana-de-açúcar, palha de soja, palha de arroz, entre outros) ou animal, como as gorduras (Ex.: sebo bovino, sebo suíno, entre outros). Os biocombustíveis são originados de fontes renováveis e não alteram o balanço térmico do planeta Terra, pois essas fontes de energia se regeneram de uma forma cíclica em uma escala de tempo reduzida (BHARGAVI;

NAGESWARA; RENGANATHAN, 2018). Além das questões ambientais e de ser uma fonte de energia renovável, o avanço do uso de biocombustíveis traz outra vantagem, a dependência por combustíveis fósseis passa a ser menor.

O Brasil possui alto potencial para os biocombustíveis em relação ao mundo, pelas altas taxas de luminosidade e pelas grandes dimensões territoriais, além disso, já existem estudos avançados no país para produção de biocombustíveis por meio da biomassa (ALALWAN HA et al., 2019).

Os biocombustíveis são classificados de acordo com a matéria-prima utilizada em seu processo de produção (Figura 1) (ALALWAN; ALMINSHID; ALJAAFARI, 2019;).

Figura 1- Tipos de biocombustíveis e suas fontes



Fonte: Adaptado de ALALWAN, H. A.; ALMINSHID, A. H.; ALJAAFARI, H. A. S. Evolução promissora das gerações de biocombustíveis. Revisão do assunto. **Foco em Energias Renováveis**, [s.l.], v. 28, p 127-139, 2019.

Os biocombustíveis quando utilizam a matéria-prima *in natura* como lenha, resíduos animais, vegetais entre outros, são considerados biocombustíveis primários. Quando as matérias primas (biomassa) passam por algum processo para depois serem utilizadas como fonte de energia tem-se os biocombustíveis secundários (exemplos: etanol, biodiesel, butanol e metanol) (ALALWAN; ALMINSHID; ALJAAFARI, 2019).

Os biocombustíveis secundários, podendo ser classificados em primeira geração (1G), segunda geração (2G), terceira geração (3G) e quarta geração (4G) são alvos de diversos estudos atualmente. Esses estudos estão voltados para obter uma cadeia eficiente na produção de biocombustíveis com um valor agregado maior, minimizando as perdas, os impactos ambientais e maximizando os lucros (ALALWAN; ALMINSHID; ALJAAFARI, 2019).

O etanol de primeira geração (1G) pode ser produzido a partir de dois tipos de matérias-primas, classificadas com base no conteúdo de amido ou açúcar diretamente fermentescível. Como exemplos de matérias-primas amiláceas tem-se a batata, cevada, milho e trigo, e como principais exemplos de matérias-primas onde o açúcar pode ser diretamente fermentado, após extração do caldo, tem-se a cana-de-açúcar e beterraba. (ALALWAN; ALMINSHID; ALJAAFARI, 2019).

Os biocombustíveis de segunda geração (2G) são produzidos a partir de materiais lignocelulósicos, que são derivados de produtos secos de resíduos agrícolas, resíduos industriais e florestais. A geração anual de biomassa lignocelulósica oriunda da agricultura e florestas é estimada em torno de 5 a 8 trilhões de toneladas/ano. Focando na perspectiva sustentável da produção de produtos químicos e biocombustíveis, a biomassa lignocelulósica tem potencial para tal feito, além de, reduzir a emissão de gases do efeito estufa (GEEs), o que traz benefícios a economia e auxilia na segurança energética (PERLACK, 2005; RAHIM et al., 2019; STARK, 2011).

Segundo Shah et al (2016), os biocombustíveis de terceira geração (3G) são produzidos a partir da biomassa de algas, como microalgas e macroalgas. As algas têm alta produtividade de lipídeos e altas taxas de crescimento, podendo ser colhidas em apenas 5 a 6 dias de cultivo e com baixo custo de cultivo, pois podem ser cultivadas em uma área marginal úmida ou em águas residuárias. Existem três tipos de microalgas, as autotróficas (consomem carbono inorgânico), heterotróficas (consomem carbono orgânico) e mixotróficas (consomem carbono inorgânico e orgânico). Os lipídeos são importantes biomoléculas utilizadas para a produção de biocombustíveis (Ex.: biodiesel, bio-óleo, entre outros), podendo ser convertidos por meio de processos puramente químicos ou bioquímicos (SRIVASTANA; KHARWAR; MISHRA, 2019; TANG et al., 2020).

De acordo com Ahmad et al (2015), os biocombustíveis de quarta geração (4G) são produzidos por microalgas geneticamente modificadas, esses micro-organismos são geneticamente modificados para aumentar a absorção de CO₂ para a fotossíntese, criando um sumidouro artificial de carbono a fim de aumentar a produção de biocombustíveis. Os biocombustíveis de quarta geração ainda estão em fase inicial de desenvolvimento, mas

algumas linhagens de algas geneticamente modificadas estão sendo estudadas, como por exemplo a *Chlamydomonas reinhardtii* sp., *Phaeodactylum tricornutum* sp. e *Thalassiosira pseudonana* sp. Esses micro-organismos foram modificados para aumentar a taxa de crescimento e adaptabilidade para crescer em ambientes pobres em nutrientes. A produtividade lipídica e a fixação de carbono das microalgas geneticamente modificadas foram relatadas em alguns estudos, como na microalga *Chlamydomonas reinhardtii* sp. que gerou um aumento de 1,5 vezes no teor de lipídeos e aumentou em 20% dos triglicerídeos (DENG et al., 2014), nas microalgas *Phaeodactylum tricornutum* sp. houve 35% de aumento no teor de lipídios e cerca de 1,1 vezes aumento no teor de triglicerídeos (NIU et al., 2013; YANG et al., 2016).

2.2 BIOMASSA

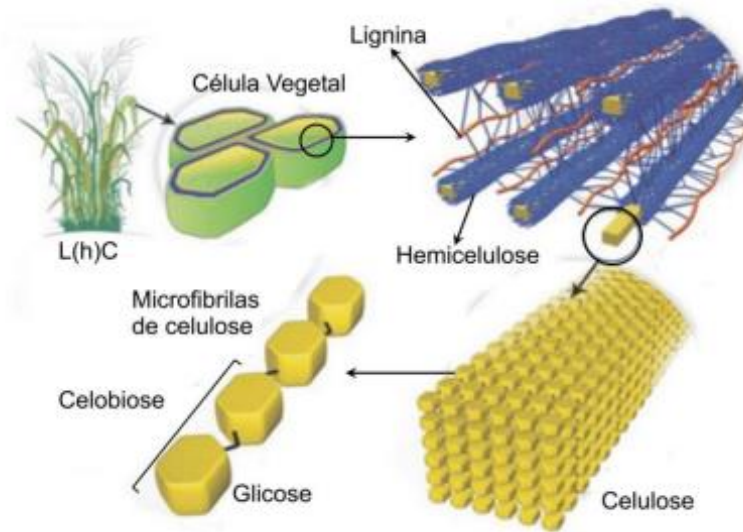
A biomassa pode ser definida como uma espécie de material orgânico biodegradável, não fossilizado, podendo ter sua origem por meio de resíduos vegetais ou resíduos animais, a qual pode ser utilizada para produzir energia, como a lenha, o carvão, bagaço de cana de açúcar, esterco de animais, resíduos agrícolas, entre outros. (JAWAID et al., 2017).

Dentre a ampla variedade de biomassas disponíveis, a que apresenta maior destaque é a composta de material lignocelulósico, sendo cada vez mais estudada por exibir elevado potencial energético, baixo custo, baixo grau de toxicidade e fácil acessibilidade (ADEKUNLE; OKOLIE, 2015; JAWAID et al., 2017).

2.2.1 Biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica é um recurso orgânico abundante, como no caso dos resíduos agrícolas e culturas energéticas (palha e bagaço da cana-de-açúcar, palha de soja, casca de arroz, palha de trigo, entre outros). O material lignocelulósico tem em sua composição macromolecular três tipos de polímeros principais: lignina, hemicelulose e celulose e suas proporções estruturais variam de acordo com a biomassa. Os carboidratos (celulose e hemicelulose) são fermentáveis após a hidrólise, o que torna a biomassa lignocelulósica uma matéria prima adequada para a produção de biocombustível (MA et al., 2018). A Figura 2 mostra de uma forma simplificada a estrutura de uma biomassa lignocelulósica e sua composição.

Figura 2 - Estrutura da biomassa lignocelulósica



Fonte: Adaptado de KONDO, T.; The relationship between intramolecular hydrogen bonds and certain physical properties of regioselectively substituted cellulose derivatives. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*. v 35, p. 717-723, 1997. p.720.

A estrutura recalcitrante da Figura 2, mostra celulose, um polissacarídeo cristalino envolvido por hemicelulose (uma estrutura amorfa que faz ligações entre a celulose e a lignina). Essas três estruturas compõem entre 97-99% da matéria seca dos materiais lignocelulósicos, gerando características nesses materiais como flexibilidade e alta resistência a agentes químicos (HIGUCHI; SANTOS; JARDIM, 1982).

A lignina apresenta uma matriz fenilpropânica que atua como sustentação estrutural molecular para o material lignocelulósico, a hemicelulose atua na interface unindo a celulose a lignina por meio de ligações de hidrogênio. Cada material lignocelulósico tem a sua concentração de celulose, hemicelulose, lignina e outros, essa variação pode ser mais detalhada na tabela seguinte (SAWATDEENARUNAT et al., 2015).

Quadro 1 - Concentração de celulose, hemicelulose e lignina em diferentes biomassas lignocelulósicas

(Continua)

Biomassa	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Referências
Bagaço de cana de açúcar	40-45	30-35	20-30	Cardona et al., 2010
Bagaço de sorgo doce	45	27	21	Kim e Day, 2011
Palha de trigo	33-40	20-25	15-20	Talebina et al., 2010
Palha de arroz	38	32	12	Lu e Hsieh, 2012
Casca de arroz	37,1	29,4	24,1	Kalita et al., 2015

Quadro 1 - Concentração de celulose, hemicelulose e lignina em diferentes biomassas lignocelulósicas

(Conclusão)

Biomassa	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Referências
Palha de soja	34	16	22	Wan et al., 2011
Palha de milho	38	23	20	Wan e Li, 2010
Espiga de milho	41	31	12	Chen et al., 2010
Álamo	44	20	29	Kim et al., 2009
Pinho	42	21	30	Sannigrahi et al., 2010
Pó de serra de <i>gmelina arbórea</i>	23	-	23,3	Kalita et al., 2015
Pó de serra de <i>salvadora oleoides</i>	24	-	21,8	Kalita et al., 2015
Gramma bermuda costeira	30	29	23	Lee et al., 2009
Capim Napier	47	31	22	Reddy et al., 2018
Capim Elefante	36	24	28	Scholl et al., 2015
Bamboo	45	24	20	Li et al., 2015
Resíduos de papéis	65	13	1	Chen et al., 2004
Palha de cevada	38	35	16	Sun et al., 2005

Fonte: Adaptado de BARUAH, J.; NATH B. K.; SHARMA R.; KUMAR S.; DEKA R. C.; BARUAH D. C.; KALITA, E. Recent trends in the pretreatment of lignocellulosic biomass for value-added products. **Frontiers in Energy Research**, Lausanne, v. 6, art. 141, 2018.

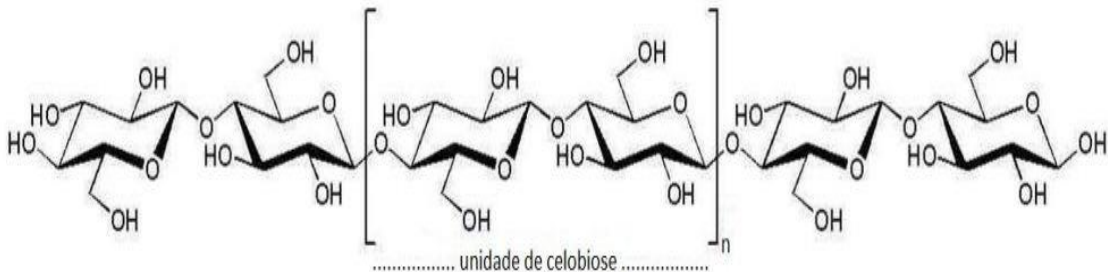
Como demonstrado no Quadro 1, a celulose pode variar de 20 à 65%, a hemicelulose de 16 à 35% e a lignina de 1 à 30% da composição da biomassa lignocelulósica.

2.2.1.1 Celulose

Polissacarídeo descoberto no ano de 1838 na França por Alselme Payen, a celulose ($C_6H_{10}O_5$)_n é considerada uma das principais composições dos materiais lignocelulósicos e de maior abundância na natureza. A celulose é caracterizada por ser um polímero de extensa fita planar homogênea, constituída por um único gênero de hexoses (β -D-glicose) em disposição com ligações glicosídicas $\beta(1 \rightarrow 4)$, cuja unidade de repetição é denominada celobiose (dímeros de glicose). Essa macromolécula não possui ramificações estruturais, o que acaba reforçando sua linearidade estrutural, como observado na Figura 3. Os resíduos de glicose adjacentes arranjam-se em rotação de 180° no próprio eixo, gerando interações por meio de ligações de

hidrogênio com as cadeias adjacentes, promovendo uma unidade polimérica de alta densidade molecular (SUHAS et al., 2016).

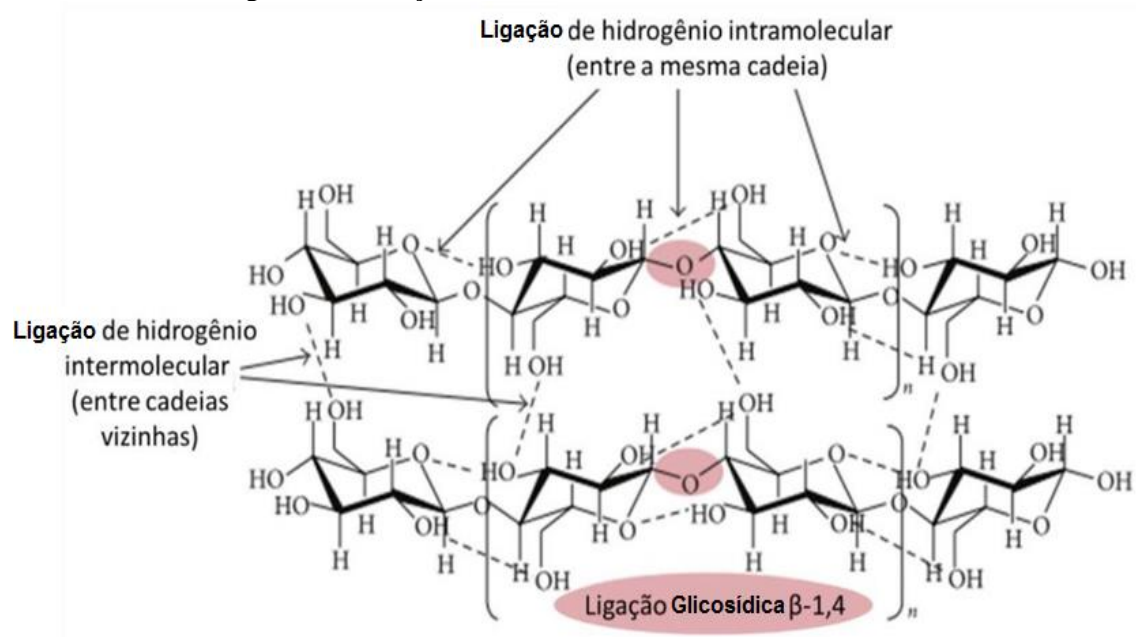
Figura 3 – Estrutura da celulose



Fonte: Adaptado de HENRIKSSON, G.; LENNHOLM, H. Cellulose and carbohydrate chemistry. In: **Wood chemistry and wood biotechnology**. Berlin: Walter de Gruyter, 2009. v. 1, p. 71-100.

A celulose é a base estrutural das plantas, sendo também encontrada em outros organismos, tais como fungos, algas e bactérias (KLEMM et al., 2005). Além disso, existe a presença de hidroxilas em cada fração da glicose e suas inúmeras interações intramoleculares de ligação de hidrogênio (Figura 4). Já nas interações intermoleculares de resíduos de glicose com os monolignóis fenilpropânicos, presentes na matriz da lignina, ocorre a formação de microrregiões com alto grau de cristalinidade. Para romper essas ligações intermoleculares e despolimerizar as cadeias de celulose, soluções fortemente ácidas ou alcalinas são indicadas e configuram um processo fundamental para o fracionamento dos polímeros a base de glicose (KHODAYARI et al., 2021; ZHENG et al., 2014).

Figura 4 - Interações intermoleculares do material celulósico

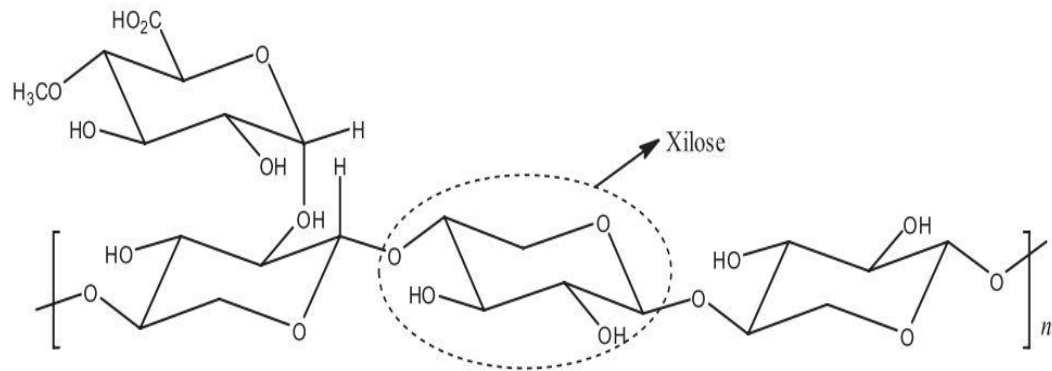


Fonte: Adaptado de LEE, H. V.; HAMID, S. B.; ZAIN, S. K. Conversion of lignocellulosic biomass to nanocellulose: structure and chemical process. *The Scientific World Journal*, v. 2014, p. 1-20. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1155/2014/631013>.

2.2.1.2 Hemicelulose

Polímero de cadeia curta, ramificada e de baixo peso molecular, são fundamentalmente amorfas, possuindo unidades de pentoses (arabinose e xilose), hexoses (galactose, glicose e manose) e ácidos urônicos (Figura 5). A hemicelulose, além da alta incidência de grupos hidroxila, possui ligações inter e intramoleculares suscetíveis a alta solubilidade, o que resulta em hidratação da fibras vegetais e alto grau de penetrabilidade de solventes, além de suscetibilidade à hidrólise. Esses polímeros recobrem as fibras de celuloses, configurando o domínio estrutural da celulose-hemicelulose do tecido vegetal, dessa forma atua como interface interativa entre a lignina e celulose, estabelecendo características de desenvolvimento às paredes celulares e desempenhando funções de estruturação e regulação de crescimento vegetal (BRODEUR et al., 2011; OGEDA; PETRI, 2010; SARKAR et al., 2012; TRIBOT et al., 2019).

Figura 5 - Representação estrutural da hemicelulose



Fonte: Adaptado de: SANTOS, F. A. *et al.* Potencial da palha da cana-de-açúcar para produção de etanol, **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.

As unidades monoméricas resultantes da despolimerização da hemicelulose (xilose, arabinose, manoses, glicose, galactose e ácidos galacturônicos) possuem elevado valor de mercado, podendo servir de matéria-prima para a produção de xilitol, furfural, ácido levulínico, hidroximetilfurfural e etanol de segunda geração por meio dos açúcares fermentescíveis (principalmente glicose) (VANHOLME et al., 2019).

2.2.1.3 Lignina

A lignina é responsável pela resistência mecânica dos vegetais, proteção dos tecidos contra ataques de micro-organismos e transporte de água, nutrientes e metabólitos dos vegetais (FENGEL; WEGENER, 1984). A lignina faz parte da parede celular e da lamela média dos vegetais, sendo uma substância amorfa (não cristalina). A lignina representa cerca de 20-35% da biomassa vegetal, sendo o segundo mais importante componente da parede celular de todas as plantas vascularizadas (KURODA et al., 2002).

A lignina é um polímero de unidade fenilpropânica $[C_9H_{10}O_3(OCH_3)_{0,9-1,7}]_n$ com repetições de forma irregular que possui complexidade na sua formação, pois possui diferentes ligações nas suas unidades fenilpropânicas (MORAIS, 1987, 1992).

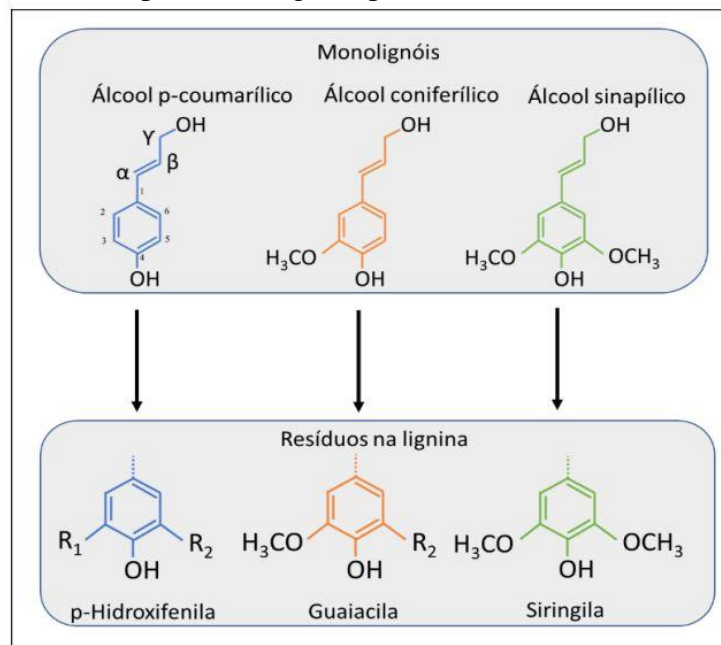
Existem diferenças estruturais nas ligninas presentes nos diferentes vegetais de acordo com sua origem (FENGEL; WEGENER, 1989). Essas diferenças estão relacionadas à composição da lignina (Quadro 2), compostas por unidades fenilpropânicas dos monolignóis: p-hidroxifenila (H), guaiacila (G) e siringila (S), cujas estruturas são mostradas na Figura 6.

Quadro 2 - Participação de monolignóis na composição de ligninas de diferentes tipos vegetais

Tipos Vegetais	Álcool Cumarílico (%) p-Hidroxifenila (H)	Álcool Sinapílico (%) Siringila (S)	Álcool Coniferílico (%) Guaiacila (G)
Coníferas	<5	≈ 0	>95
Folhosas	≈ 0-8	45-75	25-50
Gramíneas	5-35	20-55	35-80

Fonte: Adaptado de GELLERSTEDT, G. L. F.; HENRIKSSON, E. G. Lignins: major sources, structure and properties. *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*, Amsterdam, p. 203, 2008.

Figura 6 - Principais monolignóis precursores da estrutura da lignina



Fonte: Adaptado de: LAURICHESSE, S.; AVÉROUS, L.; Chemical modification of lignins: towards biobased polymers. *Progress in Polymer Science*, v. 39, p. 1266-1290, 2014. p.1272.

Plantas distintas apresentam matrizes de ligninas diferentes pois diferentes frações dos monolignóis resultam na diversidade das características materiais e biológicas da lignina; sendo assim, a lignina varia de acordo com sua origem e tipo de biomassa, trato e espécie. (RALPH et al., 2019).

As ligninas podem ser classificadas por meio do tratamento e agente envolvido para a sua extração; o Quadro 3 mostra algumas classificações de ligninas.

Quadro 3 – Tipos de Lignina em função do processo de obtenção

Tratamento	Tipos de lignina	Agentes
Extração sem reação (por dissolução)	Lignina nativa ou de Branus	Etanol
	Lignina de madeira moída	Moagem e dioxano-água(9:1)
Digestão enzimática	Lignina obtida enzimaticamente	Fungos
		Glicosidade
Extração com reação (como derivado)	Lignina Organossolve	Solvente orgânico / catalisador
	Lignina acetossolve	Ácido acético / catalisador
	Lignina dioxano	Dioxano / HCl
	Lignina de ácido tioglicólico	HSC ₂ H ₄ CO ₂ H
	Lignina fenólica	Fenol / HCl
	Lignina por solventes supercríticos	Condições supercríticas
	Lignina aquasolve	Água quente/ enzimas
Hidrogenação (como derivado)	Lignina de hidrogenólise	H ₂
Reação com reagente inorgânicos (derivação)	Lignina sulfítica	SO ₃ / HSO ₃
	Álcali de lignina	NaOH
	Tiolignina	Na ₂ S / NaHS
	Lignina Kraft	NaOH / Na ₂ S
Hidrólise de polissacarídeos	Lignina Klason	H ₂ SO ₄
	Lignina Runkel	H ₃ SO ₄ /HBr
	Lignina de Willstatter	HCl
	Lignina Flourídrica	HF
	Lignina Trifluoracética	CF ₃ CO ₂ H
	Lignina Cuoxan	NaOH/ H ₂ SO ₄ /Cu(NH ₃) ₄ (OH) ₂
Oxidação de polissacarídeos	Lignina Purves	Na ₃ H ₂ IO ₆

Fonte: Adaptado PILÓ-VELOSO, D.; NASCIEM, E. A.; MORAIS, S. S. L. Isolamento e análise estrutural de ligninas. *Química Nova*, São Paulo, v. 16, p. 435-448, 1993.

A lignina é comercializada conforme o seu grau de pureza. Produtos químicos de maior valor podem ser obtidos à medida que ligninas mais puras estiverem disponíveis. O uso da lignina para fabricação de químicos é limitado, por conta da presença de contaminantes, como sais, açúcares, partículas, entre outros (NALI; RIBEIRA; HORA, 2016).

De acordo com Bacovsky et al (2012), devido a alta capacidade de reatividade da lignina, essa biomolécula pode ser amplamente utilizada em mistura com outros materiais para melhorar suas propriedades, tal como mistura de polímeros para melhoria da resistência mecânica, adição em resinas para reformulação de adesivos, uso de embalagens de alimentos e em aplicação médica, uma vez que a lignina reduz a permeabilidade em relação aos gases (dióxido de carbono e oxigênio) e água e leva a uma menor taxa de degradação e inflamabilidade.

2.3 BIORREFINARIA

O termo biorrefinaria é amplamente discutido e possui várias definições, mas segundo a National Renewable Energy Laboratory (NREL), biorrefinaria é classificada como uma indústria que converte a biomassa em matérias-primas para combustíveis, energia ou produtos químicos (NREL, 2008). As biorrefinarias são definidas também como um processo sustentável de biomassa na produção de materiais comercializáveis (alimentos, rações, materiais, químicos, entre outros) e energia (combustíveis, eletricidade e calor) (RALPH et al., 2019).

As biorrefinarias podem ser divididas de acordo com a biomassa utilizada, sendo usualmente classificadas em biorrefinaria de primeira geração ou de segunda geração (SUN et al., 2017):

- i. Biorrefinaria de primeira geração — As biorrefinarias mais comuns encontrados na atualidade utilizam matérias-primas ricas em sacarose (Ex.: cana-de-açúcar e beterraba sacarina) ou amido (Ex.: milho, trigo e mandioca) como fontes de carboidratos para a produção de etanol;
- ii. Biorrefinaria de segunda geração – Utilizam como matérias-primas materiais ricos em celulose, hemicelulose e lignina. Nesse tipo de produção, a biomassa deve passar por processos de pré-tratamento e e hidrólise, antes da fermentação. Atualmente, as biorrefinarias que produzem etanol de segunda geração se encontram em estágio de desenvolvimento;

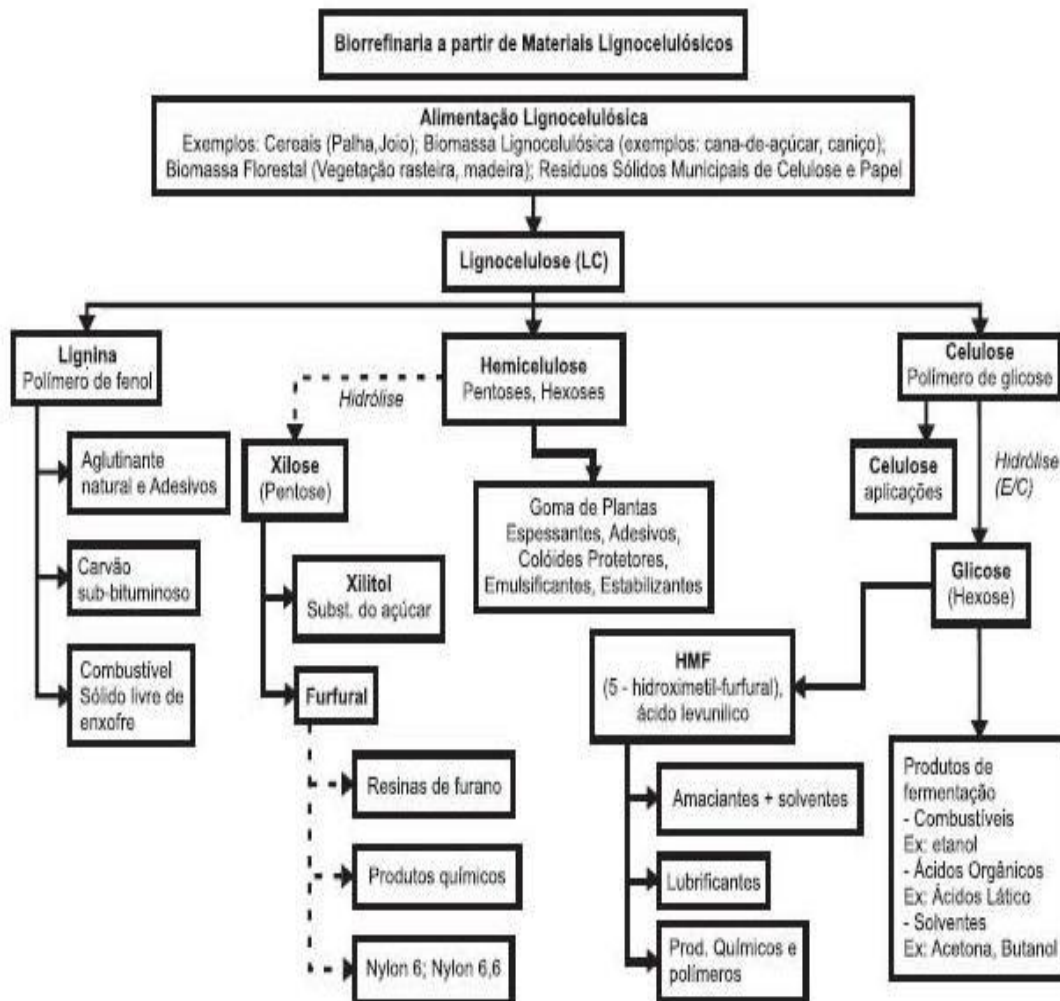
As biorrefinarias de primeira geração são alvo de discussão, e muitas vezes de críticas, no que diz respeito à competição com a produção de alimentos, uma vez que as matérias-primas utilizadas são comumente utilizadas na alimentação humana e animal (RODRIGUES, 2011). A biorrefinaria de segunda geração, por outro lado, utiliza biomassa lignocelulósica como fonte de produção de etanol 2G, diminuindo o conflito com a alimentação humana, sendo utilizados

resíduos de outros processos e rejeitos, ou produtos não comestíveis, que minimizam a competição entre produção de combustíveis e alimentos (ALVIM et al., 2014).

Segundo Biorefinery Roadmap (FNR, 2012), a biorrefinaria de segunda geração pode ser dividida em dois refinamentos até a obtenção dos produtos finais: (i) o refino primário consiste basicamente em processos destinados ao tratamento e desagregação dos componentes da biomassa (etapa diretamente ligada à origem da biomassa empregada); (ii) o refino secundário refere-se aos processos (sacarificação, filtração, fermentação, destilação) de conversão e processamento dos elementos gerados no refino primário.

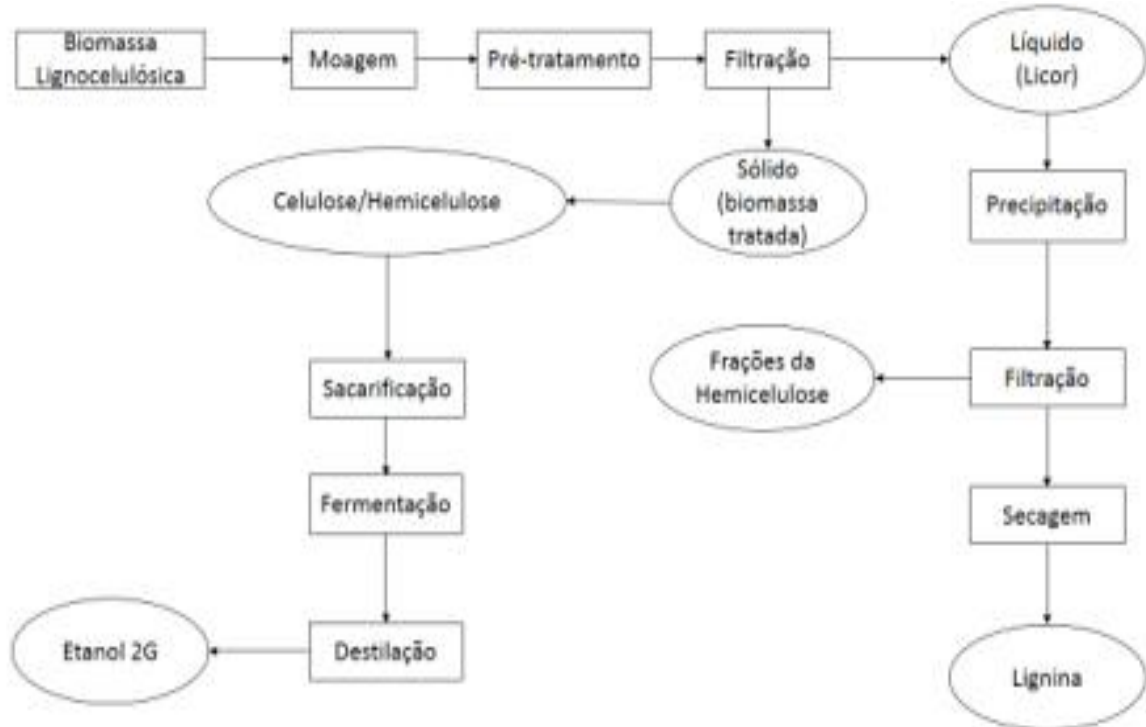
O conceito de biorrefinaria de segunda geração pode ser visto na Figura 7, onde os componentes da biomassa lignocelulósica (celulose, hemicelulose e lignina) obtidos após desestruturação podem gerar diversos produtos comercializáveis.

Figura 7- Possíveis produtos gerados a partir de uma biorrefinaria de segunda geração



Na Figura 7 são mostrados os produtos gerados por meio de uma biorrefinaria de segunda geração, no entanto, o processo de desestruturação e despolimerização da biomassa envolve várias etapas, como mostrado na Figura 8: pré-tratamento (que promove a separação da lignina, hemicelulose e celulose), sacarificação (hidrólise dos polissacarídeos resultando em monossacarídeos glicose e xilose), fermentação e destilação (CARDONA; QUINTERO, 2010).

Figura 8 – Fluxograma resumido de uma biorrefinaria de biomassa lignocelulósica



Fonte: Adaptado de ZHANG, K.; PEI, Z.; WANG, D.; Organic solvent pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and biochemicals: a review. **Bioresource Technology**, Oxon, v. 199, p. 21–33, 2016.

O pré-tratamento abordado no processo da Figura 8 é uma das etapas mais importante para a eficiência de uma biorrefinaria de segunda geração, pois é por meio desse processo que ocorre a desestruturação da biomassa lignocelulósica (lignina, celulose e hemicelulose), separando a lignina da celulose e da hemicelulose. Essa etapa é alvo de diversos estudos em busca de um pré-tratamento que consiga recuperar ao máximo os açúcares da biomassa lignocelulósica, segregando a lignina com o mínimo de modificação estrutural (COHEN, 2010; RABELO, 2011).

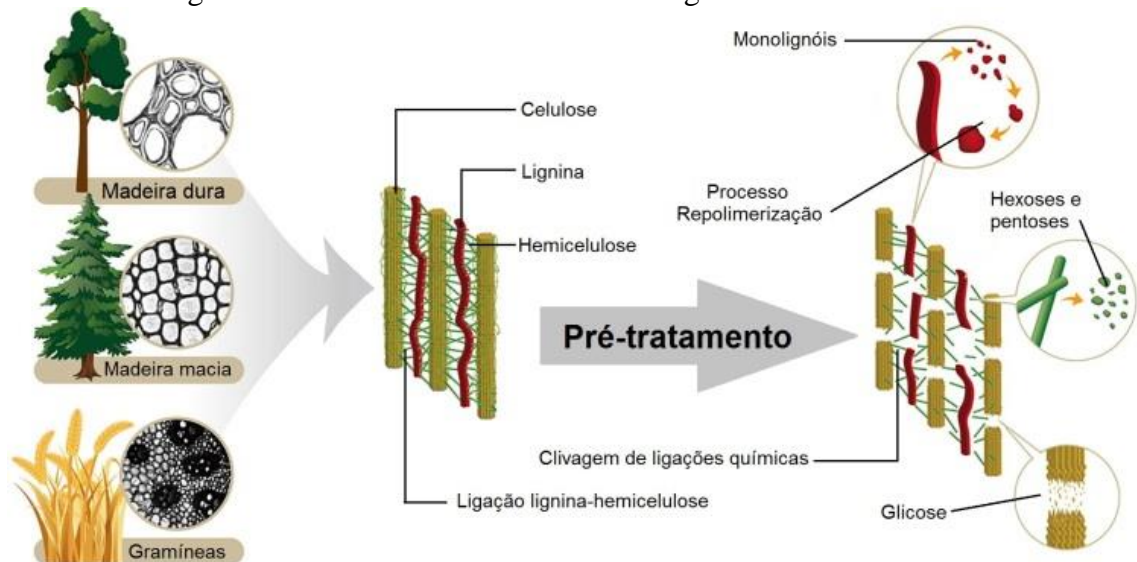
2.3.1 Pré-tratamento

Os materiais lignocelulósicos apresentam uma extensa matriz de entrecruzamentos de proteína, polissacarídeos e lignina, o que o torna altamente recalcitrante. A clivagem das

ligações químicas e a separação dos componentes constituintes da parede celular vegetal representam um dos obstáculos mais relevantes para que os processos que aproveitam integralmente a biomassa vegetal sejam implantados industrialmente, dentro do conceito de biorrefinaria (BARUAH et al., 2018; LIAO et al., 2020).

A etapa na qual se tem a separação total ou parcial dos componentes do material lignocelulósico, dentro de um processo global de biorrefinaria, é chamado de pré-tratamento (Figura 9). O pré-tratamento deve promover a deslignificação do material lignocelulósico, fornecendo um material rico em celulose e hemicelulose para a produção de etanol de 2G e de lignina para fins comerciais, tornando o processo de etanol de 2G economicamente viável (MEI et al., 2019).

Figura 9 - Pré-tratamento em materiais lignocelulósicos



Fonte: Adaptado de SUN, Q. *et al.* Ultrastructural change in lignocellulosic biomass during hydrothermal pretreatment, *Bioresource Technology*, Oxon, v. 341, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125807>.

Um pré-tratamento próximo das condições ideais deve atender as seguintes condições (CARVAJAL et al., 2016):

- i. Ser operacionalmente simples e econômico;
- ii. Exigir mínimas quantidades de reagentes, produtos químicos e energia durante o processo;
- iii. Apresentar limitada corrosão aos equipamentos;
- iv. Possibilitar alteração da estrutura das biomassas;
- v. Apresentar seletividade racional à perda de polissacarídeos

- vi. Conceber matrizes fenilpropânicas de alta qualidade ou produtos secundários derivados da lignina;

2.3.1.1 Tipos de pré-tratamentos

Existem diversos tipos de pré-tratamentos para os materiais lignocelulósicos, esses processos causam a ruptura das ligações LCC (“lignina-carbohydrate complexes” – complexos covalentes de lignina – carboidrato), separando a lignina dos carboidratos, além de promover a despolimerização parcial da lignina por meio da clivagem das ligações éter. Os tipos de pré-tratamentos podem ser divididos em processos: biológicos, químicos, físicos e combinados, como mostrado no Quadro 4.

Quadro 4 - Tipos de pré-tratamentos

(Continua)

Pré-tratamento		Características Composicionais			Geração de Compostos Tóxicos	Vantagens	Desvantagens
		Celulose	Hemiceluloses	Lignina			
Físico	Moinho de bolas	Intensiva diminuição do grau de cristalinidade	Não remove	Não remove	Não há	Redução da Cristalinidade	Alto consumo de energia
	Explosão a vapor	Pouca despolimerização	80 - 99,9% de remoção	Pouca remoção com mudança de estrutura	Alta Formação	Energia eficiente, nenhum custo de reciclagem	Degradação da Xilana como produto inibitório
	Hidrotérmico	Diminuição do Grau de Cristalinidade e aumento dos poros.	Alta solubilização	Pouca remoção com moderada transformação na estrutura	Baixa Formação	Não requer catalisador e reatores são de baixo custo	Alto consumo de energia e água
Químico	Ácido diluído	Pouca despolimerização.	80 - 99,9% de remoção.	Pouca remoção com mudança de estrutura	Baixa Formação.	Condições médias, altas produções de Xilose.	Difícil recuperação do ácido, corrosivo e relativamente custoso.
	Alcalino	Inchaço significativo.	Considerável solubilidade.	Solubilização, > 50%	Baixa Formação.	Remoção efetiva de ésteres	Reagente caro, recuperação alcalina.
	Organosolvente	Considerável inchaço.	Solubilização, >90%	Solubilização, >90%	Média/Baixa Formação.	Altas produções de xilose.	Recuperação de solvente, técnica de alto custo.
Biológico	Enzimático	20 – 30% de despolimerização.	Solubilização, >80%	≈ 40% de deslignificação	Sem Formação a Baixa Formação	Baixo gasto de energia, efetiva deslignificação.	Perda de celulose, baixa taxa de hidrólise.

Quadro 4 - Tipos de pré-tratamentos

(Conclusão)

Pré -tratamento		Características Composicionais			Geração de Compostos Tóxicos	Vantagens	Desvantagens
		Celulose	Hemiceluloses	Lignina			
Combina do	Explosão a vapor	Pouca despolimerização	80-100% de remoção	Pouca remoção, mas ocorre mudança da estrutura	Baixa Formação	Energia eficiente, nenhum custo de reciclagem.	Degradação da xilana como produto inibitório
	AFEX (exposição à Amônia)	Diminuição do grau de cristalinidade	Acima de 60% de solubilidade	10-20% de solubilização.	Média/Baixa Formação.	Menor perda de xilanas, não formação de inibidores.	Recuperação de amônia, não é efetivo para alta concentração de lignina.

Fonte: Adaptado de HALDERA, P. *et al.* Progress on the pre-treatment of lignocellulosic biomass employing ionic liquids. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 105, p. 268-292, 2019, p. 271-272.

Devido à alta complexidade e grande variabilidade dos diferentes materiais lignocelulósicos, não há um processo de pré-tratamento que atenda a todos os quesitos de condições ideais. Dessa forma, o desenvolvimento de um pré-tratamento otimizado deve levar em consideração o tipo de biomassa, os produtos que se deseja obter, bem como o custo e a rentabilidade do processo como um todo (TRIBOT et al., 2019).

2.3.1.1.1 Pré-tratamento químico organosolve

Um dos pré-tratamentos que podem ser destacados como promissor, considerando a possibilidade de implementação em larga escala, o pré-tratamento organosolve, é o foco de diversos estudos. Esse método de pré-tratamento é feito por meio de solventes orgânicos ou soluções aquosas que promovem a quebra das ligações internas entre lignina e hemicelulose, deixando um resíduo de celulose relativamente puro. Durante o processo do pré-tratamento, ocorre na biomassa a deslignificação e a solubilização da hemicelulose, levando a um aumento do volume de poros e um aumento na área de superfície da celulose, influenciando a acessibilidade nas etapas de hidrólise enzimática e sacarificação (ZHANG; XIA; MA, 2016).

Os solventes orgânicos mais comumente utilizados para esse processo são: etanol, metanol, acetona, ácidos orgânicos e etilenoglicol, puros ou em misturas aquosas. O processo frequentemente é acompanhado pela adição de um catalisador para baixar a temperatura do pré-tratamento ou melhorar a taxa de deslignificação. Normalmente, são usados como catalisadores ácidos minerais (Ex.: ácido clorídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico) ou bases (Ex.: cal, hidróxido de sódio, amônia, entre outros) (SUN; CHEG, 2002; ZHANG, 2008).

A principal vantagem do pré-tratamento organsolve é a possibilidade de isolar os componentes constituintes da biomassa (lignina, hemicelulose e celulose) com alta integridade e elevado grau de pureza, além de poder reutilizar os solventes orgânicos após destilação, reciclando os solventes para o processo de pré-tratamento. Outra vantagem é a possibilidade de utilização da lignina de alta qualidade extraída durante o processo, o que é essencial para a viabilização econômica do processo com o mesmo todo. No entanto, o processo possui algumas desvantagens, como: os solventes orgânicos utilizados na maioria dos casos possuem alto custo e precisam ser recuperados o máximo possível, demandando muito energia para tal processo; os solventes orgânicos possuem alta inflamabilidade e alta volatilidade, fazendo com que o processo de pré-tratamento tenha que ser muito bem controlado (CHIN et al., 2020; FERREIRA; TAHERZADEH, 2020; PAN; XIE; YU, 2008).

Todo processo que envolve a extração da lignina do material vegetal acaba modificando sua estrutura molecular, em vista disso, não existe um método de isolamento da lignina que mantenha sua estrutura molecular original. Porém, existem alguns métodos de extração que afetam a estrutura menos que outros, como o processo organsolve (CHAKAR; RAGAUSKAS, 2004; JOHN; THOMAS, 2008; PASQUINI et al., 2002; PILÓ-VELOSO; NASCIEM; MORAIS, 1993).

O solvente orgânico mais comumente utilizado é o etanol, pois o seu processo é de baixo custo, além de degradar menos a lignina através dos solventes orgânicos, onde a lignina será solubilizada (KLEINERT, 1974; SARKANEN, 1990; ZHANG; XU; LI, 2007). O Quadro 5 mostra alguns exemplos de processos organsolve em diferentes tipos de biomassa e em diferentes condições.

Quadro 5 - Processo Organosolve em diferentes tipos de biomassa e em diferentes condições (Continua)

Matéria-prima	Solvente Álcool (Catalisador)	Condições de Pré-tratamento	Resultados	Referências
Miscanthus	50% de etanol (ausência)	12% de conteúdo de sólidos a 190 °C por 80 min	75% de remoção de lignina	Brosse <i>et al.</i> (2010)
Palha de Trigo	60% de etanol (ausência)	10% de conteúdo de sólidos a 200 °C por 60 min	56% de rendimento de lignina, paralisada rendeu 60% de bio-óleo com 40%	De Wild <i>et al.</i> (2012)
Eucalipto	50% de etanol (ausência)	10% de conteúdo de sólidos a 200 °C por 60 min	Lignina reduzida de 32% para 11%	Wen <i>et al.</i> (2013)

Quadro 5 - Processo Organosolve em diferentes tipos de biomassa e em diferentes condições

(Continua)

Matéria-prima	Solvente Álcool (Catalisador)	Condições de Pré-tratamento	Resultados	Referências
Junco	70% de etanol (ausência)	Imersão em NaOH 1% e teor de sólidos de 5% a 60 °C por 360 min	A hidrólise rendeu 40 g / L de glicose e 3,6 g / L de Xilose. A fermentação rendeu 9,1 e 14,2 g / L de biobutanol	Zhu <i>et al.</i> (2015)
Eucalipto	75% Etanol (1% de ácido acético)	20% de conteúdo de sólidos a 200 °C por 60 min	67% de hemicelulose de soluto e 12% de lignina	Teramoto <i>et al.</i> (2008)
Palha de trigo	50% de etanol (0,02–2 N H ₂ SO ₄)	5% de conteúdo sólido a 83-196 °C por 10-180 min	Máximo solubilizado 96% de lignina	Sidiras e Koukios (2004)
Madeira macia mista	40–60% de etanol (H ₂ SO ₄ ajustando pH 2,0-3,4)	10-15% de conteúdo sólido a 185-198 °C por 30-60 min	Mínimo de 6,4% de lignina residual, conversão > 90% de sólidos em glicose com enzima	Pan <i>et al.</i> (2005)
Choupo híbrido	25–75% de etanol (0,83–1,67% H ₂ SO ₄)	10% de conteúdo sólido a 155–205 °C por 26–94 min	A condição ótima rendeu 88% de celulose com 82% de hidrólise eficiência e 72% de xilose	Pan <i>et al.</i> (2006)
Pinheiro Radiata.	60% de etanol (0,13% H ₂ SO ₄)	16% de conteúdo sólido a 185 °C durante 18 min	Fermentação rendeu 63,8% por fungo	Monrroy <i>et al.</i> (2010)
Bagaço da cana-de-açúcar	50% de etanol (1,25% H ₂ SO ₄)	20% de conteúdo sólido a 175 °C durante 60 min	Sólidos 87% de rendimento, 28% de conteúdo de lignina	Mesa <i>et al.</i> (2010)
Resíduos de horticultura	70% de etanol (1% de H ₂ SO ₄ / acético / Ácido clorídrico / fosfórico)	5% de conteúdo de sólidos a 70 °C por 240 min	Rendimento de 17,5% de sólidos com rendimento de açúcar de 26,9 g / L e 11,69 g / L etanol usando <i>S. Cerevisiae</i> .	Geng <i>et al.</i> (2012)

Quadro 5 - Processo Organosolve em diferentes tipos de biomassa e em diferentes condições

(Continua)

Matéria-prima	Solvente Álcool (Catalisador)	Condições de Pré-tratamento	Resultados	Referências
Tulipeira (L. tulipifera)	50% de etanol (1% de H ₂ SO ₄)	10% de conteúdo de sólidos a 120, 130 e 140 °C por 50 min	Taxa de hidrólise de açúcar de até 77,3%, embora 20% de lignina permaneça em sólidos	Koo <i>et al.</i> (2012)
Bambu	75% de etanol (2% de H ₂ SO ₄)	16% de conteúdo de sólidos a 180 °C por 30 min	Rendimento de celulose de 84,5% com taxa de hidrólise enzimática de 77,1%, > 87,2% de recuperação de lignina	Li <i>et al.</i> (2013b)
Sweetgum	65% de etanol (1,1% de H ₂ SO ₄)	14% de conteúdo de sólidos a 170 °C por 60 min	Hidrólise de glicose de 98,9% com taxa inicial de 1,19 g / L / h e 9,7% residual de xilose	Li <i>et al.</i> (2013a)
Palha de trigo	60% de etanol (30 mM H ₂ SO ₄)	10% de conteúdo de sólidos a 190 °C por 60 min	90% de digestibilidade enzimática da glicose	Wildschut <i>et al.</i> (2013a)
Palha de arroz	75% de etanol (1% de H ₂ SO ₄)	12% de conteúdo de sólidos a 150 °C por 60 min	46,2% de rendimento de hidrólise de glicose e fermentado até 80,3 g butanol, 21,1 g de acetona 22,5 g de etanol por kg de matéria-prima.	Amiri <i>et al.</i> (2014)
Álamo	Etanol (1 N NaOH)	165 °C por 30 min.	Remoção de até 75% de lignina e 60% de hemicelulose, 50% taxa hidrólise 24h	Holtzaple e Humphrey (1984)

Quadro 5 - Processo Organosolve em diferentes tipos de biomassa e em diferentes condições

(Continua)

Matéria-prima	Solvente Álcool (Catalisador)	Condições de Pré-tratamento	Resultados	Referências
Junco	40% de etanol (25% de NaOH)	16% de conteúdo de sólidos a 170 °C por 60 min.	Lignina inicial de 61%, lignina em massa de 23% e lignina residual de 16%.	Shatalov e Pereira (2005)
<i>T. ustromongolia</i>	70% de etanol (0,5% KOH)	4% de conteúdo de sólidos a 75 °C por 120 min.	Os líquidos tinham 33,7-6,5% de glicose, 14,8-5,6% de arabinose e 62,2-54,8% xilose.	Sun <i>et al.</i> (2011)
Bambu	75% de etanol (10% de NaOH)	16% de conteúdo de sólidos a 120, 140 e 180 C por 30 min.	As condições ideais renderam 60,1% de celulose e 45,1% celulose em glicose	Li <i>et al.</i> (2013b)
Pinus Rigida	50% de etanol (1% de H ₂ SO ₄ / NaOH / MgCl)	10% de conteúdo sólido a 150-210 °C por 0-20 min.	Maior rendimento teórico de etanol de 70% para H ₂ SO ₄	Park <i>et al.</i> (2010)
Choupo amarelo	50% de etanol (1% de H ₂ SO ₄ / NaOH)	10% de conteúdo de sólidos em 120, 130 e 140 °C para H ₂ SO ₄ , 140, 150 e 160 °C para NaOH.	Holocelulose recuperou 50% para H ₂ SO ₄ e 60% para NaOH com menos inibidor.	Koo <i>et al.</i> (2011)
Palha de trigo	40% de etanol (0,1% de NaOH)	Pré-extração de fluxo de combinação e solvente orgânico pré-tratamento com 2% de conteúdo sólido.	75% de rendimento de lignina e 94% de rendimento de celulose	Chen e Liu (2007)
Acacia dealbata	60% de etanol (ausência)	Combinação de pré-hidrólise (fúngica) e pré-tratamento com solvente com 15% de conteúdo de sólidos a 160 °C por 60 min	Os sólidos renderam 95% de glucana e 2% de lignina, quase 100% de conversão de glucano-glicose.	Muñoz <i>et al.</i> (2007)

Quadro 5 - Processo Organosolve em diferentes tipos de biomassa e em diferentes condições

(Conclusão)

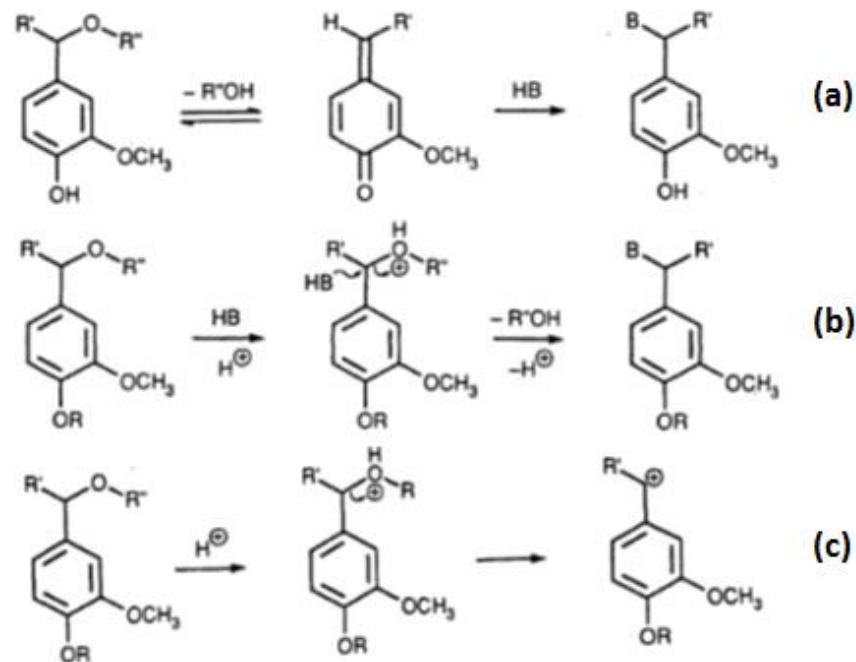
Matéria-prima	Solvente Álcool (Catalisador)	Condições de Pré-tratamento	Resultados	Referências
Bagaço da cana-de-açúcar	10%, 20%, 30% de etanol (3% NaOH)	Combinação de pré-hidrólise (H ₂ SO ₄) e pré-tratamento com solvente em 175, 185, 195 °C por 20, 40, 80 min	As condições ideais produziram 18,1 g / L de glicose, correspondente a 29,1 g de glicose / 100 g de bagaço.	Mesa <i>et al.</i> (2011)

Fonte: Adaptado de ZHANG, K.; PEI, Z.; WANG, D.; Organic solvent pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and biochemicals: a review. *Bioresource Technology*, Oxon, v. 199, p. 21–33, 2016.

No pré-tratamento Organosolve, as diferentes condições de tratamento no material lignocelulósico podem variar, como no caso da temperatura (110-220°C), o tipo de catalisador usado (ácido ou básico), o tempo de pré-tratamento (20 min – 72 horas), a concentração do solvente (1-100%) e o valor de pH da solução (1-14). Todas essas condições de pré-tratamento têm como objetivo principal a otimização na recuperação de açúcares da biomassa (BARUAH *et al.*, 2018).

As principais reações que promovem a deslignificação no processo organosolve são a hidrólise das ligações lignina-hemicelulose, bem como as clivagens das ligações internas do tipo éter da lignina (α -O-4 e β -O-4), o que promove a despolimerização da molécula em fragmentos de menor massa molar. Além disso, outras reações químicas podem ocorrer, como modificações de grupos funcionais de cadeias laterais e repolimerização de fragmentos solubilizados, que podem novamente se depositarem na biomassa prejudicando os processos subsequentes, tais como, hidrólise da celulose para a produção de etanol 2G e diminuição da lignina recuperada do licor (ZHOU *et al.*, 2018).

As clivagens das ligações internas do tipo éter seguem diferentes mecanismos quando submetidos a catalisadores ácidos ou básicos, porém independentemente do tipo de catalisador, as ligações do tipo (α -O-4) são mais fáceis de serem rompidas do que as ligações do tipo (β -O-4). Na Figura 10 são apresentados mecanismos de clivagem das ligações (α -O-4) sem catalisador e com catalisador ácido (ZHOU *et al.*, 2018).

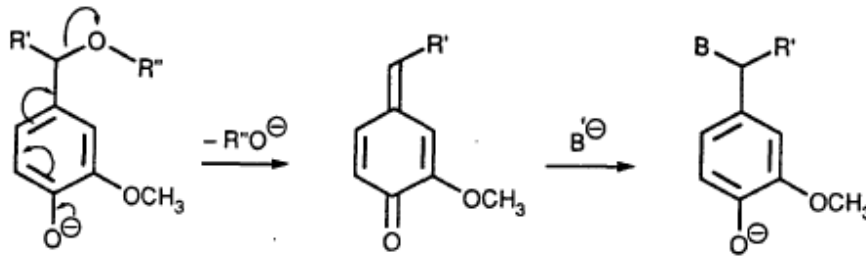
Figura 10 - Mecanismos de clivagem das ligações (α -O-4)

Fonte: Adaptado de MCDONOUGH, T.J. The chemistry of organosolv delignification. **Tappi Journal**, Atlanta, v. 76, n. 8, p. 186-193, 1993.

De acordo com a Figura 10, a solvólise em processos não catalisados (Figura 10a) ocorre via formação de um intermediário do tipo quinona-metídeo, enquanto que em processos com catálise ácida pode-se propor uma solvólise facilitada a partir de mecanismos de substituição nucleofílica, como pode ser visto nas Figuras 10b e 10c. Em ambas as condições, podem ocorrer condensações indesejáveis com outras unidades contendo átomos com alta densidade eletrônica (Ex.: oxigênio fenólico), que podem agir como nucleófilos (BARUAH et al., 2018).

O mecanismo proposto para a clivagem de ligações (α -O-4) catalisada por bases (Figura 11) é bastante similar ao que ocorre no processo sem catálise (Figura 10 a), porém a ionização da hidroxila fenólica (em função do pH do meio) facilita a conversão no intermediário quinona-metídeo, aumentando a velocidade da reação. Uma vez que os íons fenolato podem atuar como agentes nucleofílicos, atacando o intermediário quinona-metídeo, e estes também podem formar carbânions nas posições “orto” e “para” (com relação ao fenol ionizado) por ressonância, existe a possibilidade de condensação de fragmentos de lignina por meio da formação de ligações C-C entre estas posições e a posição α de uma outra unidade (BARUAH et al., 2018).

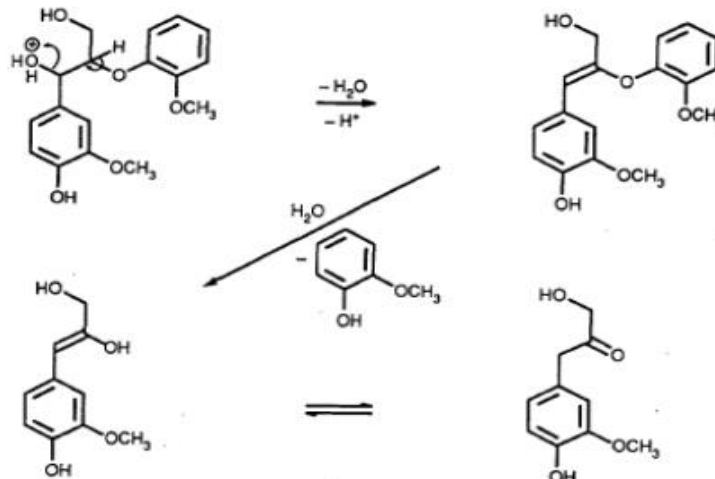
Figura 11 - Proposta de mecanismos de clivagem das ligações (α -O-4) catalisada por base



Fonte: Adaptado de MCDONOUGH, T.J. The chemistry of organosolv delignification. **Tappi Journal**, Atlanta, v. 76, n. 8, p. 186-193, 1993.

No caso da clivagem de ligações do tipo (β -O-4) catalisada por ácidos, dois principais mecanismos são mais disseminados na literatura. No primeiro deles, é prevista a formação de um estado de transição seguido de eliminação de água e formação de um enol-éter. Com a hidrólise do enol-éter são produzidas duas moléculas fenólicas, sendo que uma delas apresenta um grupo enol na cadeia lateral, o qual existe em equilíbrio com sua forma de cetona. Na Figura 12 são apresentadas as reações previstas para um composto modelo (CHIN et al., 2020; FERREIRA; TAHERZADEH, 2020; PAN; XIE; YU, 2008).

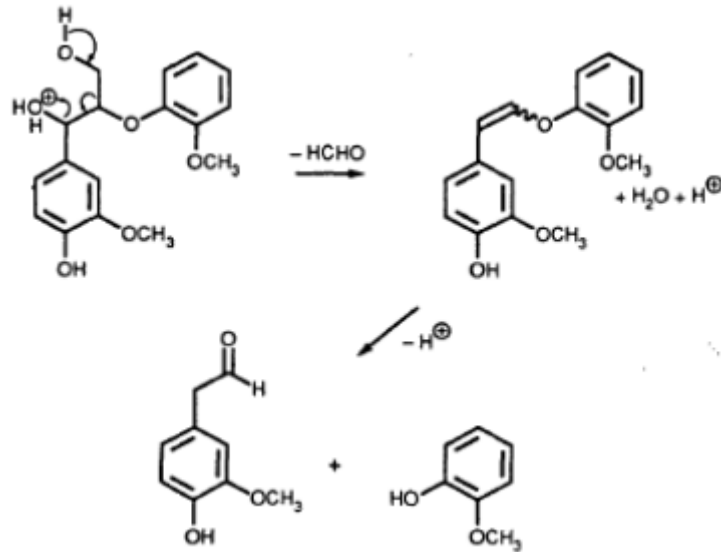
Figura 12 - Proposta de clivagem das ligações (β -O-4) catalisada por ácido



Fonte: Adaptado de MCDONOUGH, T.J. The chemistry of organosolv delignification. **Tappi Journal**, Atlanta, v. 76, n. 8, p. 186-193, 1993.

Um segundo mecanismo para a clivagem de ligações (β -O-4) em meio ácido prevê a eliminação de uma molécula de formaldeído a partir de uma estrutura protonada, dando origem a um enol-éter, que uma vez hidrolisado gera duas moléculas fenólicas, sendo que uma delas apresenta um grupamento aldeído em sua cadeia lateral (Figura 13) (ZHANG; XIA; MA, 2016).

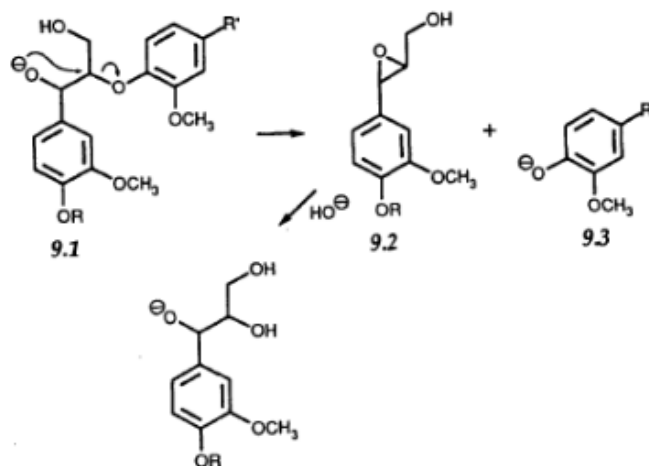
Figura 13 - Proposta de clivagem de ligações (β -O-4) catalisada por ácido com liberação de formaldeído



Fonte: Adaptado de MCDONOUGH, T.J. The chemistry of organosolv delignification. **Tappi Journal**, Atlanta, v. 76, n. 8, p.186-193, 1993.

Na hidrólise de ligações (β -O-4) mediada por catálise básica (Figura 14), uma hidroxila ionizada na posição α atua como um agente de ataque nucleofílico intramolecular clivando a ligação éter, o que dá origem a um fragmento fenólico (ionizado) e um epóxido, sendo este último aberto por meio do ataque de um íon OH^- presente no ambiente alcalino (ZHANG; XIA; MA, 2016).

Figura 14 - Proposta de clivagem de ligações (β -O-4) por catálise básica



Fonte: Adaptado de MCDONOUGH, T. J. The chemistry of organosolv delignification. **Tappi Journal**, Atlanta, v. 76, n. 8, p. 186-193, 1993.

Em linhas gerais, o pré-tratamento Organosolve pode ser considerado um dos mais promissores quando se vislumbram biorrefinarias baseadas em biomassa vegetal. Além da

versatilidade com relação às condições de processo (podem ser utilizados solventes de alta volatilidade, solventes podem ser de baixa toxicidade, possuem alta miscibilidade com água e os solventes podem ser gerados a partir de fontes renováveis, como o etanol) e boa capacidade de isolar os componentes constituintes (celulose, hemicelulose e lignina) com alta integridade e elevada grau de pureza, sendo assim, este tipo de pré-tratamento é passível de ser implementado em plantas industriais de alta produção (ZHANG; XIA; MA, 2016).

2.4 SOJA

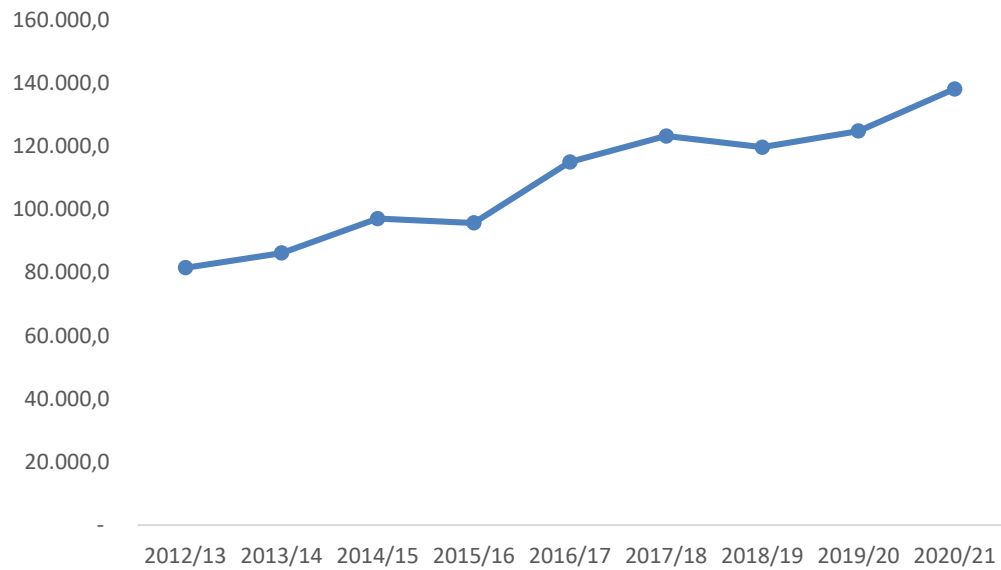
A soja é uma planta herbácea, com ciclo produtivo de 100 a 160 dias; no mercado hoje esse ciclo varia de 60 a 120 dias. Sendo constituída por folhas, caule e raízes, a soja é autógama - uma planta polinizada por ela mesma. A produção de grãos na soja se dá por meio de vagens (CARVALHO, 1992).

Segundo Carvalho (1992), a relação da palhada com a massa do grão da soja varia de 120 a 150%. Sendo assim, o Brasil tem uma grande quantidade da palha da soja deixada nas lavouras, que pode ser usada para diversas finalidades. A palha da soja possui um baixo valor nutricional, com teores de proteínas, energia e minerais baixos. No entanto, possui um teor de fibra e uma fração indigerível alta (MARTIN, 1987; NUCCI, 1994).

O Brasil, o maior produtor de soja do mundo, teve uma produção de soja na safra 2020/2021 de 135,385 milhões de toneladas do grão (área plantada de 38,502 milhões de hectares e produtividade de 3.517 kg/ha), acima do segundo maior produtor de soja do mundo, os Estados Unidos, com produção de 112,549 milhões de toneladas do grão (área plantada de 33,313 milhões de hectares e produtividade de 3.379 kg/ha) (EMBRAPA, 2022). Pode-se estimar que na safra 2020/2021 foram produzidos entre 167,2 a 209,1 milhões de toneladas de palha de soja no Brasil, que se somados à estimativa de produção nos EUA, chegam a 302,3 – 377,9 milhões de toneladas.

A produção de soja no Brasil tem crescido durante os últimos anos, como mostrado no Gráfico 1.

Gráfico 1 – Série histórica de produção de soja no Brasil (mil toneladas)



Fonte: CONAB, **Safra Brasileira de Cana-de-Açúcar**, Acompanhamento da safra brasileira, palha de soja, 19/08/21.
Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safra/cana>> Acesso em: 03 de jan. 2022.

Nas últimas 10 safras a produção de soja no Brasil cresceu cerca de 110%, e se considerarmos a produção nos últimos 40 anos, esse crescimento chega a cerca de 980%.

Diante desse cenário de crescente produção de soja no Brasil, considerando que a massa da palha de soja gerada na produção é cerca de 1,2 a 1,5 vezes a do grão, e que a palha de soja tem grande concentração de celulose, tem-se nesse resíduo agrícola um grande potencial para ser utilizado como matéria-prima em biorrefinarias de segunda geração, sendo necessário para isso que se desenvolvam processos otimizados que possam utilizar integralmente este material lignocelulósico.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar o pré-tratamento Organosolve de palha de soja utilizando-se etanol como solvente orgânico, visando a máxima recuperação de glicose após hidrólise enzimática do material pré-tratado, bem como avaliar a massa molar da lignina recuperada a partir dos licores de pré-tratamento obtidos nas melhores condições.

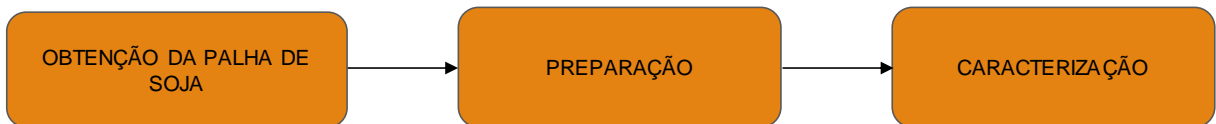
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i. Determinar as melhores condições de composição do meio de pré-tratamento (porcentagem de etanol em água), tempo e temperatura de reação, visando a máxima sacarificação enzimática da biomassa pré-tratada e tendo como condição de contorno uma temperatura máxima de 170°C.
- ii. Avaliar o efeito da adição de catalisador básico (NaOH) em meio hidroalcoólico sob condições fixas e previamente determinadas de composição do meio (porcentagem de etanol em água), tempo e temperatura de reação, visando a máxima sacarificação enzimática da biomassa pré-tratada.
- iii. Avaliar a sacarificação da biomassa pré-tratada em função da adição de ácido bórico (H_3BO_3) ao meio hidroalcoólico básico, sob condições previamente determinadas.
- iv. Avaliar o efeito dos diferentes processos na massa molar média das ligninas precipitadas a partir dos licores de pré-tratamento obtidos nas melhores condições de sacarificação, levando-se em consideração a presença e ausência de ácido bórico.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

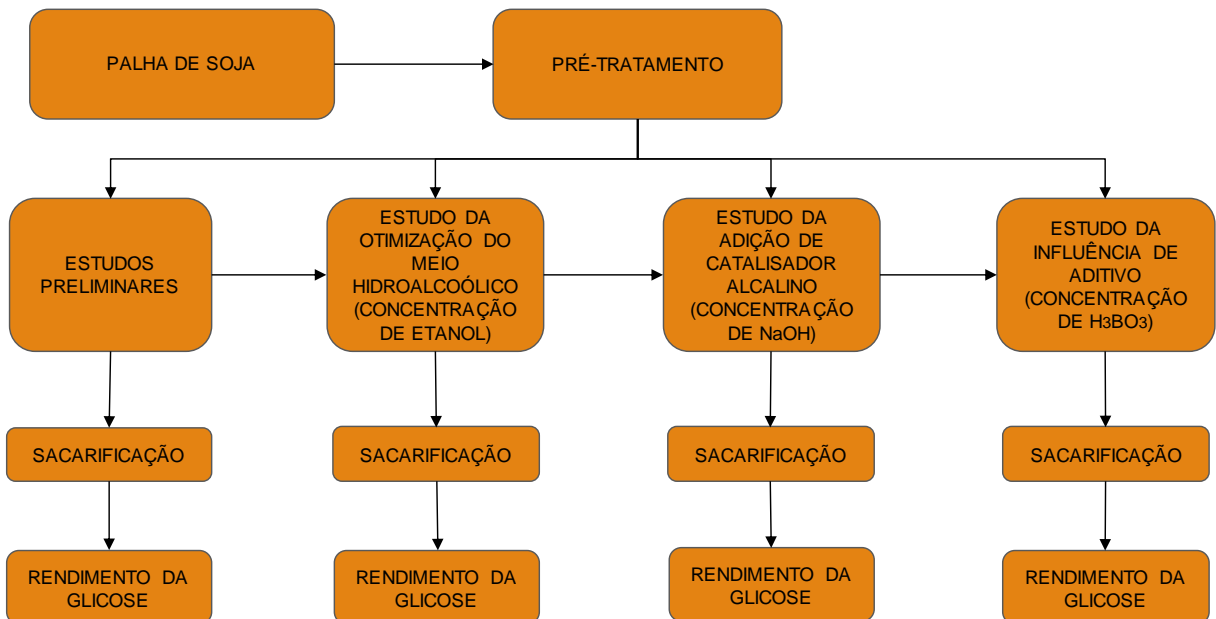
O desenvolvimento deste trabalho foi dividido em 3 etapas, sendo elas: (i) obtenção e caracterização química da palha de soja, (ii) estudos de condições do pré-tratamento organosolve e (iii) caracterização estrutural e morfológica da biomassa pré-tratada e da lignina recuperada a partir do licor de pré-tratamento. Nos fluxogramas das Figuras 15, 16 e 17 pode-se observar as etapas desenvolvidas, bem como as variáveis estudadas e técnicas utilizadas nas caracterizações.

Figura 15 - Etapas iniciais deste trabalho



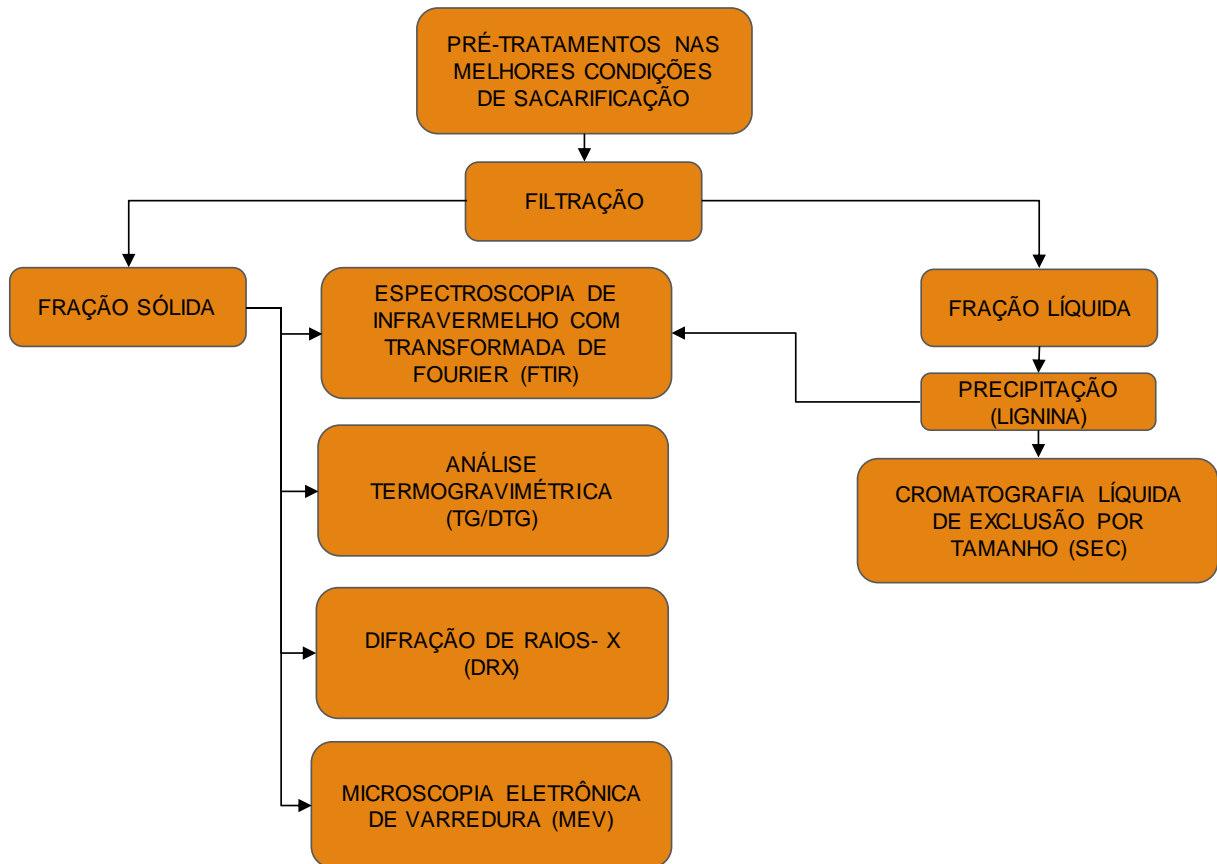
Fonte: Própria autoria.

Figura 16 – Estudo das condições do pré-tratamento organosolve



Fonte: Própria autoria.

Figura 17 – Caracterização da biomassa pré-tratada e da lignina recuperada a partir do licor de pré-tratamento



Fonte: Própria autoria.

4.1 OBTENÇÃO E PREPARO DA PALHA DE SOJA

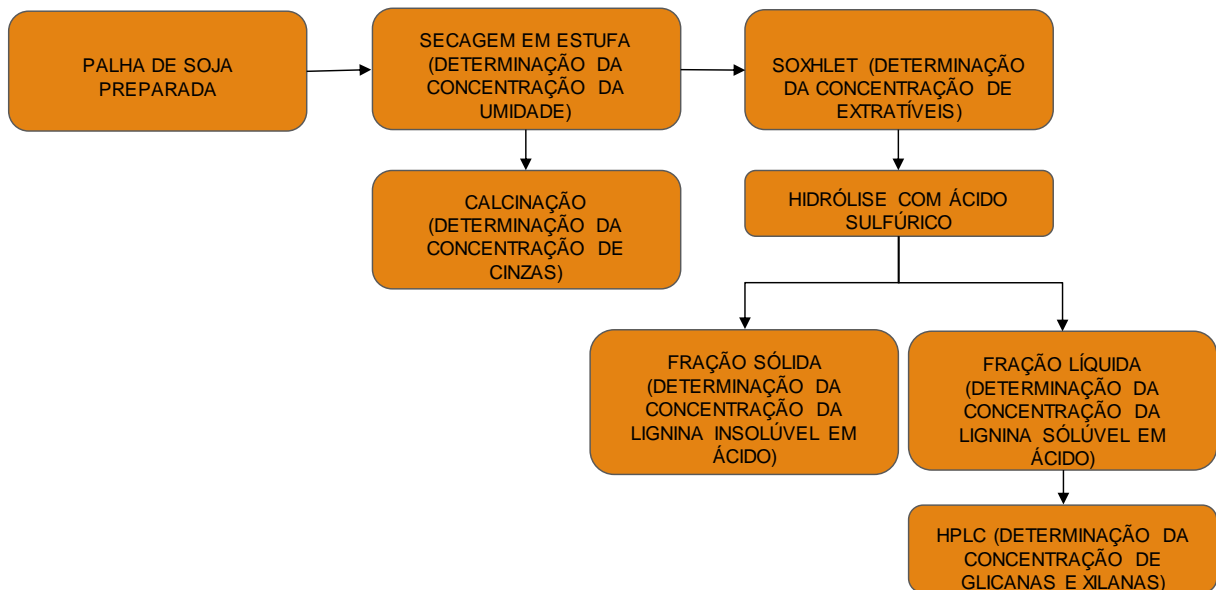
A palha de soja utilizada neste trabalho foi coletada no Campus Fernando Costa da Universidade de São Paulo (USP/FZEA), situado na cidade de Pirassununga/SP. A palha de soja (*Glycine max*) após coleta foi seca em estufa a 45°C por um período de aproximadamente 96 horas. Posteriormente, o material passou por um moinho de facas do tipo Willye, em sequência foi peneirado em um agitador eletromagnético com bandejas circulares, de onde foram selecionadas as frações do material entre 20 a 80 mesh. Por fim, a palha passou por um processo de quarteamento em porções de aproximadamente 50 g.

4.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA PALHA DE SOJA

A análise da composição da biomassa foi conduzida segundo o procedimento sequencial padronizado pelo centro de pesquisa americano NREL – National Renewable Energy

Laboratory. Os seguintes parâmetros foram caracterizados: umidade, extratíveis (água e etanol), cinzas, lignina solúvel, lignina insolúvel, glicanas e xilanas (Figura 16) (SLUITER et al., 2012). Na Figura 18 pode-se observar a sequência das análises efetuadas e nas seções subsequentes tem-se o procedimento experimental executado.

Figura 18 - Fluxograma da caracterização da palha de soja segundo a NREL



Fonte: Própria autoria.

4.2.1 Umidade e extratíveis

O procedimento iniciou-se com a extração de produtos não estruturais, utilizando-se 2,5 g da biomassa e 190 mL de água em um equipamento Soxhlet por um período de 8 horas com número ajustado de refluxos para 4 a 5 ciclos por hora. Posteriormente, houve uma nova extração com 190 mL de etanol 95% para remoção de produtos não estruturais remanescentes que não são extraíveis em água, por um período de 16 horas e com número de refluxos de 6 a 10 ciclos por hora. Em seguida a amostra foi seca por um período de 24 horas a 80 °C até massa constante. O valor de compostos extratíveis foram então determinados pela diferença entre a massa inicial do processo e a massa final, levando-se em consideração a umidade do material inicial. A umidade foi paralelamente determinada por meio de um processo de secagem da biomassa bruta (sem qualquer extração) em estufa a 105°C até massa constante (SLUITER et al., 2012; SLUITER et al., 2005).

Conhecendo-se a massa do cadinho (Mc), a massa úmida da amostra (Au), e a massa seca (As), foi possível calcular o teor de umidade na palha de soja (Tu) por meio da equação 1.

$$Tu(\%) = \frac{100\% ([Mc+Au]-[Mc+As])}{Au} \quad [1]$$

Para determinar o teor de extratíveis na palha de soja, foi utilizado a equação 2.

$$TE (\%) = \frac{[mc+mA]-[md+mF]}{mA} 100\% \quad [2]$$

Em que,

TE = porcentagem de extrativos na amostra (%);

mc = massa do cartucho (g);

mF = massa final da amostra depois de passar pelo soxhlet e estufa (g);

mA= massa da amostra inicial (g);

Para determinar extratíveis nas amostras da palha de soja foram feitas correções nos resultados obtidos da equação acima por meio da equação 3:

$$Tec = \frac{TE (100-TU)}{100} \quad [3]$$

Em que,

Tec = teor de extrativos corrigido (%);

TU = teor de umidade das amostras (%);

TE = teor de extrativos (%);

4.2.2 Determinação da lignina solúvel, lignina insolúvel, glicanas, xilanas e cinzas

Os teores de lignina solúvel e lignina insolúvel, glicanas, xilanas e cinzas foram determinados mediante a hidrólise com ácido sulfúrico 72% (m/m) do material sólido obtido após a determinação de extratíveis.

Em linhas gerais, foram pesados 300 mg da biomassa em tubo com tampa resistente à pressão, em seguida foram adicionados 3,00 mL de ácido sulfúrico a 72 % (m/m); o conteúdo do tubo foi homogeneizado e mantido em temperatura de 30 °C durante 1 hora, sob agitação com bastão de teflon a cada 5 minutos. Em seguida o conteúdo do tubo foi diluído com adição de água (84 mL de água destilada) até uma concentração de ácido sulfúrico de 4 % (m/m). O

tubo devidamente fechado foi então submetido a temperatura de 121°C em autoclave durante 1 hora com pressão de 1,1 bar. Após resfriado, o conteúdo do tubo foi filtrado em cadinho de filtração de porcelana (malha igual ou inferior a 15µm) previamente pesado e seco em mufla até massa constante, de onde foram obtidas uma fração líquida e uma fração sólida (SLUITER et al., 2012).

A determinação da lignina solúvel foi efetuada na fração líquida mediante a leitura de absorvância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 240 nm, considerando-se como absorvância da lignina solúvel o valor de 25 L/g.cm. Em uma amostra da fração líquida (após neutralização com carbonato de cálcio) foi determinada a concentração de açúcares (celobiose, glicose e xilose) por meio da técnica de cromatografia líquida (HPLC) (SLUITER et al., 2012).

Após seco em estufa até massa constante, o conteúdo sólido presente no cadinho de filtração foi calcinado em mufla a 575 °C para a determinação de cinzas, o qual após subtraído da massa do resíduo sólido total resultou no valor da lignina insolúvel.

Para determinar o teor de cinzas na amostra utilizou-se a equação 4.

$$TC\% = \frac{[mC+mAp]-mC}{mAs} 100\% \quad [4]$$

Em que,

mC = massa do cadinho (g).

mAp = massa da amostra posterior ao processo em mufla a 575 °C.

mAs = massa da amostra seca posterior ao processo da estufa a 105°C.

TC% = Teor de cinza na amostra (%).

A lignina em sua totalidade na biomassa se divide em lignina solúvel e insolúvel em ácido, sendo chamada de lignina total a somatória de ambas.

$$L_t = L_s + L_i \quad [5]$$

L_t = lignina total;

L_s = lignina solúvel em ácido;

L_i = lignina insolúvel em ácido (Lignina Klason);

A lignina insolúvel (L_i) foi determinada pela diferença da massa do conteúdo sólido após secagem em estufa (105°C) com a massa das cinzas encontrado na equação 4.

$$L_i = mS - mC \quad [6]$$

Em que,

L_i = ligninas insolúveis em ácido (Lignina Klason);

mC = massa de cinzas.

mS = massa do conteúdo sólido no cadinho após secagem (105°C).

A lignina solúvel (L_s) foi determinada pela equação 7:

$$TLs = \left[\frac{Absm \times Vf \times Diluição}{E \times Mmg \times P} \right] \quad [7]$$

Em que:

TLs = teor de lignina solúvel em ácido (m/m);

$Absm$ = Absorbância média no comprimento de onda de 240 nm;

Vf = volume do filtrado;

E = absortividade no comprimento de onda de 240 nm;

Mmg = massa da amostra no início do processo;

P = caminho ótico da cubeta utilizada;

Vsd = volume do sólido diluído;

Va = volume da amostra;

4.3 AVALIAÇÃO DOS PRINCIAIS PARÂMETROS RELACIONADOS AO PRÉ-TRATAMENTO ORGANOSOLVE - ESTUDOS PRELIMINARES

Inicialmente, foram feitos 20 experimentos de pré-tratamento Organosolve com a palha de soja submetida a diferentes condições, tendo como variáveis a concentração de solvente orgânico (etanol), temperatura e tempo de pré-tratamento. Este estudo foi conduzido segundo um planejamento de superfície de resposta do tipo composto central, tendo como resposta o rendimento da sacarificação após hidrólise enzimática dos materiais pré-tratados. A matriz experimental pode ser visualizada na Tabela 1

Tabela 1 - Matriz de experimentos utilizada nos estudos preliminares segundo metodologia de superfície de resposta

Etanol (% v/v)	Temperatura (°C)	Tempo (min)
55,00	120,00	75,00
55,00	150,00	75,00
55,00	150,00	120,00
55,00	150,00	75,00
55,00	150,00	75,00
30,00	150,00	75,00
55,00	150,00	30,00
80,00	150,00	75,00
55,00	150,00	75,00
55,00	180,00	75,00
69,87	132,16	48,24
69,87	167,84	101,76
55,00	150,00	75,00
69,87	132,16	101,76
55,00	150,00	75,00
40,13	132,16	48,24
40,13	132,16	101,76
40,13	167,84	101,76
40,13	167,84	48,24
69,87	167,84	48,24

Fonte: Própria autoria.

O rendimento em glicose foi calculado segundo a Equação 8:

$$R(\%) = \left(\frac{C_H \cdot V_H \cdot M_{BPT}}{M_{BH} \cdot M_{BB}} \right) \cdot 100\% \quad [8]$$

Em que:

R (%) = rendimento porcentual de glicose com relação à massa inicial de biomassa que entra no pré-tratamento;

C_H = concentração de glicose obtida no hidrolisado (líquido);

V_H = volume total do hidrolisado (líquido);

M_{BPT} = massa de biomassa obtida após pré-tratamento;

M_{BH} = massa de biomassa pré-tratada utilizada na hidrólise;

M_{BB} = massa de biomassa bruta utilizada no pré-tratamento;

Uma outra resposta utilizada neste trabalho em análises comparativas foi a recuperação, definida segundo a Equação 9:

$$REC (\%) = \left(\frac{R(\%)}{T_{CBB} \cdot 1,1} \right) \cdot 100\% \quad [9]$$

Em que:

REC (%) = recuperação porcentual de glicose com relação à massa inicial de glicose presente na biomassa bruta que entra no pré-tratamento;

R (%) = rendimento porcentual de glicose com relação à massa inicial de biomassa que entra no pré-tratamento (vide Equação 8);

T_{CBB} = porcentagem de glicanas presente na biomassa bruta que entra no processo de pré-tratamento;

1,1 = fator de conversão em massa de glicanas para glicose.

4.3.1 Procedimento de execução do pré-tratamento

Inicialmente, a palha de soja foi levada a estufa e seca por um período de 24 horas. Em seguida a amostra foi pesada em balança analítica dentro de um recipiente de Teflon (parte do reator) e então foi adicionado volume adequado do meio de pré-tratamento, resultando numa proporção de 1:10 (m/v). Posteriormente, o copo de Teflon foi inserido dentro de um reator de alta pressão que teve sua temperatura elevada por uma resistência em coleira cerâmica acoplada no reator e controlada por um termopar ligado a um controlador do tipo PID (COEL - modelo K48E). O tempo de estabilização da temperatura foi de 10 minutos para cada tratamento.

Ao término do tempo de pré-tratamento, o reator foi submetido ao resfriamento rápido em água a 4°C por um período de 20 minutos. Após isso, as amostras foram retiradas do copo de Teflon e filtradas em cadinho de vidro de 50 mL com placa porosa nº 4 (pesados antes do processo) com auxílio de uma bomba à vácuo; os líquidos filtrados (licor) foram armazenados a 4 °C. Após a retirada do licor, as amostras foram lavadas com 400 mL de solvente com a mesma concentração de etanol utilizada no pré-tratamento. Em seguida, o cadinho filtrante contendo a biomassa pré-tratada foi levado a estufa para secagem em 80°C por 24 horas. Após a secagem, o material foi resfriado em dessecador por período de 1 hora. Por fim, a amostra foi pesada para calcular a massa final de sólido pré-tratado.

As amostras obtidas nos pré-tratamentos foram mantidas em dessecador até a execução do procedimento posterior de hidrólise enzimática.

4.3.2 Procedimento de condução da hidrólise enzimática

Para o procedimento da hidrólise enzimática foi utilizado cerca de 1,000 g de amostra pré-tratada pesada em frasco erlenmeyer de 50 mL, ao qual foram adicionados 20,00 mL de

solução tampão de citrato sódico (0,05 mol/L e pH 4,8) na presença do coquetel enzimático comercial CellicCetec2®, resultando numa carga enzimática equivalente a 20 FPU/g de biomassa. O erlenmeyer foi então colocado em uma incubadora TE-420 (Tecnal), sendo mantido na temperatura de 50 °C e sob agitação de 180 rpm durante 72 horas.

Após a hidrólise enzimática, a amostra foi transferida para tubo falcon, o qual foi aquecido a 95°C durante 10 minutos para inativação da enzima. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas, e por fim utilizou-se o sobrenadante para as análises de glicose.

4.3.3 Determinação da concentração de glicose

A concentração de glicose foi determinada por espectrofotometria utilizando-se o kit Glicose Liquiform (Labest). Em tubo de 10 mL foi adicionado 20 µL da amostra diluída e 2,00 mL da solução reagente do kit, deixando-se reagir por 10 minutos em banho maria a 37°C. Por fim, levou-se as amostras para o espectrofotômetro que estava calibrado para leitura de absorbância em 505 nm. As quantificações foram conduzidas por meio de curva de calibração com no mínimo 7 pontos, sendo todas as medidas (padrões e amostras) realizadas em triplicata.

4.4 ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA PORCENTAGEM DE ETANOL

Em função dos resultados obtidos nos estudos preliminares, nesta etapa do trabalho optou-se por fixar a temperatura e tempo de pré-tratamento, variando-se a concentração de etanol para se avaliar o efeito deste parâmetro em condições não estudadas na metodologia de superfície de resposta. As condições utilizadas nos experimentos executados nesta etapa do trabalho são mostradas na Tabela 2.

Tabela 2 – Pré-tratamentos com variações da concentração de etanol em condições de temperatura e tempo fixos

Etanol (%)	Temperatura (°C)	Tempo (min)
40,00	170,00	50,00
30,00	170,00	50,00
20,00	170,00	50,00
10,00	170,00	50,00

Fonte: Autoria própria

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e segundo procedimentos descritos anteriormente.

4.5 ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE CATALISADOR/ADITIVO

Com o objetivo de otimizar o rendimento/recuperação de glicose, esse trabalho buscou analisar a influência de catalisador/aditivo no pré-tratamento Organosolve. As substâncias utilizadas como catalisador e aditivo foram NaOH e ácido bórico, respectivamente.

4.5.1 Porcentagem de hidróxido de sódio

Para analisar o efeito do hidróxido de sódio (NaOH) no pré-tratamento Organosolve foram fixados os fatores tempo e temperatura. A concentração de etanol também foi fixada em 20% (v/v), segundo resultados obtidos nas etapas anteriores. As condições estudadas nesta etapa do trabalho são mostradas na Tabela 3.

Tabela 3 - Pré-tratamentos com variações da concentração de base (NaOH)

Etanol (%)	Temperatura (°C)	Tempo (min)	% NaOH (m/v)
20,00	170,00	50,00	0,85
20,00	170,00	50,00	1,70
20,00	170,00	50,00	2,55
20,00	170,00	50,00	3,20
20,00	170,00	50,00	3,85

Fonte: Autoria própria

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e segundo procedimentos descritos anteriormente.

4.5.2 Porcentagem de ácido bórico

O uso de ácido bórico foi estudado como aditivo ao meio alcalino (NaOH), vislumbrando-se possíveis efeitos sinérgicos no processo de deslignificação, ou mesmo efeitos na qualidade da lignina a ser recuperada do licor ao final do processo. As condições estudadas, tendo como referência os resultados obtidos nas etapas anteriores, são mostradas na Tabela 4

Tabela 4 - Pré-tratamentos com variações da concentração de base (NaOH) e ácido (H₃BO₃)

Etanol (%)	Temperatura (°C)	Tempo (min)	NaOH/H₃BO₃ (% m/v)
20,00	170,00	50,00	3,0/1,0
20,00	170,00	50,00	3,0/2,0
20,00	170,00	50,00	3,0/3,0
20,00	170,00	50,00	4,5/1,0
20,00	170,00	50,00	4,5/2,0
20,00	170,00	50,00	4,5/3,0

Fonte: Autoria própria

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e segundo procedimentos descritos anteriormente.

4.6 OBTENÇÃO DE LIGNINA BRUTA A PARTIR DE LICORES ORGANOSOLVE

Dentre todas as condições estudadas, optou-se por precipitar a lignina a partir dos licores dos pré-tratamento onde foram obtidos os maiores rendimentos de glicose após hidrólise enzimática.

Para segregar a lignina, foram adicionados aos licores Organosolve água destilada na proporção volumétrica de 1:1 (licor:água); na sequência ajustou-se o valor do pH do meio em 2,0 por meio da adição de HCl concentrado sob forte agitação. Em seguida, os licores foram deixados em repouso durante 24 horas em refrigerador (2 a 5°C), sendo posteriormente centrifugados para remoção do sobrenadante. Ao tudo contendo o sólido, foi adicionado um volume de água destilada igual ao volume inicial de licor; os tubos foram então agitados por 10 minutos e centrifugados, removendo-se o sobrenadante. As operações de adição de água destilada, agitação e centrifugação foram realizadas 2 vezes. Posterior à última centrifugação e retirada do sobrenadante, o sólido foi ressuspensão com quantidade mínima de etanol absoluto e colocado em bequer de 500 mL, sendo mantido em estufa a 60 °C até evaporação total do solvente (massa constante). Por fim, o sólido passou por raspagem e trituração, até obtenção de um pó extremamente fino, obtendo-se desta forma a lignina bruta.

4.7 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E MORFOLÓGICA

As amostras da palha de soja não tratada e pré-tratadas nas melhores condições (3,20% de NaOH e 4,5/1,0 de NaOH/H₃BO₃ e 4,5/2,0 de NaOH/H₃BO₃) foram caracterizadas estruturalmente e morfolologicamente pelas seguintes técnicas: Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Microscopia eletrônica de Varredura (MEV), Termogravimetria (TG/DTG) e Difração de Raios-X (DRX), além disso, avaliou-se possíveis modificações estruturais nas ligninas brutas precipitadas utilizando as técnicas de FTIR e Cromatografia líquida por exclusão de tamanho (SEC).

4.7.1 Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

O objetivo do uso desta técnica é detectar as modificações químicas (grupos funcionais) ocasionadas na estrutura da biomassa antes e após o pré-tratamento. Para tal procedimento, foi utilizado um equipamento da marca Perkin Elmer (modelo Spectrum One) operado na modalidade de reflectância total atenuada (ATR-FTIR), utilizando-se a faixa de 4000 a 600 cm⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹ e acúmulo de 64 espectros (LIU et al., 2016; QING et al., 2017). Para efeito de comparações, todos os espectros foram normalizados com o auxílio do software OriginLab 2022.

4.7.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O material lignocelulósico foi analisado pela microscopia eletrônica de varredura com o propósito de se observar as modificações que ocorrem na morfologia da biomassa. O equipamento que foi utilizado para a microscopia eletrônica de varredura é da marca Hitachi (modelo TM3000), com ângulo de incidência de 38° e ampliação de 1500 vezes. Para tal análise, o material foi colocado sobre fitas de carbono sem qualquer recobrimento (CHEN et al., 2018).

4.7.3 Termogravimetria (TG/DTG)

Por meio das análises termogravimétrica, avaliou-se na biomassa as modificações estruturais ou de composição frente à degradação térmica. Para análises termogravimétricas foi utilizado o equipamento STA 449 F3 Jupiter (Netzsch). As condições de análise utilizadas foram: massa inicial de cerca de 10 mg, atmosfera de nitrogênio na vazão de 50 mL/min, faixa de temperatura de ambiente a 900 °C e taxa de aquecimento de 10°C/min. (ZHANG E WU, 2015).

4.7.4 Difração de Raios-X (DRX)

A determinação do índice de cristalinidade por difração de raios X foi realizada com objetivo de se determinar as modificações nas fases cristalina e amorfa ocorridas em função do pré-tratamento realizado. O equipamento utilizado foi o MiniFlex 600 (Rigaku International Corporation), sendo operado segundo os seguintes parâmetros: faixa de 2θ de 5° a 65° , radiação da linha Cu-K α e velocidade de varredura angular de $1^\circ/\text{s}$. O índice de cristalinidade foi calculado a partir da equação a seguir (ZHANG E WU, 2015).

$$\text{Cri} = ((I_{002} - I_{\text{am}}) / I_{002}) \times 100 \quad [10]$$

Em que:

Cri = índice de cristalinidade;

I_{002} = máximo de intensidade de difração no plano (002) por volta de $2\theta = 22,5^\circ$;

I_{am} = mínimo de intensidade de difração por volta de $2\theta = 18,60^\circ$.

4.7.5 Cromatografia líquida por exclusão de tamanho (SEC)

A determinação da massa molar e polidispersidade das ligninas brutas recuperadas a partir dos licores de pré-tratamento em condições de melhor rendimento de glicose foi feita segundo ANDRIANOVA *et al.* (2019), com pequenas modificações. Foi utilizada uma coluna PLGel (Agilent) com fase estacionária de PSDVB, dimensões de (300 x 7,5) mm, tamanho de partícula de $5\mu\text{m}$ e diâmetro de poro igual a 1000\AA . Uma pré-coluna de dimensões iguais a (30 x 7,5) mm contendo a mesma fase estacionária também foi utilizada. A fase móvel utilizada foi THF puro numa vazão de $0,8\text{ mL}/\text{min}$, sendo a coluna termostaticada na temperatura de 30°C . A detecção foi feita por meio de detector de arranjo de diodos operado na faixa de comprimento de onda de 200 a 600 nm; para efeito de cálculos, foi utilizado o cromatograma extraído em 275nm. A calibração foi feita por meio do Kit de padrões de massa molar de poliestireno Easivial (Agilent – Part number PL2010-0401). As amostras de lignina foram preparadas na concentração de $1,500\text{ mg}/\text{ml}$ em THF 95% (v/v), sonicadas por 30 minutos e posteriormente injetadas no cromatógrafo. O volume de injeção (padrões e amostra) foi de $20\ \mu\text{L}$.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA E CONFECÇÃO DE GRÁFICOS

O planejamento e análise dos dados de superfície de resposta, assim como os testes de comparações estatísticas (ANOVA e teste de Tukey) foram realizados utilizando o software Statistica 14.0.0.15 (TIBCO Software In.). Na execução de cálculos e confecção de gráficos foram utilizados os softwares Microsoft Excel e Origin 2022 (OriginLab Corporation).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA BIOMASSA

A palha de soja não tratada e livre de umidade foi caracterizada (Tabela 5) conforme a NREL (SLUITER et al., 2012). A biomassa contém 44,07% de glicose, 17,89% de xilose, 2,21% de lignina solúvel em ácido (LSA), 18,40% de lignina insolúvel em ácido (LIA), 10,83% de extrativos e 2,60% de cinzas, valores bem próximos foram relatados na literatura (CABRERA et al., 2015; MARTELLI-TOSI et al., 2017; QING et.,2017).

Tabela 5 - Composição química da palha de soja com base na biomassa seca

Glicose (%)	Xilose (%)	LSA (%)	LIA (%)	Extrativos (%)	Cinzas (%)
44,07 ± 0,95	17,89 ± 0,37	2,21 ± 0,16	18,40 ± 0,47	10,83 ± 0,25	2,60 ± 0,05

*LSA – Lignina solúvel em ácido; LIA – Lignina insolúvel em ácido

Fonte: Própria autoria.

Para caracterizar uma biomassa existem várias normas,tais como: NREL (usada para este estudo), Technical Association of Pulp and Paper Industry (TAPPI) e American Society for Testing and Materials (ASTM). Com isso, existe uma variedade de resultados na caracterização da palha de soja encontrada na literatura (Quadro 6). Para comparar a concentração de celulose e hemicelulose deste trabalho com outros descritos na literatura, a glicose (C₆) e xilose (C₅) foram multiplicadas pelo fator de conversão 0,9 (C₆) e 0,88 (C₅), respectivamente (SLUITER et al., 2012).

Quadro 6 - Comparação da caracterização da palha de soja

CELULOSE (%)	HEMICELULOSE (%)	LIGNINA (%)	CINZAS (%)	REFERÊNCIAS
25,0	11,9	17,6	-	(XU et al., 2007)
34,1	16,1	21,6	5,2	(WAN; ZHOU; LI, 2011)
35,3	16,9	21,7	10,6	(CABRERA et al., 2015)
43,6	25,5	24,1	2,6	(LIU et al., 2015)
43,6	25,5	23,2	-	(LIU et al., 2016)
42,3	16,7	21,6	0,2	(QING et., 2017)
39,8	22,6	12,8	-	(MARTELLI-TOSI et al., 2017)
44,2	5,9	19,2	-	(KIM, 2018)
39,6	15,74	20,6	2,6	Este trabalho

Fator de conversão: (C₆) * 0,9 = Teor de celulose e (C₅) * 0,88 = Teor de Hemicelulose.

Fonte: Adaptado de ROCHA, A. **Estudo do efeito da presença de espécies derivadas do ácido bórico durante pré-tratamento alcalino na sacarificação de palha de soja**. Pirassununga, SP, 2019, 108 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Materiais) – Curso de Pós graduação em Engenharia e Ciência de Materiais, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Quando avalia-se o potencial de produção de etanol de segunda geração por meio da palha de soja, pode-se notar que a concentração de holocelulose (hemicelulose + celulose) encontrada neste trabalho (55,34% da biomassa seca), representa uma resposta positiva para a produção de etanol 2G. Quando comparamos a concentração de holocelulose da palha de soja com a da palha e bagaço de cana de açúcar (Tabela 6), verifica-se que a palha de soja se apresenta como uma boa alternativa para atuar em conjunto, ou mesmo substituir o bagaço de cana de açúcar na produção de etanol 2G (ZHANG; XU; LI, 2007).

Tabela 6 - Caracterização de biomassa estudadas para a produção de etanol 2G

	Biomassa	Lignina (%)	Holocelulose (%)
Cana de açúcar	Bagaço	20,9	46,6
	Palha	20,9	65,7
Milho	Caule	20,5	64,8
	Folha	19,3	66,7
	Palha	9,3	83,3
	Sabugo	15,8	77,2
Arroz	Casca do grão	26,9	52,6
Neste trabalho	Palha de soja	20,6	55,34

Fonte: Adaptado de RAMOS E PAULA, L. E. et al. Characterization of residues from plant biomass for use in energy generation. *Cerne*, Lavras, v. 17, n. 2, p. 237–246, 2011.

Uma vez verificado o potencial da palha de soja para produção de etanol 2G, deu-se continuidade ao estudo do pré-tratamento da mesma.

5.2 ESTUDO PRELIMINAR – PRINCIPAIS VARIÁVEIS QUE AFETAM O PROCESSO ORGANOSOLVE - ANÁLISE DO PLANEJAMENTO DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

Como etapa inicial do estudo foi realizado um planejamento experimental para se analisar os efeitos da concentração de etanol, temperatura e tempo de pré-tratamento no rendimento de glicose após hidrólise da biomassa pré-tratada. Para o cálculo do rendimento de glicose (Equação 9) levou-se em consideração não só a massa de palha pré-tratada submetida à hidrólise, mas também a massa solubilizada/perdida no pré-tratamento, ou seja, a concentração de glicose obtida foi convertida para a biomassa bruta (sem pré-tratamento) por meio dos valores medidos de perda de massa no pré-tratamento. Desta forma, acredita-se que seja

possível avaliar de forma mais realista a eficiência do processo, uma vez que a informação obtida se refere à quantidade de glicose que pode ser obtida do material bruto, após tê-lo submetido a um determinado pré-tratamento e hidrólise.

Diante dos 20 experimentos da matriz de planejamento (Tabela 7), pode se concluir que os rendimentos de glicose após as amostras pré-tratadas serem submetidas à hidrólise enzimática são maiores à medida que se tem temperaturas mais elevadas (180°C), em comparação às temperaturas mais baixas (132°C). Em relação ao tempo, o rendimento aumenta com o aumento deste parâmetro, no entanto, o rendimento de glicose diminui com o aumento da concentração de etanol na solução.

Tabela 7 – Resultados de rendimento obtidos no planejamento de superfície de resposta

Experimento	Etanol (%)	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Rendimento (%)
1	55,00	120,00	75,00	10,48
2	55,00	150,00	75,00	15,27
3	55,00	150,00	120,00	18,07
4	55,00	150,00	75,00	15,64
5	55,00	150,00	75,00	15,69
6	30,00	150,00	75,00	19,08
7	55,00	150,00	30,00	11,22
8	80,00	150,00	75,00	11,14
9	55,00	150,00	75,00	14,58
10	55,00	180,00	75,00	23,90
11	69,87	132,16	48,24	9,28
12	69,87	167,84	101,76	19,44
13	55,00	150,00	75,00	14,65
14	69,87	132,16	101,76	11,75
15	55,00	150,00	75,00	15,13
16	40,13	132,16	48,24	12,53
17	40,13	132,16	101,76	15,02
18	40,13	167,84	101,76	21,30
19	40,13	167,84	48,24	19,63
20	69,87	167,84	48,24	16,25

Fonte: Própria autoria.

As respostas de rendimento obtidas experimentalmente foram analisadas segundo metodologia de superfície de resposta, sendo os efeitos dos fatores validados pela análise de variância (ANOVA), cujos resultados são apresentados no Quadro 7.

Quadro 7 – Resultados estatísticos obtidos para os coeficientes do modelo de superfície de resposta ajustado

Fator	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	Valor de F	Prob>F
% Etanol(L)	46,17	1	46,17	206,00	2,96E-05
Temperatura(L)	187,54	1	187,54	836,67	9,25E-07
Temperatura(Q)	7,83	1	7,83	34,97	0,0019
Tempo (L)	33,34	1	33,34	148,75	6,55E-05
Falta de ajuste	6,87	10	0,68	3,06	0,11
Erro puro	1,12	5	0,22		
Total	282,90	19			

Fonte: Própria autoria.

De acordo com os valores apresentados no Quadro 7, pode-se afirmar que os termos lineares de concentração de etanol, temperatura e tempo, e o termo quadrático de temperatura são significativos para o nível de confiança adotado de 95% (valores de Prob>F menores que 0,05). Além disso, o modelo não apresenta falta de ajuste (valor de Prob>F maior que 0,05), o que indica que o mesmo pode ser utilizado para se fazer previsões. A análise estatística das estimativas dos valores de coeficiente de regressão para cada fator significativo é mostrada no Quadro 8.

Quadro 8 - Resultados obtidos para a estimativa dos coeficientes de regressão para o modelo de superfície de resposta

Fator	Coefficiente	Erro padrão	Valor de t	Prob(> t)	I.C. (-95%)	I.C. (95%)
Intercepto	37,94	8,74	4,34	0,0074	15,47	60,42
% Etanol(L)	-0,12	0,0086	-14,35	2,96E-05	-0,14	-0,10
Temperatura(L)	-0,48	0,11	-4,12	0,0091	-0,78	-0,18
Temperatura(Q)	0,0022	0,0003	5,91	0,0019	0,0012	0,0032
Tempo (L)	0,058	0,0047	12,19	6,55E-05	0,046	0,070
R²	0,97					
R²ajustado	0,96					

Fonte: Própria autoria.

De acordo com a Quadro 8, os efeitos lineares da concentração de etanol e temperatura apresentam sinais negativos, ou seja, aumentos desses parâmetros implicam em uma diminuição no rendimento de glicose, enquanto aumento no tempo de pré-tratamento (coeficiente positivo) pode implicar em aumento de rendimento. Apesar de positivo, o coeficiente relacionado ao fator tempo tem o menor valor dentre os coeficientes lineares ajustados, indicando sua menor influência na resposta quando comparado aos outros

coeficientes lineares em módulo. O fator temperatura também demonstrou uma influência quadrática e positiva na resposta, o que mostra a maior complexidade deste fator frente aos fenômenos que ocorrem no processo de pré-tratamento. Se por um lado aumentos na temperatura podem implicar em maior solubilização de hemicelulose (contém glicose em sua estrutura) e eventuais degradações da celulose, diminuindo o rendimento em glicose (dependência linear negativa), por outro lado aumentos de temperatura também podem implicar em maior solubilização de lignina, que acaba concentrando a biomassa em celulose e facilita o ataque enzimático por parte de celulasas. Em linhas gerais, o modelo mostra que aumentos na temperatura e tempo, além da diminuição na porcentagem de etanol, podem implicar em aumento de rendimento. A equação 11 representa o modelo preditivo ajustado aos dados experimentais obtidos nesta etapa do trabalho.

$$R(\%) = 37,9474 - 0,1236.Et - 0,4813.Temp + 0,0022.(Temp)^2 + 0,0583.T \quad [11]$$

Em que:

R(%) = Porcentagem de rendimento de glicose

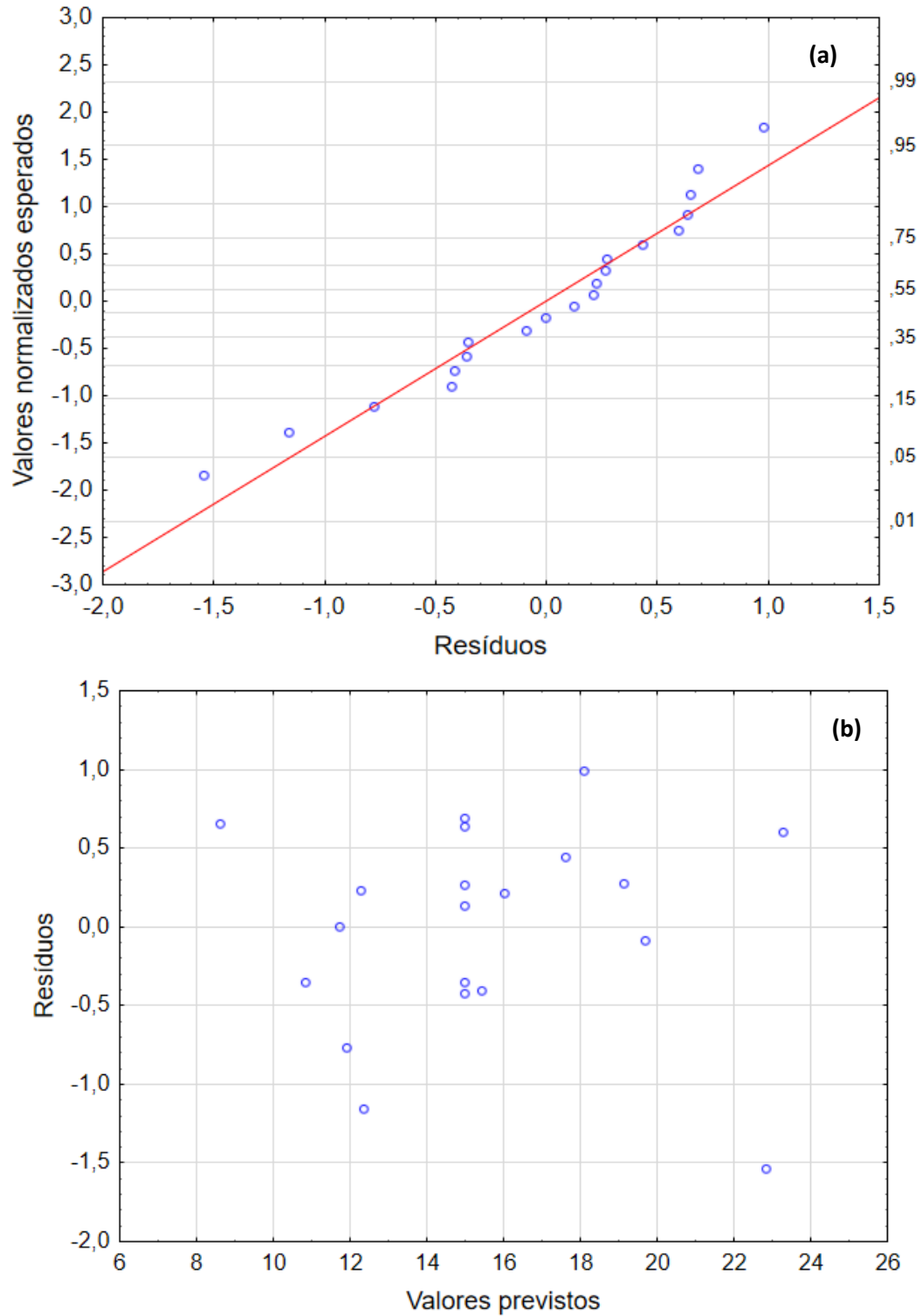
Et = Concentração de Etanol

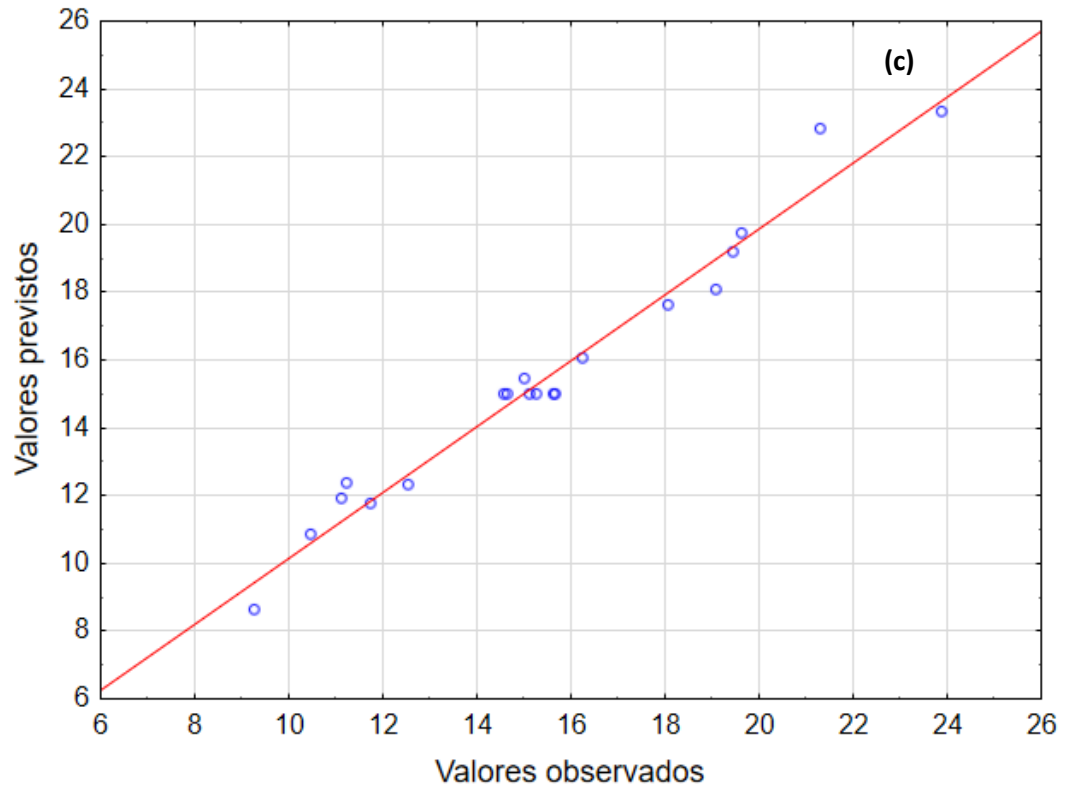
Temp = Temperatura

T = Tempo

As análises gráficas do modelo ajustado são apresentadas na Figura 19. Os valores normalizados esperados versus resíduos apresentaram um comportamento linear (Figura 19a), os resíduos versus valores previstos não são tendenciosos (Figura 19b) e os valores previstos versus valores observados tem uma tendência linear (Figura 19c). Todos esses comportamentos observados nos gráficos corroboram para o bom ajuste do modelo.

Figura 19 - Análises gráficas do planejamento de superfície de resposta - (continua)

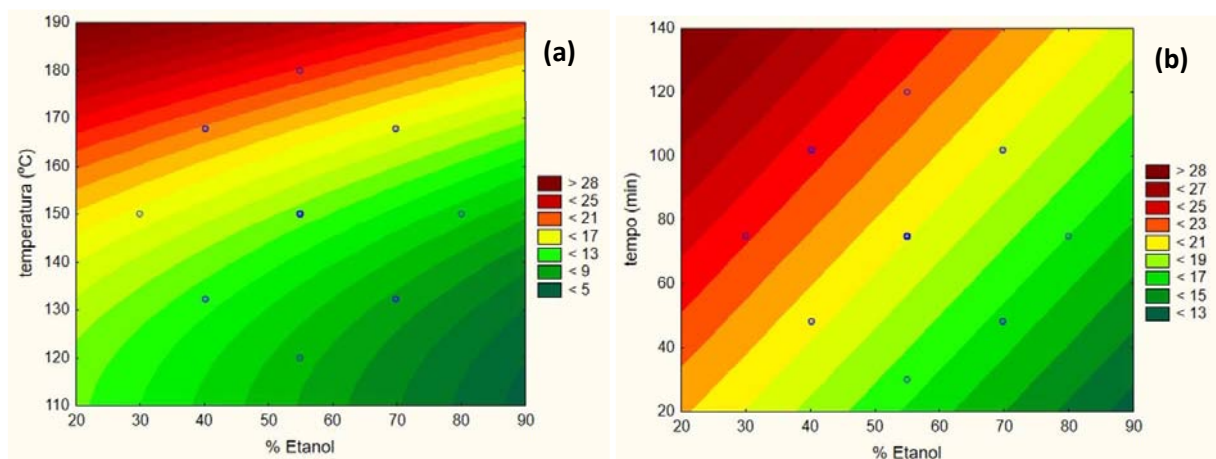




Fonte: Própria autoria.

Na Figura 20 são apresentadas as curvas de nível correspondentes às superfícies de resposta geradas pelo modelo ajustado, onde é possível observar o efeito provocado na resposta pelas três variáveis avaliadas. Verifica-se que, com a diminuição da concentração de etanol e aumento de temperatura e tempo, o rendimento de glicose tende a aumentar.

Figura 20 - Gráfico de contorno obtido para o rendimento em glicose – (a) tempo fixo em 50 minutos; (b) temperatura fixa em 170°C.



Fonte: Própria autoria.

Apesar da tendência observada, optou-se por dar continuidade ao estudo fixando-se a temperatura em 170°C e o tempo em 50 minutos. Quando analisamos os resultados experimentais obtidos (Tabela 7), pode-se perceber que os três maiores valores de rendimento foram alcançados nos experimentos 10, 18 e 19, onde as temperaturas utilizadas eram as maiores dentro do planejamento experimental. Durante o desenvolvimento dos experimentos, observou-se que em temperaturas maiores que 170°C havia degradação do vaso interno (Teflon) do reator, motivo pelo qual se fixou a temperatura na maior possível dentre as possibilidades de operação do reator utilizado. Além disso, menores temperaturas de processo (quando possível) são desejáveis, principalmente em função de gasto energético e custos relacionados à confecção e operação de reatores. No que diz respeito ao fator tempo, se compararmos os valores obtidos nos experimentos 18 e 19, podemos perceber que um aumento de cerca de 110% no tempo de reação (48 para 102 minutos) implica somente em 8,5% de aumento no valor de rendimento, o que já era esperado em função do pequeno valor de coeficiente de regressão do modelo preditivo ligado a este fator (Quadro 8).

5.3 OTIMIZAÇÃO DA PORCENTAGEM DE ETANOL E PRESENÇA DE ADITIVOS NO MEIO REACIONAL

Como anteriormente previsto (Figura 20), tem-se a tendência de aumento no rendimento quando se diminui a concentração de etanol no meio de pré-tratamento. Com objetivo de se aumentar o rendimento dentro das condições anteriormente impostas de temperatura e tempo, foram estudadas condições em que se variou a concentração de etanol em valores inferiores aqueles considerados no planejamento de superfície de resposta. Além disso, foram estudados o efeito da presença de hidróxido de sódio (NaOH) como catalisador básico e ácido bórico (H_3BO_3) como um possível agente de melhoria na deslignificação.

5.3.1 Efeito da concentração de etanol no meio reacional

Em função das tendências observadas, novos pré-tratamentos foram realizados com etanol nas concentrações de 40, 30, 20 e 10% (v/v), mantendo-se as condições fixas de temperatura (170°C) e tempo (50 minutos). Os resultados obtidos, bem como a análise estatística (ANOVA e teste de Tukey) são mostrados no Quadro 9.

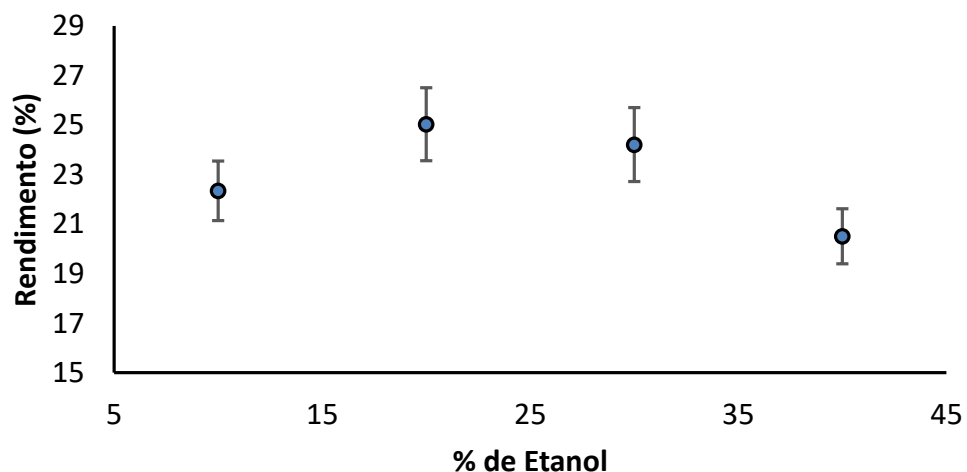
Quadro 9 - Resultados obtidos e análise estatística do efeito da porcentagem de etanol no rendimento de glicose – letras iguais no teste de Tukey significam resultados estatisticamente iguais ao nível de 95% de confiança

ANOVA						
Fonte da variação	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Média quadrática	Valor de F	Valor de P	F crítico
Entre grupos	36,73	3	12,24	8,91	0,0062	4,06
Dentro dos grupos	10,98	8	1,37			
Total	47,71	11				
Resultados do teste de Tukey						
Porcentagem de Etanol (v/v)	Média		Desvio padrão			
40	20,51 ^a		0,98			
30	24,21 ^b		1,32			
20	25,03 ^b		1,30			
10	22,34 ^{ab}		1,06			

Fonte: Própria autoria.

Do ponto de vista estatístico (Quadro 9 – Teste de Tukey), podemos considerar os resultados obtidos nas concentrações de 40 e 10% de etanol como sendo iguais, assim como os resultados obtidos nas concentrações de etanol de 30, 20 e 10%. No Gráfico 2 pode-se visualizar os valores médios de rendimento obtidos com seus respectivos intervalos de confiança ao nível de confiança de 95%.

Gráfico 2 - Valores de rendimento obtidos em função da variação da concentração de etanol – intervalos de confiança ao nível de 95%



Fonte: Própria autoria.

Apesar da análise estatística demonstrar a similaridade dos resultados nas concentrações de etanol de 10, 20 e 30%, é possível visualizar uma tendência nos valores médios, indicando um valor máximo em 20% de etanol. O valor médio nesta condição supera o maior valor obtido no estudo inicial de superfície de resposta (Tabela 7), correspondente a uma condição de temperatura de 180°C. Tal resultado mostra que maiores rendimentos podem ser obtidos em condições mais brandas de temperatura quando se manipulam outras variáveis. Do ponto de vista da robustez na condução de processo, a opção pela concentração de etanol de 20% também é vantajosa se vislumbramos que, mesmo ocorrendo variações ao redor desta concentração (na faixa de 10 a 30%), ainda teremos rendimentos satisfatórios, ou mesmo estatisticamente iguais. Uma vez selecionada a concentração de 20% de etanol, estudou-se o efeito de aditivos no meio reacional, iniciando-se pelo estudo da adição de NaOH como um possível catalisador no processo de deslignificação.

5.3.2 Estudo da presença de aditivos no pré-tratamento

5.3.2.1 Efeito da adição de hidróxido de sódio ao meio Organosolve

Nas condições anteriormente determinadas de temperatura (170°C), tempo de reação (50 minutos) e porcentagem de etanol (20% v/v), estudou-se o efeito da adição crescente da NaOH ao meio reacional. Os resultados obtidos, bem como a análise estatística comparativa dos mesmos são mostrados no Quadro 10 e Gráfico 3.

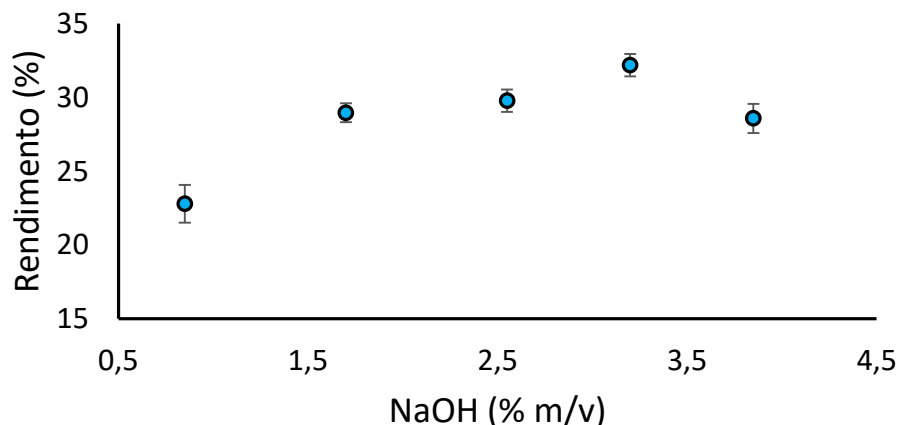
Quadro 10 - Resultados obtidos e análise estatística do efeito da adição de NaOH ao meio Organosolve – letras iguais no teste de Tukey significam resultados estatisticamente iguais ao nível de 95% de confiança

ANOVA						
Fonte da variação	Soma dos Quadrados	Grau de liberdade	Média Quadrática	Valor de F	Valor de P	F crítico
Entre grupos	144,24	4	36,06	55,24	8,79E-07	3,47
Dentro dos grupos	6,52	10	0,65			
Total	150,77	14				
Resultados do teste de Tukey						
Concentração de NaOH (% m/v)	Média		Desvio padrão			
0,85	22,79 ^a		1,13			
1,70	28,96 ^b		0,57			
2,55	29,79 ^b		0,67			
3,20	32,19 ^c		0,67			
3,85	28,58 ^b		0,88			

Fonte: Própria autoria.

Com exceção à condição em que se tem concentração de NaOH igual a 0,85% (m/v), todos os outros resultados obtidos foram superiores à condição onde não se tem adição de NaOH ao meio (Quadro 9). Tal fato pode ser explicado em função da reconhecida capacidade de pré-tratamentos em meio alcalino de solubilizarem eficientemente hemicelulose e lignina da biomassa. O rendimento em glicose está relacionado com a solubilização de lignina (aumento do rendimento) e hemicelulose (diminuição do rendimento), uma vez que a remoção de lignina enriquece a biomassa em celulose e facilita a hidrólise, enquanto a remoção de hemicelulose diminui a disponibilidade de glicose na biomassa pré-tratada (hemicelulose possui glicose em sua composição). O rendimento inferior na condição em que se tem concentração de NaOH igual a 0,85% (m/v), provavelmente se deve à maior solubilização da hemicelulose com relação à lignina, quando comparada à condição em que não se tem base presente no meio. O valor ótimo de concentração de NaOH (Gráfico 3) dentre as condições estudadas foi de 3,20% (m/v), correspondente ao rendimento de glicose de 32,2% (m/m) e equivalente à recuperação de 73,0% de toda glicana presente na biomassa bruta. O aproveitamento de glicanas da biomassa bruta (sem pré-tratamento) quando submetida à hidrólise enzimática foi de aproximadamente 40%, demonstrando um aumento de cerca de 78,4% de aproveitamento quando se submete a biomassa ao pré-tratamento proposto neste trabalho .

Gráfico 3 - Valores de rendimentos obtidos em função da porcentagem de NaOH – intervalo de confiança ao nível de 95%



Fonte: Própria autoria.

5.3.2.2 Efeito da adição de ácido bórico ao meio Organosolve alcalino

Uma vez determinada a concentração da NaOH que promoveu o maior rendimento de glicose dentre as condições testadas, optou-se por estudar o efeito da adição de ácido bórico ao

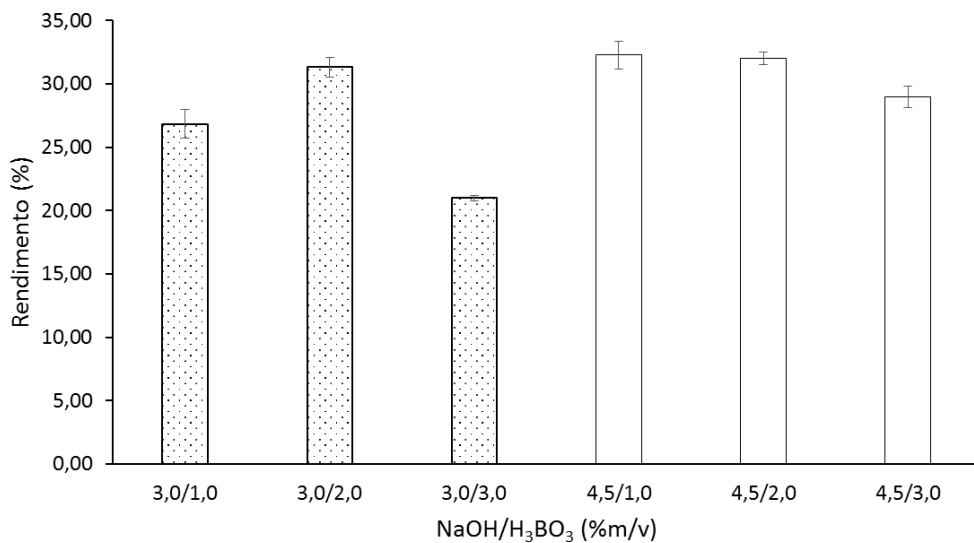
meio Organosolve alcalino, tendo-se como objetivo um aumento no rendimento e/ou possíveis efeitos na estrutura da lignina a ser recuperada do licor de pré-tratamento (vide seção 5.4). As condições testadas, assim como os resultados obtidos e suas comparações estatísticas são apresentadas no quadro 11 e Gráfico 4.

Quadro 11 – Resultados obtidos e análise estatística do efeito da adição de ácido bórico ao meio Organosolve alcalino – letras iguais no teste de Tukey significam resultados estatisticamente iguais ao nível de 95% de confiança

ANOVA						
Fonte da variação	Soma Quadrática	Grau de liberdade	Média Quadrática	Valor F	Valor P	F crítico
Entre grupos	280,69	5	56,13	97,75	2,69E-09	3,10
Dentro dos grupos	6,89	12	0,57			
Total	287,58	17				
Resultados do teste de Tukey						
NaOH/H ₃ BO ₃ (% m/v)	Média		Desvio padrão			
3,0/1,0	26,83 ^a		0,97			
3,0/2,0	31,34 ^b		0,69			
3,0/3,0	21,00 ^c		0,19			
4,5/1,0	32,27 ^b		0,95			
4,5/2,0	32,03 ^b		0,42			
4,5/3,0	28,98 ^d		0,75			

Fonte: Própria autoria.

Gráfico 4 - Valores de rendimentos de glicose em função da concentração de NaOH e H₃BO₃ - intervalos de confiança ao nível de 95%



Fonte: Própria autoria.

A análise estatística mostra que existem diferenças significativas nos pré-tratamentos testados, e que os valores de rendimento de glicose obtidos nas condições de concentração de NaOH/H₃BO₃ iguais a 3,0/2,0, 4,5/1,0 e 4,5/2,0 são os maiores obtidos e estatisticamente iguais. Não foram observados efeitos significativos no rendimento em glicose quando o pré-tratamento foi efetuado na presença de ácido bórico (32,27%) comparado ao pré-tratamento onde se obteve o melhor rendimento utilizando-se somente NaOH (32,19%). As diferenças nas ligninas precipitadas a partir dos licores de pré-tratamento contendo somente NaOH e NaOH e H₃BO₃ são abordadas na seção 5.4.

Apesar da igualdade estatística, foram considerados para a continuidade deste trabalho as condições onde a média de rendimento de glicose ficou acima de 32%, ou seja, concentrações de NaOH/H₃BO₃ iguais a 4,5/1,0 e 4,5/2,0.

5.3.3 Análise comparativa da recuperação de glicose com dados da literatura

Para efeito de comparação, na Tabela 8 são apresentados os melhores valores de rendimento de glicose obtidos neste trabalho, bem como a recuperação em relação ao máximo possível, ou seja, considerando a quantidade total de glicose (na forma de celulose) disponível na biomassa bruta que entra no processo, chamada aqui de recuperação.

Tabela 8 – Melhores valores de rendimento e recuperação de glicose após pré-tratamento e hidrólise enzimática obtidos no presente trabalho

Pré-tratamento NaOH/H₃BO₃ (% m/v)	Rendimento de glicose* (% m/m)	Recuperação de glicose** (% m/m)
3,2/0,0	32,19	73,04
4,5/1,0	32,27	73,22
4,5/2,0	32,03	72,68

* massa de glicose obtida por massa de biomassa bruta que entra no processo; **massa de glicose obtida com relação à massa de glicose presente na biomassa bruta que entra no processo.

Fonte: Própria autoria.

Os resultados obtidos se referem à quantidade de glicose recuperada na fração sólida obtida após pré-tratamento e hidrólise, ou seja, não leva em consideração os açúcares redutores totais solubilizados no licor de pré-tratamento. Dentro desta consideração, se acredita que a produção de etanol de segunda geração numa biorrefinaria baseada em palha de soja deva ser originada da fração sólida resultante do pré-tratamento, enquanto a corrente líquida deva ser utilizada para obtenção de lignina após precipitação, sendo a fração líquida ainda remanescente utilizada para obtenção de oligossacarídeos (e monossacarídeos) derivados da hemicelulose.

No Quadro 12 são apresentados valores de recuperação de glicose encontrados nos trabalhos descritos na literatura, pesquisados na base Web of Science no mês de maio de 2022.

Quadro 12 – Valores de recuperação de glicose contida na palha de soja após pré-tratamento e hidrólise enzimática descritos na literatura

Recuperação (% m/m)	Tempo de Hidrólise	Carga Enzimática	Tipo de pré-tratamento	Comentários	Referência
51,22%	36 h	50 FPU/g de biomassa	Alcalino com amônia (temp. ambiente)	24 horas de pré-tratamento; considera na recuperação os açúcares redutores totais no substrato da hidrólise enzimática	(XU et al., 2007)
70,76%	48 h	20 FPU/g de biomassa	Hidrotermal	Considera licor e sólido no cálculo da recuperação	(WAN; ZHOU; LI, 2011)
64,55%	48 h	20 FPU/g de biomassa	Alcalino NaOH	Considera licor e sólido no cálculo da recuperação; 24 horas de pré-tratamento e 40% de NaOH	(WAN; ZHOU; LI, 2011)
70,80%	72 h	Coquetel enzimático	Alcalino NaOH	Considera licor e sólido no cálculo da recuperação	(CABRERA et al., 2015)
93,90%	72 h	Coquetel enzimático	4% de ácido sulfúrico	Considera licor e sólido no cálculo da recuperação	(CABRERA et al., 2015)
86,50%	72 h	Coquetel enzimático	Alcalino NaOH	Considera licor e sólido no cálculo da recuperação; 48 horas de pré-tratamento	(CABRERA et al., 2015)
56,7%	72 h	30 FPU/g de biomassa	Alcalino NaOH	Considera licor e sólido no cálculo da recuperação; 2 horas de pré-tratamento	(QING et al., 2017)
70,3%	72 h	30 FPU/g de biomassa	1% de ácido H ₂ SO ₄	Considera licor e sólido no cálculo da recuperação; 80 minutos de pré-tratamento	(QING et al., 2017)
60,5%	72 h	50 FPU/g de biomassa	Alcalino hidrotermal	Continua baixo conteúdo de hemicelulose	(KIM, 2018)
72,7 a 73,2%	72 h	20 FPU/g de biomassa	Organosolve em meio alcalino (contendo ou	Considera somente o sólido resultado do pré-tratamento no cálculo da recuperação; tempo	Este trabalho

			não ácido bórico)	de pré-tratamento de 50 minutos	
--	--	--	----------------------	------------------------------------	--

Fonte: Adaptado de ROCHA, A. **Estudo do efeito da presença de espécies derivadas do ácido bórico durante pré-tratamento alcalino na sacarificação de palha de soja**. Pirassununga, SP, 2019, 108 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Materiais) – Curso de Pós graduação em Engenharia e Ciência de Materiais, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Com exceção aos trabalhos de KIM (2018) e XU et al. (2007), todos os outros trabalhos descritos no Quadro 12 contabilizam os açúcares solubilizados no licor de pré-tratamento para efeito de cálculo da recuperação, o que de certa forma, superestima os resultados quando se deseja efetuar comparações com os dados obtidos no presente trabalho. Os maiores valores de recuperação são relatados no trabalho de CABRERA et al. (2015), porém, além de contabilizar os açúcares solubilizados no licor, neste trabalho é relatado que a recuperação de açúcares redutores após a hidrólise enzimática da biomassa sem pré-tratamento é de cerca de 60%, o que denota a relativa alta carga enzimática utilizada quando comparada ao presente trabalho, onde a recuperação de glicose à partir da biomassa bruta foi de cerca de 40%. A maior recuperação apresentada por CABRERA et al. (2015) utilizando pré-tratamento ácido (4% H₂SO₄, 121 °C, 1 h) foi de 93,9%, porém mais de 50% dos açúcares redutores estavam presentes no licor de pré-tratamento. No que se refere ao pré-tratamento alcalino, o melhor resultado encontrado por CABRERA et al. (2015) foi de 86,50%, sendo que cerca de 85% se referem aos açúcares redutores originados da hidrólise enzimática da fração sólida obtida do pré-tratamento; apesar da alta recuperação, o tempo de pré-tratamento teve duração de 48 horas, além de utilizar alta carga enzimática na hidrólise e considerar no cálculo da recuperação os açúcares redutores totais, diferentemente do presente trabalho, que considera somente glicose. As diferenças de especificidade no cálculo de recuperação do presente trabalho com relação aos outros trabalhos apresentados se devem ao método enzimático de análise utilizado, que só detecta glicose, enquanto métodos como o do DNS (ácido dinitrosalicílico) utilizados em outros trabalhos, respondem para carboidratos redutores em geral.

Considerando os valores de recuperação de glicose da fração sólida, a duração do pré-tratamento e a carga enzimática utilizada no processo de hidrólise, pode-se afirmar que os resultados obtidos no presente trabalho são superiores aos já relatados na literatura.

5.4 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E MORFOLÓGICA DA BIOMASSA PRÉ-TRATADA

Diante das melhores condições de pré-tratamento Organosolve encontradas (Tabela 8), efetuou-se a caracterização estrutural e morfológica (vide Figura 17) das biomassas pré-

tratadas. Nas seções subsequentes são feitas análises comparativas das amostras pré-tratadas com relação à biomassa bruta para cada uma das técnicas utilizadas.

5.4.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de fourier (FTIR)

As análises realizadas por FTIR possibilitam realizar comparações com relação às eventuais alterações estruturais dos grupos funcionais promovidas pelos pré-tratamentos com relação à amostra não tratada. No Quadro 13 são apresentadas as bandas de absorção características de determinados grupos funcionais presentes em biomassa lignocelulósica de acordo com a literatura, sendo este quadro utilizado como referência para as análises comparativas.

Quadro 13 – Atribuição de bandas de absorção em espectros de FTIR de biomassa lignocelulósica

(Continua)

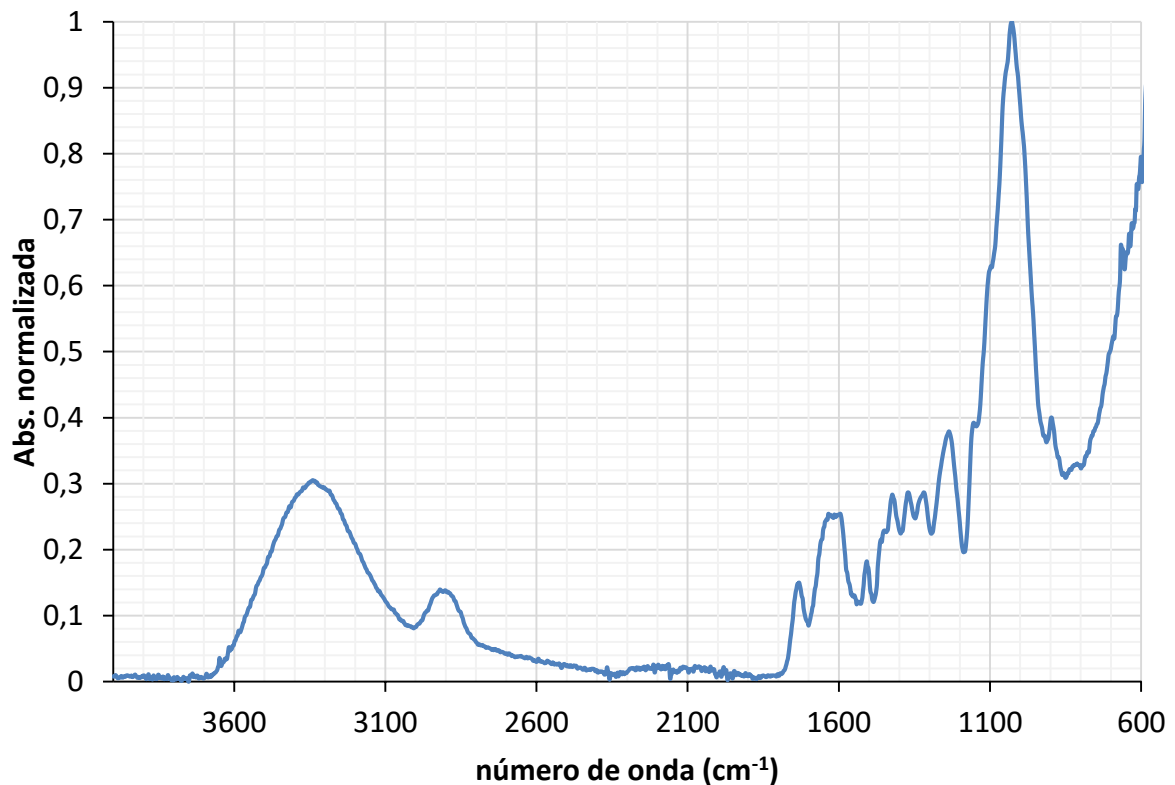
Banda (cm⁻¹)	Grupos Funcionais	Referência
3338	Vibração de alongamento OH em grupos OH aromático e alifático	LIU et al., 2016
3300, 2897	Alongamento das ligações dos grupos O-H e C-H, referente as ligações de hidrogênio e grupos metil e metileno característica da fração de celulosas	VENTURIN et al., 2018
2900	Vibração de alongamento assimétrico e simétrico dos grupos CH ₂ , picos típicos de lignina	XU et al., 2013
2924, 2855	Correspondem ao estiramento alifático assimétrico e simétrico (C-H) do grupo metila	SCAPIN et al., 2020
1741	Característica de grupos carbonila (C=O), típica de grupos acetil e éster das hemicelulosas.	LI et al.; 2018
1635	Atribuída ao alongamento de carbonila (C=O) de grupos aldeídos presentes na lignina	ZHANG; WU, 2015
1513, 1455, 1422	Confirmam uma estrutura de esqueleto aromático típico de lignina, sendo 1513 cm ⁻¹ a vibração de anel aromático, 1455 cm ⁻¹ a deformação metoxil C-H e 1422 cm ⁻¹ uma deformação CH dentro do plano	LIU et al., 2015; XU et al., 2013

1507	Estiramento dos grupos C=C de anéis aromáticos de lignina	ALDEMAR; SAIN, 2008
1428	Vibração das ligações CH ₂ , presentes na celulose e hemicelulose	LI et al., 2018
1360, 1320	Alongamentos fenólicos de O-H e do anel siringil (S)	VENTURIN et al., 2018
1314, 1235, 1100	Revelam características de estiramento no CO do anel aromático, sendo o pico a 1314 cm ⁻¹ associado a unidades de siringil (S) e 1235 cm ⁻¹ com unidade de guaiacil (G)	LIU et al., 2015; HUANG et al., 2016
1741, 1245	Estão relacionados a ligação de hemicelulose-lignina	QING et al., 2017
1268	Alongamento da ligação C-H do anel guaiacil (G)	ZHAO et al., 2016
1205, 1163	Envolvimento de grupos funcionais (O-H e C-O-C) presentes na celulose e hemicelulose	SILLS; GOSSET, 2012
1157	Indica um alongamento antissimétrico do CO de grupos éteres típicos de celulose e hemicelulose	XU et al., 2013
1050, 1031	Características de estiramento C=O devido a ligação carboidratos (celulose, hemicelulose) e lignina.	XU et al., 2013
900	Alongamento C-O e vibração em grupos C-H, encontradas na estrutura da celulose	ALDEMAR; SAIN, 2008
895	Está associado com o alongamento assimétrico do anel fora do plano da celulose amorfa ou ainda a presença de ligação β-glicosídicas entre monossacarídeos da hemicelulose	XU et al., 2013

Fonte: Própria autoria.

Na Figura 21 é apresentado o espectro de FTIR da amostra bruta, de onde pode-se notar a presença das bandas de absorção características de material lignocelulósico, conforme previsto pelo quadro 13.

Figura 21 - Espectro de FTIR da biomassa bruta (sem pré-tratamento)

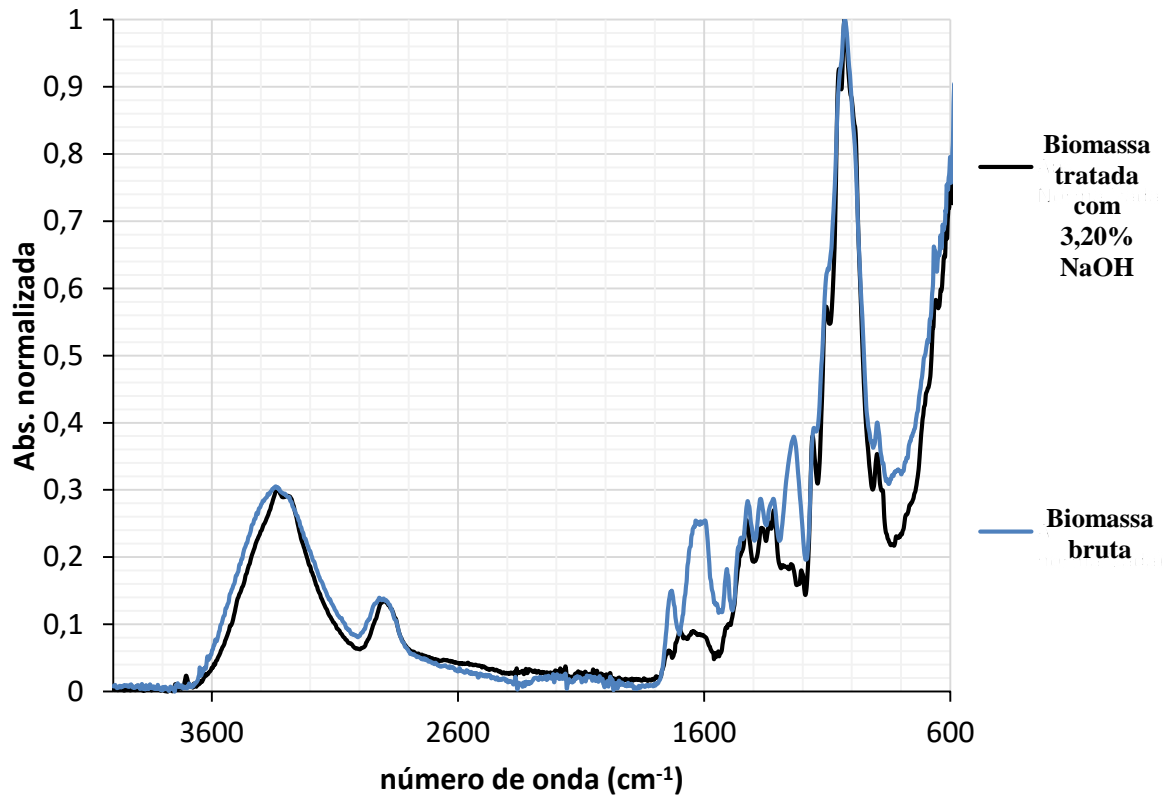


Fonte: Própria autoria.

Quando se comparam os espectros da biomassa bruta e da biomassa pré-tratada com 3,20% de NaOH (Figura 22) pode-se observar diferenças marcantes. O espectro na região entre 1800 a 1400 cm^{-1} teve diminuição acentuada de intensidade, indicando que houve modificações nas concentrações ou interações de grupos funcionais relacionados à lignina e hemicelulose. A diminuição na banda de 1740 cm^{-1} refere-se às ligações de grupos carbonila de hemicelulose; nota-se ainda uma redução expressiva na banda com máximo em 1635 cm^{-1} e na região entre 1507-1513 cm^{-1} , relacionadas com a ligação (C=O) de grupos aldeído presentes na lignina e vibração do anel aromático, respectivamente (JOHAR et al., 2012). A redução na banda com máximo em 1245 cm^{-1} , relativa a interação entre lignina e hemicelulose, corrobora para a conclusão de que houve remoção acentuada de hemicelulose e lignina na biomassa pré-tratada (ALDEMAR; SAIN, 2008). A diminuição da absorbância na região entre 900-800 cm^{-1} mostra um possível aumento de cristalinidade da celulose presente e/ou diminuição da concentração de ligações

β -glicosídicas entre monossacarídeos da hemicelulose, fenômenos estes que normalmente ocorrem de forma simultânea (QING et al., 2017).

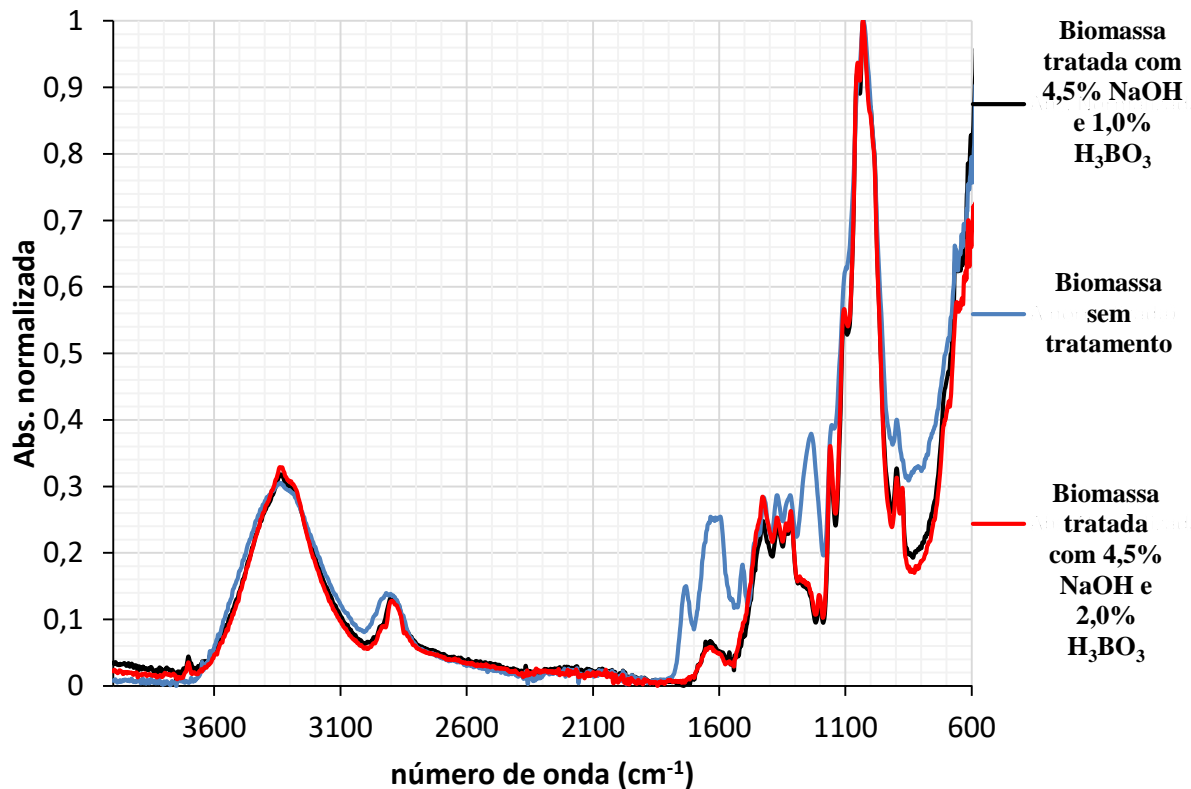
Figura 22 - Espectros de FTIR das biomassas bruta e pré-tratada com de NaOH



Fonte: Própria autoria.

Os espectros obtidos para a biomassa pré-tratada nas condições de 4,5% de NaOH/ 2,0% de H₃BO₃ e 4,5% de NaOH/1,0% de H₃BO₃ são apresentados na Figura 23.

Figura 23 - Espectros de FTIR das biomassas bruta e pré-tratadas com NaOH e H₃BO₃

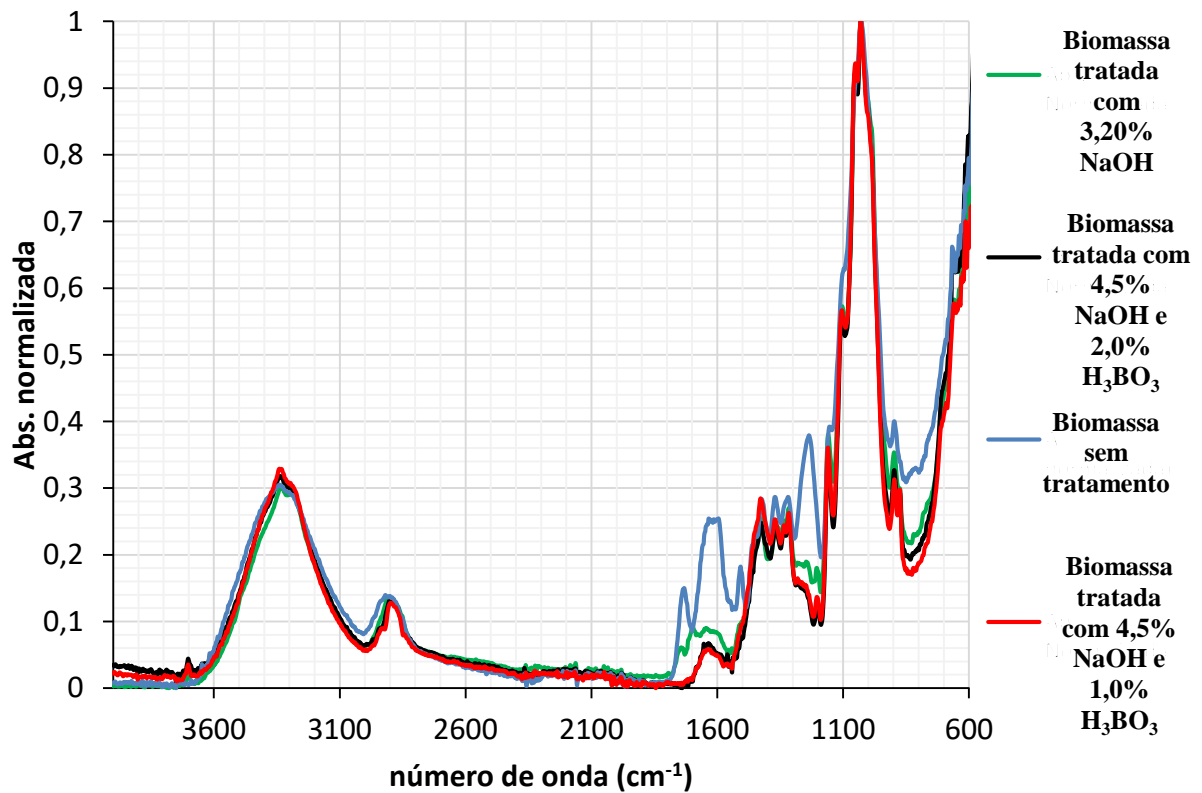


Fonte: Própria autoria.

A Figura 23 mostra que as modificações que ocorreram nos pré-tratamentos onde se utilizou a combinação de NaOH e H₃BO₃ com relação à biomassa bruta são praticamente as mesmas que ocorreram no pré-tratamento onde se utilizou somente NaOH (Figura 22). A única diferença qualitativa marcante que pode ser observada na Figura 23 é que a banda com máximo em 1741 cm⁻¹ praticamente desaparece nos pré-tratamentos onde está presente H₃BO₃, indicando que a remoção de hemicelulose deve ser mais acentuada nessa condição.

Para efeito de comparação entre todos os pré-tratamentos efetuados, na Figura 24 são apresentados os espectros obtidos em todas as condições testadas, sobrepostos ao espectro da biomassa bruta. Conforme anteriormente discutido, em todos os pré-tratamentos se observa a diminuição de bandas relativas à hemicelulose e lignina, indicando um processo de deslignificação acompanhado de remoção de hemicelulose. Quando se comparam os pré-tratamentos onde se tem NaOH/H₃BO₃ com o pré-tratamento onde se tem somente NaOH, pode-se concluir que a presença de H₃BO₃ promove uma maior remoção de hemicelulose (1740 cm⁻¹, 1245 cm⁻¹, 800-900 cm⁻¹) e lignina (1635 cm⁻¹, 1245 cm⁻¹, 1507-1513 cm⁻¹), sendo a diferença entre os dois pré-tratamentos contendo H₃BO₃ bastante sutil, e refletida somente na absorção da região entre 800-900 cm⁻¹.

Figura 24 - Espectros de FTIR das biomassas bruta e pré-tratadas com NaOH e NaOH/H₃BO₃



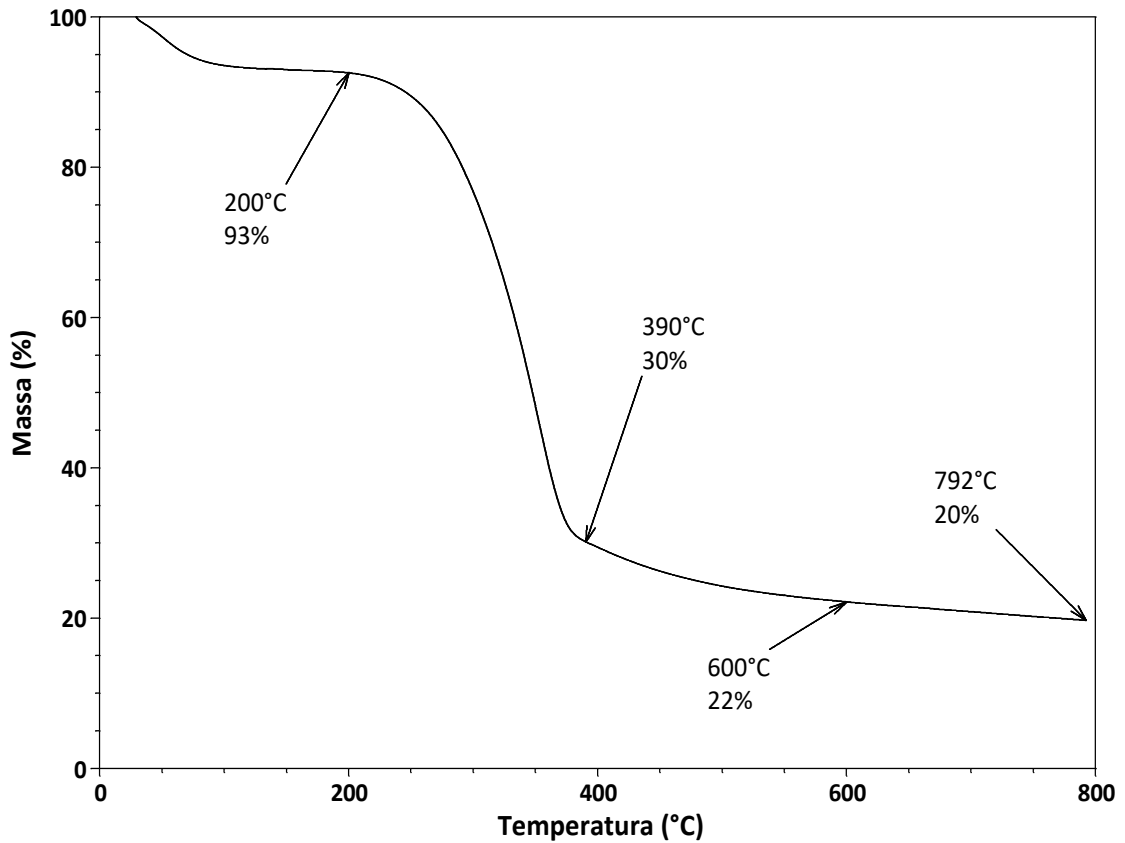
Fonte: Própria autoria.

5.4.2 Análise termogravimétrica (TG/DSC)

A degradação térmica dos componentes dos materiais lignocelulósicos ocorre em faixas distintas de temperatura, essencialmente em função de suas estruturas químicas e consequentemente de suas reatividades. Em linhas gerais, a hemicelulose se degrada na faixa de 220 a 350°C, enquanto a degradação da celulose ocorre entre temperaturas de 300 e 410°C. A lignina possui a maior faixa de temperatura de degradação, podendo se iniciar a partir de 200°C e dar prosseguimento até temperaturas tão altas quanto 550°C (PANG et al., 2014; ZHAO et al., 2017). De acordo com Pang et al. (2014), não é possível distinguir eventos individuais numa análise termogravimétrica em função da sobreposição das faixas de temperatura de degradação dos três constituintes.

No Gráfico 5 é apresentado o comportamento termogravimétrico da palha de soja sem nenhum pré-tratamento, de onde pode-se observar 4 regiões com comportamentos distintos.

Gráfico 5 - Termograma obtido para a palha de soja bruta



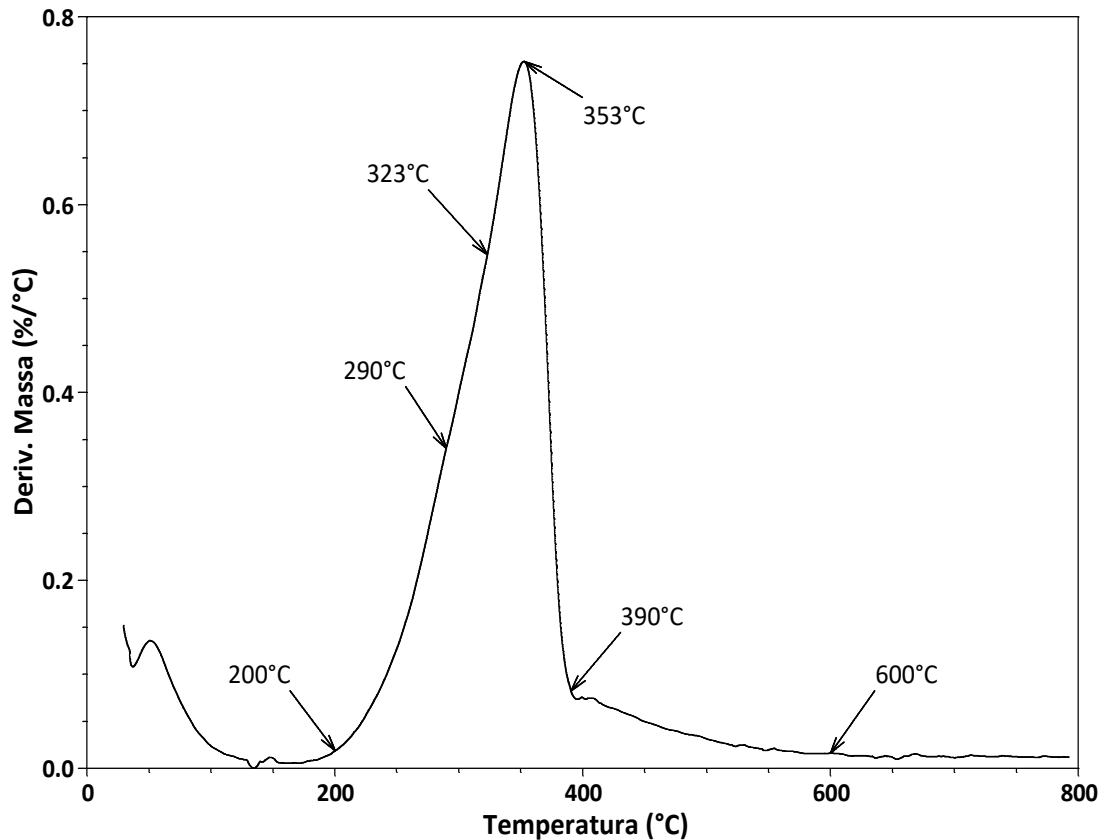
Fonte: Própria autoria.

A primeira região (até cerca de 200°C) pode ser atribuída principalmente à perda de umidade, correspondendo a cerca de 7% da massa do material. Na segunda região (200 a 390°C) observa-se uma perda de massa de cerca de 62%, que corresponde à degradação/volatilização dos 3 componentes da biomassa (hemicelulose, celulose e lignina). A terceira região (390 a 600°C) compreende a pirólise lenta de materiais menos voláteis ou sólidos formados na etapa de degradação anterior, como por exemplo, produtos de condensação da lignina. A pequena perda de massa observada na região 4 (600 a 800°C) pode ser atribuída à carbonização e possível volatilização de substâncias inorgânicas (Ex.: carbonato) (ZHAO et al., 2017).

No Gráfico 6 é apresentada a derivada do termograma (DTG) obtido para a palha de soja bruta, onde é possível observar na região entre 200 e 390°C um pico com máximo de

temperatura em 353°C e uma deformação frontal (“ombro”), com comportamento irregular nas temperaturas de 290°C e 323°.

Gráfico 6 - Análise termogravimétrica derivada da amostra não tratada

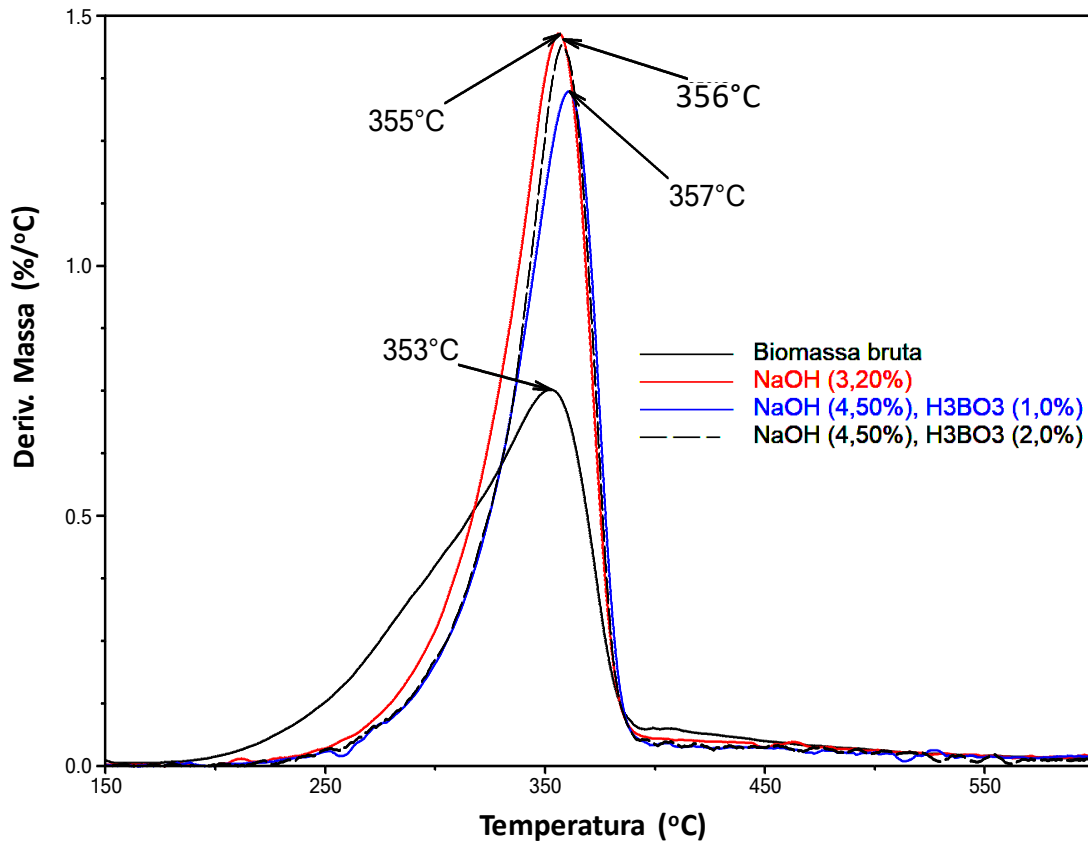


Fonte: Própria autoria.

De acordo com Pang et al. (2014), apesar de não ser possível distinguir eventos individuais para os 3 componentes principais da biomassa, as deformações no pico se devem a eventos relacionados à presença de hemicelulose (290°C) e de lignina (323°C) na biomassa. Além disso, os resultados de Pang et al. (2014) mostram que a intensidade do máximo do pico está relacionada principalmente à celulose (lignina em menor extensão), e que biomassas com maior concentração de celulose tem o máximo deslocado para maiores valores de temperatura.

Os resultados da análise termogravimétrica obtidos para as amostras pré-tratadas em meio básico na presença e ausência de ácido bórico são apresentados no Gráfico 7.

Gráfico 7 - Comparação dos perfis de DTG entre amostras tratadas e não tratada



Fonte: Própria autoria.

Quando se comparam os resultados obtidos para as amostras pré-tratadas com relação à biomassa bruta, é possível notar um grande estreitamento do pico entre 200 e 390°C, bem como o aumento de sua intensidade. Estes resultados estão diretamente relacionados à remoção de hemicelulose e lignina, e conseqüentemente ao enriquecimento das amostras pré-tratadas em celulose. O menor estreitamento observado na amostra pré-tratada somente com NaOH se deve provavelmente à menor eficiência de remoção de hemicelulose e lignina, quando comparado aos pré-tratamentos em que se tem ácido bórico presente. Desta forma, os pré-tratamentos com ácido bórico, provavelmente, removem hemicelulose e lignina mais eficientemente, promovendo uma maior concentração de celulose na biomassa pré-tratada. Tais suposições/resultados estão de acordo com os obtidos pela técnica de FTIR (vide seção 5.4.1 – Figura 24).

O fato da intensidade do pico na amostra pré-tratada somente com NaOH ser mais intenso que o pico das amostras pré-tratadas com ácido bórico pode ser explicado pela maior concentração de lignina presente na primeira, pois apesar da intensidade estar relacionada à concentração de celulose, uma pequena parcela de contribuição deve vir da lignina. Os

deslocamentos do máximo dos picos para valores maiores de temperatura comprovam uma maior concentração de celulose nas amostras pré-tratadas com ácido bórico, conforme resultados apresentados por Pang et al (2014).

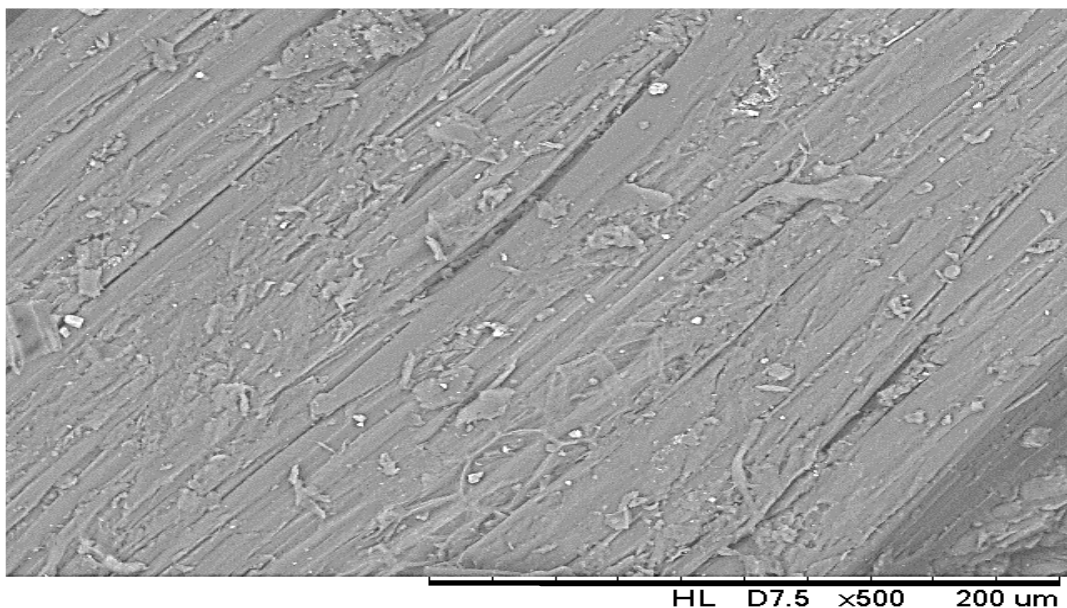
Ao comparar os dois resultados obtidos para os pré-tratamentos contendo ácido bórico, pode-se perceber que no pré-tratamento em que se utilizou-se 2,0% de ácido bórico se tem um comportamento que tende a ser mais similar ao pré-tratamento contendo somente base. Se considerarmos o ácido bórico como um ácido monoprótico, e que uma parcela da base adicionada é neutralizada por tal ácido, no pré-tratamento onde se tem concentração de NaOH de 4,50% e ácido bórico 2,0% teremos o equivalente a aproximadamente 3,20% de NaOH, que foi a concentração utilizada no pré-tratamento contendo somente base.

Apesar das amostras pré-tratadas com ácido bórico apresentarem maiores concentrações de celulose, os resultados de recuperação de glicose após hidrólise enzimática foram similares para todos os pré-tratamentos (Tabela 8). Este resultado pode estar relacionado à manutenção de uma maior quantidade de hemicelulose na amostra pré-tratada somente com NaOH, uma vez que este polissacarídeo também apresenta glicose em sua constituição e é hidrolisado pelo coquetel enzimático utilizado.

5.4.3 Análise de microscopia de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para se analisar as modificações morfológicas das fibras lignocelulósicas. Na Figura 25 é possível visualizar a morfologia da palha de soja bruta com o recobrimento da lignina sobre a fibra celulósica (XU et al., 2007).

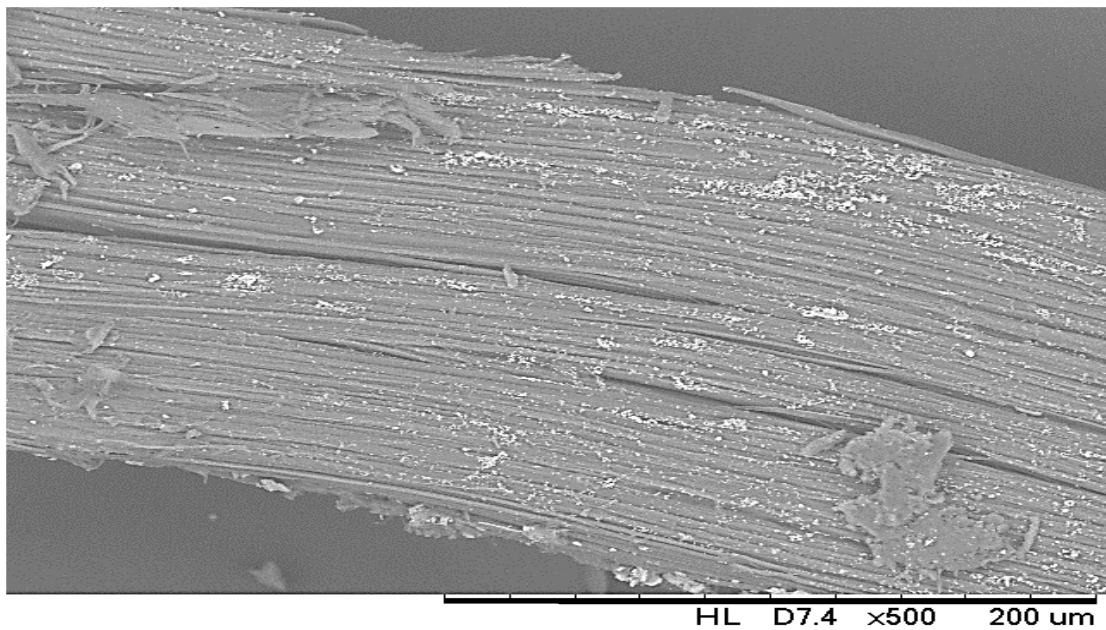
Figura 25 - Micrografia da biomassa sem pré-tratamento



Fonte: Própria autoria.

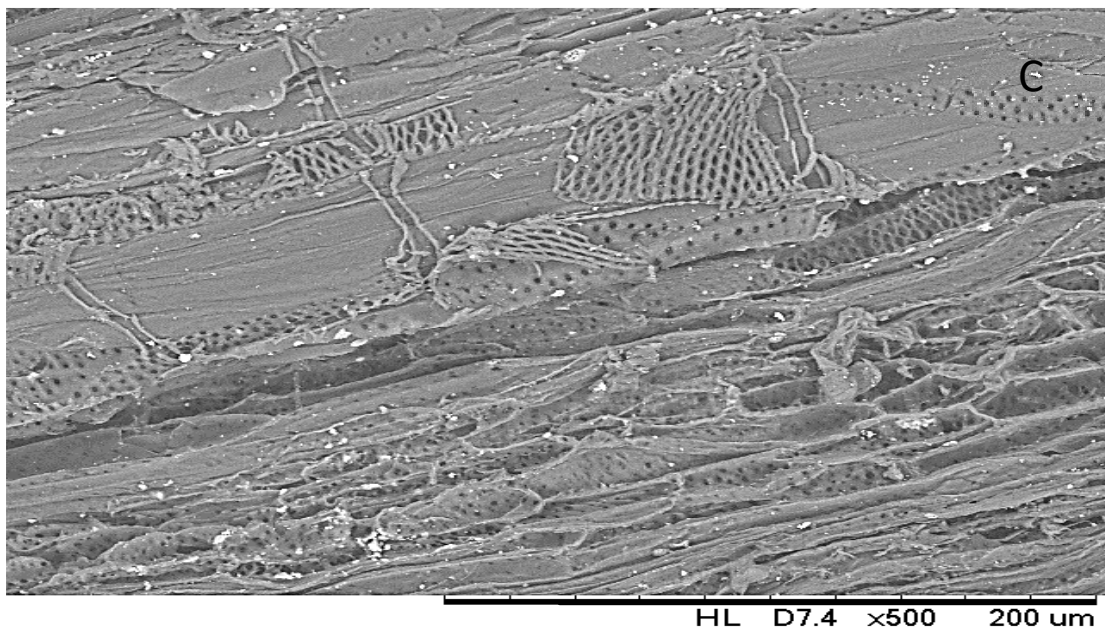
Quando analisados os efeitos do pré-tratamento na biomassa, pode-se notar que nas Figuras 26, 27 e 28 o material passa por modificações causadas pelos pré-tratamentos com NaOH e NaOH/H₃BO₃. Os pré-tratamentos fazem com que as microfibrilas de celulose fiquem mais aparentes na estrutura lignocelulósica, facilitando o acesso das enzimas para a hidrólise, o que justifica o aumento na recuperação de glicose (GAO et al., 2013; LI et al., 2016; LIU et al., 2016a).

Figura 26 - Micrografia da biomassa pré-tratada com 3,20% de NaOH



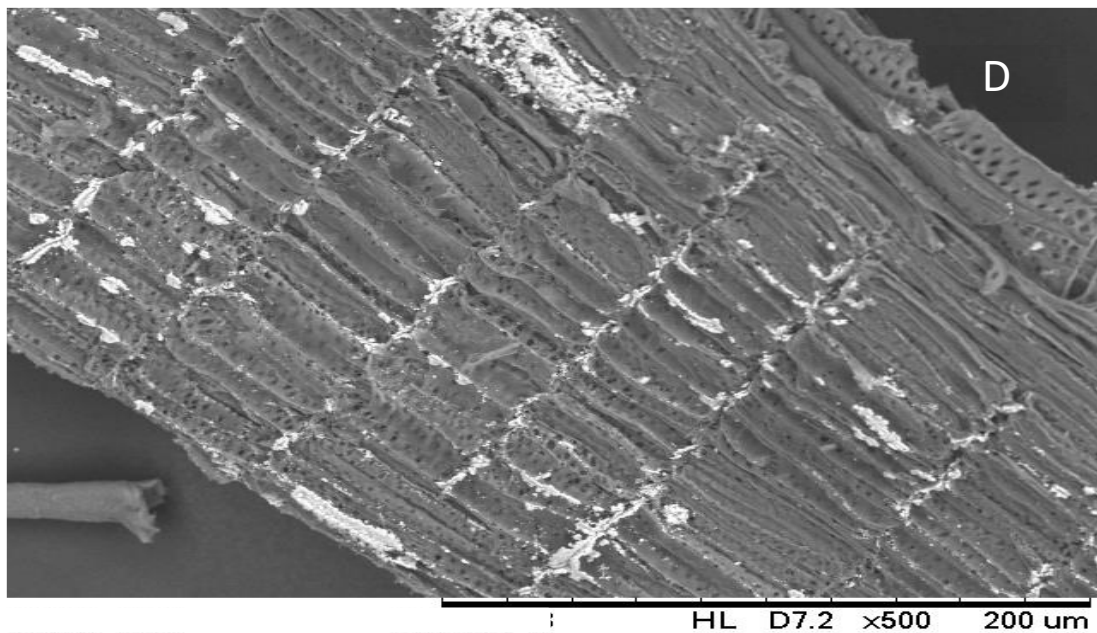
Fonte: Própria autoria.

Figura 27 - Micrografia da biomassa pré-tratada com 4,5% de NaOH e 1,0% de H₃BO₃



Fonte: Própria autoria.

Figura 28 - Micrografia da biomassa pré-tratada com 4,5% de NaOH e 2,0% de H_3BO_3



Fonte: Própria autoria.

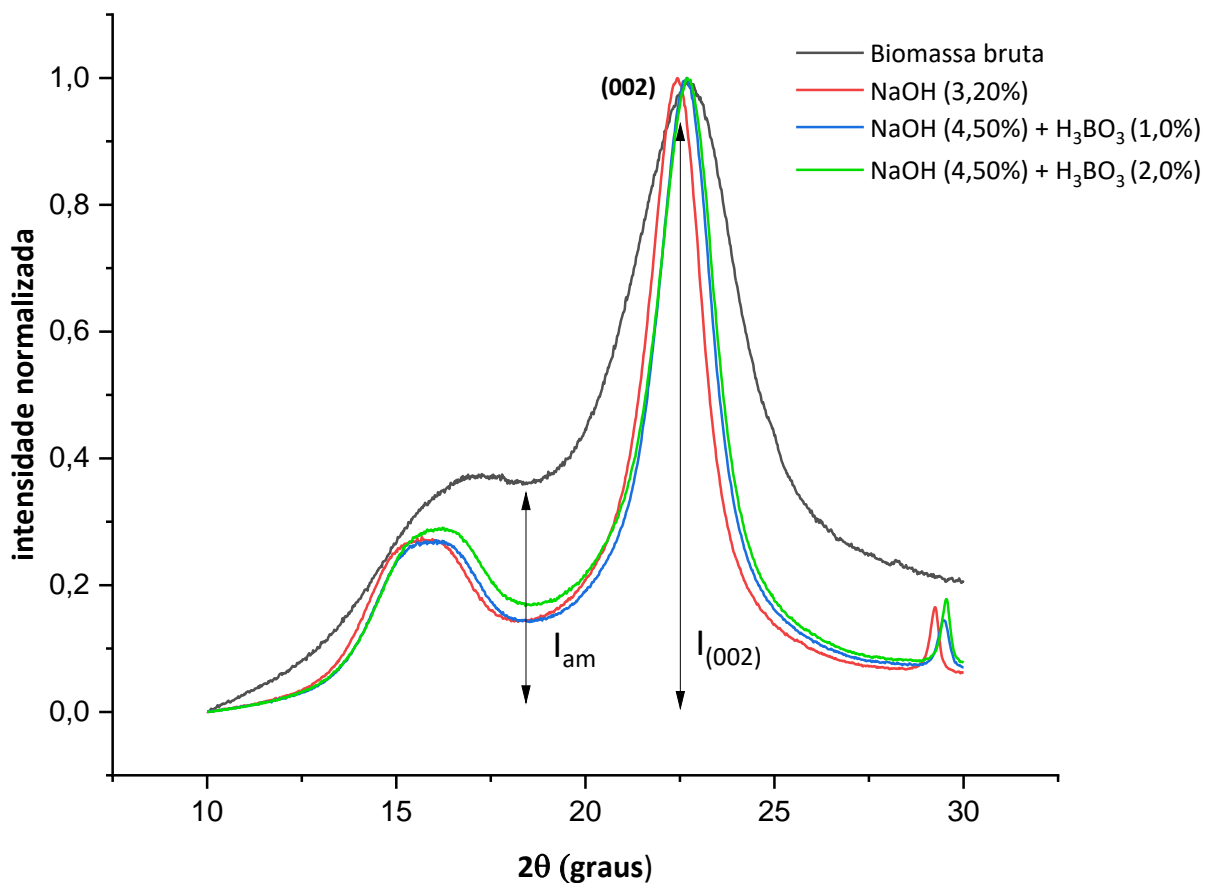
Pode-se notar que as estruturas lignocelulósicas das biomassas obtidas nas condições de pré-tratamento onde se tem H_3BO_3 presente (Figuras 27 e 28) apresentaram maiores modificações estruturais com relação ao pré-tratamento onde utilizou-se apenas NaOH (Figura 26). O surgimento de poros e rugosidades se deve ao fato da remoção da lignina e hemicelulose, uma vez que estas estão sobrepostas/interagindo com a celulose (XU et al., 2007; ZHANG; WU, 2015). Pode-se concluir que a presença de H_3BO_3 torna o pré-tratamento aparentemente mais eficiente na deslignificação e remoção de hemicelulose quando comparado ao tratamento onde tem somente NaOH, uma vez que as estruturas se mostram mais porosas e rugosas (DE ASSUMPÇÃO et al., 2016). Quando se comparam as duas condições onde se tem H_3BO_3 presente, aparentemente tem-se uma maior remoção de lignina e hemicelulose (maior desestruturação) quando se tem 1% de H_3BO_3 (Figura 27) com relação à condição onde se tem 2% de H_3BO_3 (Figura 28).

As observações e conclusões obtidas por meio de MEV se encontram de acordo com às obtidas pelas técnicas de FTIR e TG/DTG.

5.4.4 Análise de DRX

A variação da cristalinidade da biomassa em função do pré-tratamento efetuado foi estudada por meio da técnica de difração de raios-X. No Gráfico 8 são apresentados os difratogramas das amostras bruta e pré-tratadas, onde é possível visualizar difratogramas típicos de materiais lignocelulósicos, contendo máximos com 2θ entre $16-17^\circ$ e 23° (plano 002), e um mínimo correspondente à fase amorfa com 2θ por volta de 18° (REDDY; YANG, 2009; BANSAL et al., 2010; ZHANG; WU, 2015; MARTELLI-TOSI et al., 2017).

Gráfico 8 - Difratogramas de Raios X característicos das amostras bruta e pré-tratadas



Fonte: Própria autoria.

Os valores de índice de cristalinidade das biomassas, calculados a partir das intensidades relativas ao plano (002) e à fase amorfa, são apresentados na Tabela 9. Todas as amostras pré-tratadas, na presença ou ausência de H_3BO_3 , mostraram índices de cristalinidade superiores ao da biomassa bruta. Tal comportamento é condizente com o descrito na literatura, sendo correlacionado de certa forma, à remoção de hemicelulose e lignina, que são os principais componentes “amorfos” do material lignocelulósico. A remoção de hemicelulose e lignina

umenta a concentração de celulose na biomassa pré-tratada, aumentando conseqüentemente o índice de cristalinidade, uma vez que este é o único componente passível de se apresentar na forma cristalina (ZHANG; WU, 2015).

Tabela 9 - Índice de cristalinidade das amostras pré-tratadas e bruta

Pré-tratamento	Índice de Cristalinidade (%)
Biomassa bruta	(60,59 ± 0,95) ^a
3,20% NaOH	(82,86 ± 0,62) ^b
4,50% NaOH, 1,0% H₃BO₃	(83,31 ± 0,20) ^b
4,50% NaOH, 2,0% H₃BO₃	(82,94 ± 0,30) ^b

* (média ± desvio padrão, n = 3); Letras diferentes significam diferenças significativas de acordo com teste de Tukey ao nível de 95% de confiança

Fonte: Autoria própria

De acordo com a Tabela 9, os índices de cristalinidade das amostras pré-tratadas são estatisticamente iguais, independentemente da presença ou não de H₃BO₃ durante o pré-tratamento. Apesar da igualdade estatística, pode-se observar uma tendência nas médias, sugerindo que na ausência de H₃BO₃ tem-se uma menor cristalinidade (menor remoção de hemicelulose e lignina), enquanto que na presença de H₃BO₃ tem-se as maiores cristalinidades, e conseqüentemente maiores remoções de hemicelulose e lignina. Ainda quando se comparam as cristalinidades das biomassas pré-tratadas na presença de H₃BO₃, observa-se um maior valor quando se utilizou 1,0% de H₃BO₃, sugerindo que nesta concentração há maior remoção de hemicelulose e lignina com relação à concentração de 2% de H₃BO₃. Tais resultados estão de acordo com os obtidos pelas técnicas de FTIR, TG/DTG e MEV.

5.5 ANÁLISE DAS LIGNINAS RECUPERADAS DOS LICORES DE PRÉ-TRATAMENTO

As ligninas brutas precipitadas a partir dos licores de pré-tratamento, obtidos nas melhores condições de recuperação de glicose, foram preliminarmente analisadas pelas técnicas de espectroscopia de infravermelho (FTIR) e cromatografia líquida por exclusão de tamanho (SEC), visando-se avaliar, em linhas gerais, as possíveis diferenças estruturais resultantes dos diferentes pré-tratamentos.

5.5.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de fourier (FTIR)

No Quadro 14 é apresentado uma breve revisão das principais bandas de absorção de FTIR de ligninas, e na Figura 29 são apresentados os espectros sobrepostos das ligninas brutas precipitadas a partir dos licores de pré-tratamento.

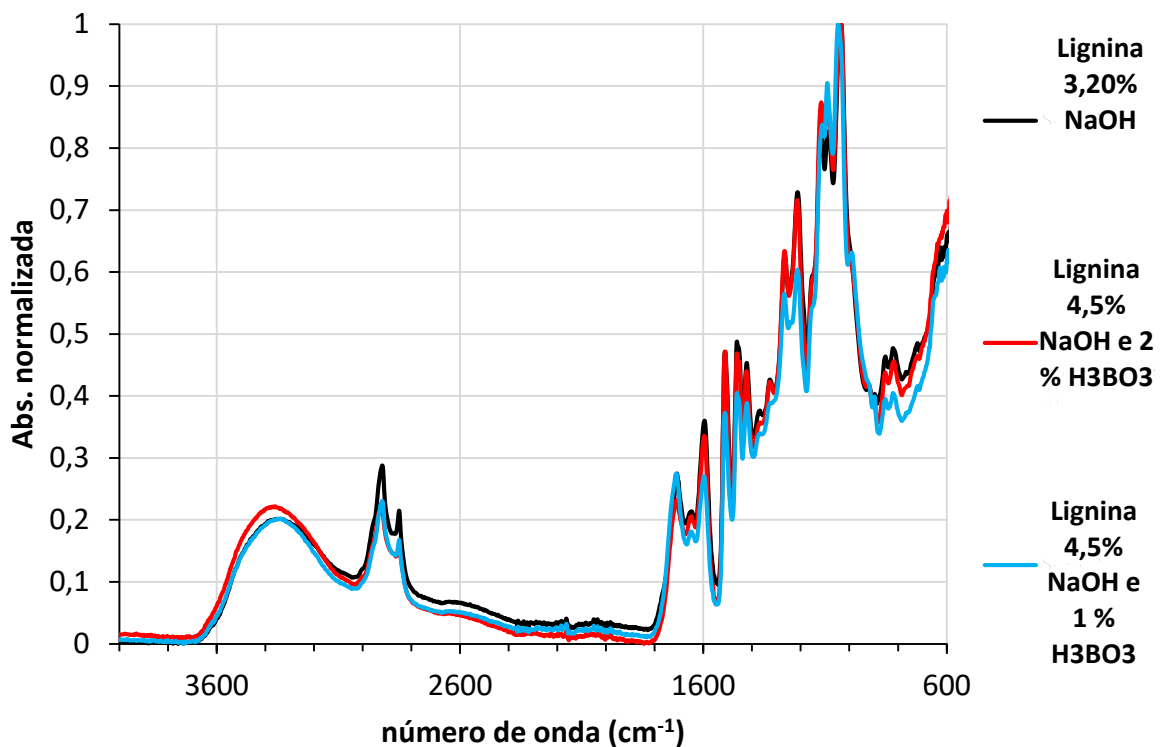
Quadro 14 – Atribuição de bandas de absorção em espectros de FTIR de lignina

Banda (cm⁻¹)	Grupos funcionais	Referências
3400	Estiramento O-H do grupo hidroxila alifática e aromática	CACHET et al., 2014
2938	Estiramento assimétrico dos grupos metil/metileno	DEHNE et al., 2016
2842	Estiramento simétrico dos grupos metil/metileno	GORDOBIL et al., 2016
1715	Estiramento C=O (não conjugado)	FAIX et al., 1992
1602	Vibração do esqueleto aromático combinado com C=O	GORDOLBIL et al., 2016
1515	Vibração C=C anel aromático	PANDEY, 1999
1456	Deformação assimétrica C-H (metil e metileno)	MCDONALD, 2014
1424	Deformação no plano C-H combinado com estiramento do anel aromático	PAWAR et al, 2016
1361	C-H cadeia alifática	TEJADO et al, 2007
1325	C-O e C-C unidades siringila (S)	PRADYAWONG et al, 2017
1270, 1212	C-O anel guaiacila (G)	CACHET et al., 2014
1151	Deformação no plano C-H (típicos de unidades guaiacila (G))	GORDOBIL et al., 2016
1111	Guiacila (G) C-H e Siringila (S) C-H	PANDEY, 1999

1032	C-O de álcool primário, guaiacyl C-H	PAWAR et al, 2016
913	Deformação fora do plano C-H, guaiacil C-H	PAWAR et al, 2016
830	Estirramento C-H fora do plano nas posições 2 e 6 de siringila e guaiacila	MCDONALD, 2014

Fonte: Própria autoria

Figura 29 – Espectros de FTIR de ligninas brutas precipitadas a partir dos licores de pré-tratamento



Fonte: Própria autoria.

Nos espectros da Figura 29 pode-se observar uma ampla banda de absorção entre 3500 e 3100 cm^{-1} (máximo em 3450 cm^{-1}) referente ao estiramento intramolecular das hidroxilas aromáticas e alifáticas (CACHET et al., 2014). As bandas em 2940, 2840, 1455 e 1361 cm^{-1} podem ser relacionadas às vibrações das ligações C-H presentes nos grupos CH_2 e CH_3 (DEHNE et al., 2016; TEJADO et al, 2007; MCDONALD, 2014), enquanto a absorção em 1715 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento das ligações (C=O) (FAIX et al., 1992). As absorções em 1425, 1515 e 1600 cm^{-1} referem-se às vibrações do anel aromático (PAWAR et

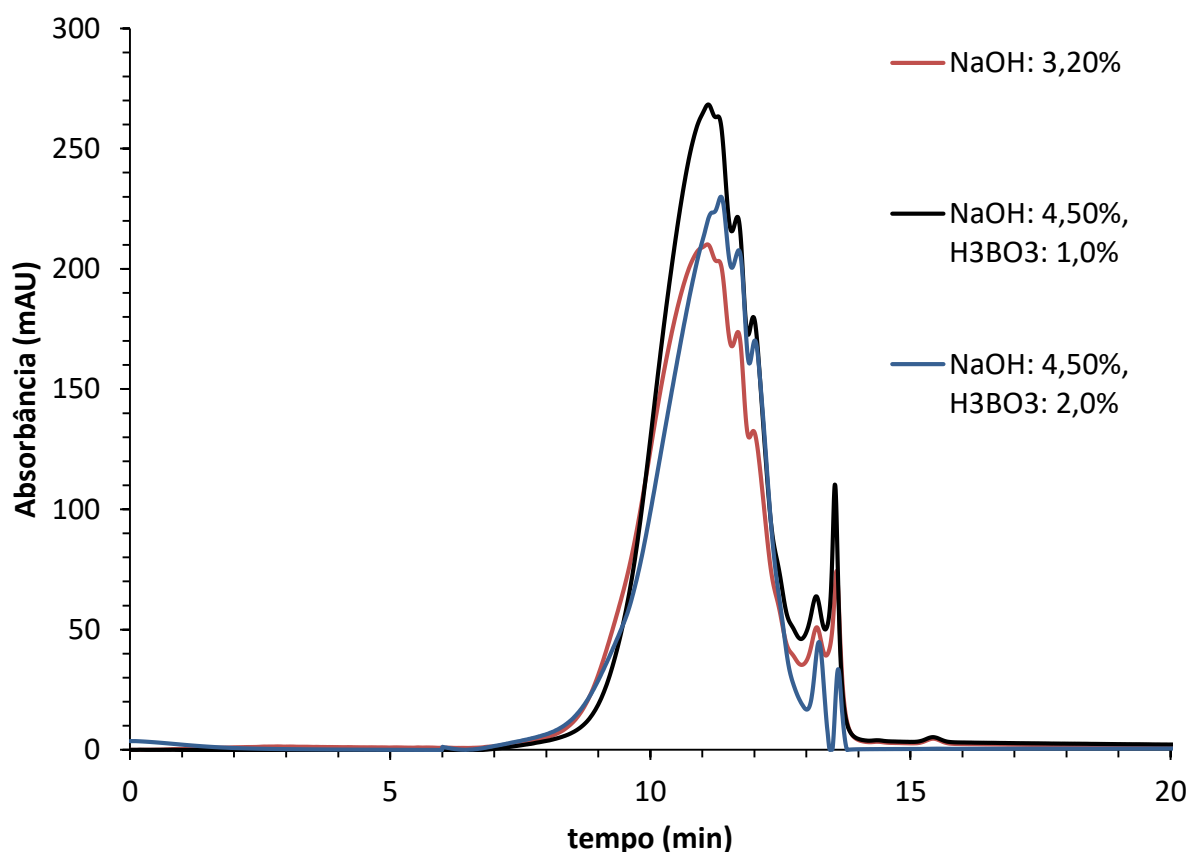
al, 2016; PANDEY, 1999; GORDOBIL et al., 2016) e a banda em 1270 cm^{-1} é resultado da deformação no plano de hidroxilas fenólicas (CACHET et al., 2014). A banda em 1215 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento das ligações C-O (PAWAR et al, 2016), enquanto a deformação das ligações C-H de aromáticos e deformação de C-O de álcool primário podem estar associadas à banda em 1031 cm^{-1} (PAWAR et al, 2016).

Apesar de terem sido feitas algumas atribuições aos espectros, não foi possível diferenciar as ligninas por meio da técnica de FTIR com Reflectância Total Atenuada (ATR). Para se investigar em detalhes as possíveis diferenças de estrutura molecular das ligninas, análises de Ressonância Nuclear Magnética (RMN) e FTIR no modo de transmissão deverão ser realizadas.

5.5.2 Cromatografia por Exclusão de Tamanho (SEC)

As diferenças na massa molar e polidispersidade das ligninas precipitadas foram determinadas por meio da técnica de cromatografia por exclusão de tamanho (SEC). Na Figura 30 são apresentados os cromatogramas sobrepostos das ligninas obtidas em cada condição de pré-tratamento.

Figura 30 –Cromatogramas de exclusão por tamanho de ligninas obtidas a partir dos licores de pré-tratamento



Fonte: Própria autoria.

De acordo com a Figura 30, pode-se observar diferenças no perfil de eluição das ligninas, o que implica em diferenças de massa molar e polidispersidade. A partir dos dados de eluição, calculou-se a massa molar numérica média e a massa molar ponderada média de cada uma das ligninas, de onde pode-se obter os valores de polidispersidade. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Valores de massas molares e polidispersidade das ligninas obtidas a partir dos licores de pré-tratamento

Pré-tratamento	M_n (g/mol)	M_w (g/mol)	PDI
3,20% NaOH	2318	10269	4,43
4,50% NaOH, 1,0% H₃BO₃	1826	5790	3,17
4,50% NaOH, 2,0% H₃BO₃	2188	8033	3,67

*M_n: Massa molar numérica média; M_w: Massa molar ponderada média; PDI: polidispersidade (PDI = M_w/M_n)

Fonte: Própria autoria.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 10, as ligninas precipitadas a partir dos pré-tratamentos contendo H₃BO₃ apresentaram menor massa molar média, bem como menor polidispersidade, indicando que a presença de H₃BO₃ interfere diretamente no mecanismo de deslignificação.

Durante o processo de deslignificação ocorre a clivagem da lignina em fragmentos de menor massa molar, porém, concomitantemente podem ocorrer reações de condensação destes fragmentos, implicando em repolimerização e aumento da massa molar da lignina solubilizada, ou mesmo redeposição na biomassa (ZHOU et al., 2018). Grupos fenólicos e 1,3 dióis constituem importantes centros reativos no processo de condensação de fragmentos de lignina (YANG et al., 2021; KOMATSU e YOKOYAMA, 2021; MU et al., 2019), e desta forma, a proteção de tais grupos reativos pode impedir/minimizar o processo de repolimerização, dando origem a ligninas de menor massa molecular (KIM e KIM, 2018).

O ácido bórico (H₃BO₃), em meio básico, tem a capacidade de formar ésteres de borato com hidroxilas fenólicas, bem como, com hidroxilas vicinais ou próximas dentro de uma cadeia, como as encontradas em 1,3 dióis (SILVA, 2021). Tal comportamento, faz com que o H₃BO₃ possa formar complexos com lignina (ROBERTS et al., 2011; HILTUNEN et al., 2016), e consequentemente atuar como um potencial agente de proteção aos grupos reativos ligados à condensação/repolimerização. Em estudos envolvendo despolimerização/hidrogenólise de lignina previamente isolada, ROBERTS et al. (2011), CHEN et al. (2018) e TOLEDANO et al. (2014) obtiveram frações de menor massa molar quando conduziram o processo na presença de H₃BO₃, comprovando o seu efeito protetor. Os resultados mostraram que as massas

moleculares dos constituintes do óleo obtido na despolimerização dependem da concentração de NaOH utilizado, bem como, da concentração de H_3BO_3 e das condições operacionais do processo.

No presente trabalho o H_3BO_3 foi utilizado diretamente no processo de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, comprovando que se pode obter ligninas de menor massa molar (eventualmente de melhor qualidade) já na etapa de obtenção das mesmas.

6 CONCLUSÕES

- i) Por meio dos estudos preliminares utilizando metodologia de superfície de resposta, pode-se concluir que o processo Organosolve aplicado à palha de soja utilizando etanol como solvente apresentará melhores recuperações de glicose após sacarificação enzimática se for conduzido em temperatura maior que 180°C e com concentração de etanol em meio aquoso inferior à 40% (v/v), além disso, aumentos no tempo de pré-tratamento (entre 30 e 120 minutos) tem pouca influência no aumento da recuperação de glicose.
- ii) Quando o pré-tratamento é conduzido em temperatura de 170°C e durante 50 minutos (limites impostos neste trabalho), tem-se um aumento de recuperação conforme se diminui a concentração de etanol no meio, chegando-se a um valor ótimo de recuperação de 56,8% da massa de glicose presente na biomassa bruta (na forma de celulose) quando o processo é conduzido com 20% (v/v) de etanol.
- iii) A adição de NaOH ao meio de pré-tratamento aumenta a recuperação de glicose, chegando-se a um valor de 73,0% quando se adiciona 3,20% (m/v) de NaOH ao meio hidroalcoólico contendo 20% (v/v) de etanol.
- iv) A presença de ácido bórico (H_3BO_3) no meio alcalino Organosolve estatisticamente não altera a recuperação de glicose, sendo que nas melhores condições testadas foram obtidos rendimentos de 73,22% (4,50% NaOH/1% H_3BO_3) e 72,68% (4,50% NaOH/2,0% H_3BO_3).
- v) Apesar de não aumentar a recuperação de glicose, a presença de H_3BO_3 no meio Organosolve alcalino promove uma maior solubilização de lignina e hemicelulose da biomassa, o que pode ser bastante interessante quando se vislumbra um processo de biorrefinaria, onde obter/aproveitar lignina e oligômeros de hemicelulose a partir do licor é fator crucial.
- vi) A presença de H_3BO_3 no meio Organosolve alcalino diminui o processo de repolimerização da lignina durante o pré-tratamento, podendo-se recuperar do licor uma lignina de menor massa molar (eventualmente de melhor qualidade), quando comparado ao processo onde utiliza-se somente NaOH.
- vii) As melhores condições de pré-tratamento obtidas neste trabalho podem ser consideradas como: 1) 20% de etanol (v/v), 3,20% de NaOH (m/v), 170°C e 50 minutos de pré-tratamento; 2) 20% de etanol (v/v), 4,50% de NaOH (m/v), 1,0% de H_3BO_3 , 170°C e 50 minutos de pré-tratamento.

- viii) O pré-tratamento Organolsolve alcalino contendo H_3BO_3 mostra-se potencialmente interessante para ser utilizado em biorrefinaria baseada em palha de soja, sendo necessários maiores estudos relativos à estrutura/qualidade da lignina recuperada, bem como da recuperação dos oligômeros/monossacarídeos de hemicelulose solubilizados no licor.
- ix) A palha de soja tem alto potencial para ser utilizada como matéria-prima em biorrefinarias de segunda geração no Brasil, uma vez que está disponível em grande quantidade, e pode ser potencialmente fracionada e integralmente aproveitada, conforme resultados mostrados no presente trabalho.

REFERÊNCIAS

- ADEKUNLE, K. F.; OKOLIE, J. A. A Review of Biochemical Process of Anaerobic Digestion. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, v.6, p. 205-212, 2015.
- AHMAD I, SHARMA AK, DANIELL H, KUMAR S. Alteração da composição lipídica e aumento da produção lipídica em microalga verde pela introdução de brassica diacilglicerol aciltransferase 2. *Plant Biotechnol J*. v. 19, p. 540 – 550. 2015
- ALALWAN, H. A.; ALMINSHID, A. H.; ALJAAFARI, H. A. S. Evolução promissora das gerações de biocombustíveis. Revisão do assunto. *Foco em Energias Renováveis*, [s.l.], v. 28, p 127-139, 2019.
- ALEMDAR, A.; SAIN, M. Isolation and characterization of nanofibers from agricultural residue – wheat straw and soy hulls. *Bioresource Technology*, Holanda, v. 99, p. 1664- 1671, 2008.
- ALMEIDA, F. **Espectroscopia de infravermelho próximo com transformada de fourier (ft-nir) na caracterização de farinhas para alimentação pueril**. 2009. 73 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biológica) - Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2009.
- ALVIM, J.C. et al. Biorrefinarias: conceitos, classificação, matérias-primas e produtos. *Journal of bioenergy and food science*, v. 1, n. 3, p. 61-77, out/dez, 2014.
- AMIRI, H.; KARIMI, K.; ZILOUEI, H.; Organosolv pretreatment of rice straw for efficient acetone, butanol, and ethanol roduction. *Bioresour. Technol.* v. 152, p. 450–456, 2014.
- ANDRIANOVA, A.A. ET AL., “Size exclusion chromatography of lignin: the mechanistic aspects and elimination of undesired secondary interactions”. *Journal of chromatography*, 1534, pp.101-110, 2018.
- ARANTES, V.; JELLISON, J.; GOODELL, B. Peculiarities of brown-rot fungi and biochemical Fenton reaction with regard to their potential as a model for bioprocessing biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Heidelberg, v. 94, n. 2, p. 323–338, 2012.
- ASADI, N.; ZILOUEI, H. Optimization of organosolv pretreatment of rice straw for enhanced biohydrogen production using *Enterobacter aerogenes*. *Bioresource Technology*, Barking, v. 227, p. 335-344, 2017.
- ASSUMPCÃO, S. M. N. et al. Pre-treatment combined H₂SO₄ /H₂O₂ /NaOH to obtain the lignocellulosic fractions of sugarcane bagasse. *Revista Virtual de Química*, Niterói, v. 8, n. 3, p. 803–822, 2016.
- BANSAL, P. et al. Multivariate statistical analysis of X-ray data from cellulose: a new method to determine degree of crystallinity and predict hydrolysis rates. *Bioresource Technology*, Barking, v. 101, n. 12, p. 4461–4471, 2010.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento experimental e otimização de experimentos**. 2. ed. Campinas: Editora Unicamp, 1996. 299 p.

BARUAH, J.; NATH B. K.; SHARMA R.; KUMAR S.; DEKA R. C.; BARUAH D. C.; KALITA, E. Recent trends in the pretreatment of lignocellulosic biomass for value-added products. **Frontiers in Energy Research**, Lausanne, v. 6, art. 141, 2018.

BACOVSKY, D. et al. Status of advanced biofuels demonstration facilities in 2012: a report to IEA bioenergy task. **IEA Bioenergy Task**, v. 39, 2013.

BHARGAVI, G.; NAGESWARA, R. A. O. P.; RENGANATHAN, S. Review on the extraction methods of crude oil from all generation biofuels in last few decades. *In: IOP CONFERENCE SERIESES: MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING*, 2018. Hyderabad. **Proceedings** [...]. Hyderabad, 2018. res. 012024, v. 330, p, 12-24.

BERNARDINELLI, O. D. et al. Quantitative ¹³C MultiCP solid-state NMR as a tool for evaluation of cellulose crystallinity index measured directly inside sugarcane biomass. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2015.

BRODEUR, G.; YAU, E.; BADAL, K.; COLLIER, J.; RAMACHANDRAN, K. B.; RAMAKRISHNAN, S. Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: a review. **Enzyme Research**, London, v. 2011, p. 1-17, 2011.

BROSSE, N.; EL HAGE, R.; SANNIGRAHI, P.; RAGAUSKAS, A.; Dilute sulphuric acid and ethanol organosol pretreatment of *Miscanthus giganteus*. **Cellul. Chem. Technol.** v.44 (1), p. 71, 2010.

CABRERA, E. et al. Comparison of industrially viable pretreatments to enhance soybean straw biodegradability. **Bioresource Technology**, Barking, v. 194, p. 1–6, 2015.

CACHET, N. et al. Esterification of organosolv lignin under supercritical conditions. **Industrial Crops and Products**, [S. l.], v. 58, p. 287–297, 2014.

CARDONA, C. A.; QUINTERO, J. A.; PAZ, I. C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives. **Bioresource Technology**, Barking, v. 101, p. 4754-4766, 2010.

CARVAJAL, J. C.; GÓMEZ, A.; CARDONA, C. A. Comparison of lignin extraction processes: Economic and environmental assessment. **Bioresource Technology**, v. 214, p. 468–476, 2016.

CARVALHO, F. C. Disponibilidade de resíduos agroindustriais e do beneficiamento de produtos agrícolas. *In: SIMPÓSIO DE UTILIZAÇÃO DE SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS E RESÍDUOS DE COLHEITA NA ALIMENTAÇÃO DE RUMINANTES*, 1992, São Carlos. **Anais** [...]. São Carlos: EMBRAPA, 1992. p. 7-27.

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

CHEN, C.; JIN, D.; OUYANG, X.; ZHAO, L.; QIU, X.; WANG, F. Effect of structural characteristics on the depolymerization of lignin into phenolic monomers. **Fuel**, Oxford, v. 223, p. 366–372, 2018.

CHEN, H.; LIU, L.; Unpolluted fractionation of wheat straw by steam explosion and ethanol extraction. **Bioresour. Technol.** v. 98 (3), p. 666–676, 2007.

CHIN, D. W. K. et al. Fundamental review of organosolv pretreatment and its challenges in emerging consolidated bioprocessing. **Biofuels Bioproducts & Biorefining – BIOFPR.** v.14, n. 4, p.808-829, 2020.

COHEN, J. et al. Critical analysis of emerging forest biorefinery (FBR) technologies for ethanol production. **Pulp & Paper**, Canada, v. 111, n. 3, p. 24-30, 2010.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Avaliação da safra agrícola de soja**. Brasília, 2019. Disponível em: www.conab.gov.br. Acesso em: 21 jan. 2019.

CONAB, **Safra Brasileira de Cana-de-Açúcar**, Acompanhamento da safra brasileira, palha de soja, 19/08/21. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safra/cana>>Acesso em: 03 de jan. 2019.

CORREA, D. F.; BEYER, H. L.; FARGIONE, J. E. Rumo à implementação de sistemas sustentáveis de produção de biocombustíveis. **Energia Sustentável Renovável**, [s.l.], v. 107, p. 250-263, 2019.

DEHNE, L. et al. Influence of lignin source and esterification on properties of ligninpolyethylene blends. **Industrial Crops and Products**, [S. l.], v. 86, p. 320–328, 2016.

DENG X; CAI J; LI Y; FEI X. A expressão e o knockdown do gene PEPC1 afetam o fluxo de carbono na biossíntese de triacilgliceróis pela alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*. **Biotechnol Lett**; v. 36, p. 11, 2014.

DE WILD, P.; HUIJGEN, W.; HEERES, H.; Pyrolysis of wheat straw-derived organosolv lignin. **J. Anal. Appl. Pyrol.** V. 93, p. 95–103, 2012.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Embrapa soja, soja em números (safra 2021/2022)**. 2017. Disponível em: <https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>. Acesso em: 12 fevereiro. 2022.

ESPIRITO SANTO, M. et al. Structural and compositional changes in sugarcane bagasse subjected to hydrothermal and organosolv pretreatments and their impacts on enzymatic hydrolysis. **Industrial Crops and Products**, v. 113, n. October 2017, p. 64–74, 2018.

FAIX, O. **Methods in Lignin Chemistry**. Berlin-Heidellberg: Springer-Verlag, 1992.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1984. 613 p.

FERREIRA, J.A.; TAHERZADEH, M.J. Improving the economy of lignocellulose-based biorefineries with organosolv pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 299, 2020.

GAO, J. et al. Ionic liquid pretreatment to enhance the anaerobic digestion of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 150, p. 352–358, 2013.

GENG, A.; XIN, F.; IP, J.-Y.; Ethanol production from horticultural waste treated by a modified organosolv method. **Bioresour. Technol.** v. 104, p. 715–721, 2012.

GORDOBIL, O. et al. Assesment of technical lignins for uses in biofuels and biomaterials: Structure-related properties, proximate analysis and chemical modification. **Industrial Crops and Products**, [S. l.], v. 83, n. January 2016, p. 155–165, 2016.

HALDERA, P.; KUNDU, S.; PATELA, S.; SETIAWANB, A.; ATKINC, R.; PARTHASARTHYA, R.; PAZ-FERREIROA, J.; SURAPANENID, A.; SHAHA, K.; Progress on the pre-treatment of lignocellulosic biomass employing ionic liquids, **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 105, p. 268-292, 2019.

HIGUCHI, N.; SANTOS, J.; JARDIM, F. C. S. Tamanho de parcela amostral para inventários florestais. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 12, p. 91-103, 1982.

HOLTZAPPLE, M.T.; HUMPHREY, A.E.; The effect of organosolv pretreatment on the enzymatic hydrolysis of poplar. **Biotechnol. Bioeng.** v. 26 (7), p. 670–676. Table 5, 1984.

HUANG, X. et al. Pyrolysis kinetics of soybean straw using thermogravimetric analysis. **Fuel**, v. 169, p. 93–98, 2016.

JAWAID, M.; TAHIR, P. M.; SABA, N. Introduction to biomass and its composites, Thermo Fisher Scientific, Lignocellulosic Fibre and Biomass-Based Composite Materials Processing, Properties and Applications, **Woodhead Publishing Series in Composites Science and Engineering**, p. 1-11. 2017.

JOHAR, N.; AHMAD, I.; DUFRESNE, A. Extraction preparation ad characterization of cellulose fibers and nanocrystals from rice husk. **Industrial Crops and Products**, Holanda, v. 37, p. 93-99, 2012.

JOHN, M. J.; THOMAS, S. Biofibers and biocomposites. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 71, p. 343-364, 2008.

KALITA, E.; NATH, B. K.; AGAN, F.; MORE, V.; DEB, P. Isolation and characterization of crystalline, autofluorescent, celulose nanocrystals from saw dust wastes. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 65, p. 550-555, 2015.

KHODAYARI, A.; THIELEMANS, W.; HIRN U.; VAN VUURE, A.; SEVENO, D.; Cellulose-hemicellulose interactions - A nanoscale view, **Carbohydrate Polymers**, v. 270, 2021.

KHOO, K. S.; CHEW, K. W.; YEW, G. Y. Recent advances in downstream processing of microalgae lipid recovery for biofuel. **Bioresource Technology**, Barking, v. 304, p. 122-196, 2020.

KIM, K.H.; KIM, C.S. Recent Efforts to Prevent Undesirable Reactions From Fractionation to Depolymerization of Lignin: Toward Maximizing the Value From Lignin. **Frontiers in Energy Research**, v. 6, 92, 2018.

KIM, M.; DAY, D. F. Composition of sugar cane, energy cane, and sweet sorghum suitable for ethanol production at Louisiana sugar mills. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 38, p. 803-807, 2011.

KIM, S. Evaluation of alkali-pretreated soybean straw for lignocellulosic bioethanol production. **International Journal of Polymer Science**, London, v. 2018, n. 5241748, p. 1–7, 2018.

KIM, Y.; MOSIER, N. S.; LADISCH, M. R. Enzymatic digestion of liquid hot water pretreated hybrid poplar. **Biotechnology Progress**, New York, v. 25, p. 340-348, 2009.

KLEINERT, T. N. Organosolv pulping with aqueous alcohol. **Tappi Journal**, Atlanta, v. 57, p. 99-102, 1974.

KLEMM, D. et al. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie: International Edition**, v. 44, n. 22, p. 3358-3393, 2005.

KOMATSU, T; YOKOYAMA, T. Revisiting the condensation reaction of lignin in alkaline pulping with quantitative part I: the simplest condensation between vanillyl alcohol and creosol under soda cooking conditions. **Journal of Wood Science**, 67:45, 2021.

KONDO, T. The relationship between intramolecular hydrogen bonds and certain physical properties of regioselectively substituted cellulose derivatives. **Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics**, v. 35, p. 717, 1997.

KOO, B.; KIM, H.; PARK, N.; LEE, S.; YEO, H.; CHOI, I; Organosolv pretreatment of *Liriodendron tulipifera* and simultaneous saccharification and fermentation for bioethanol production. **Biomass Bioenergy**, v. 35 (5), p. 1833–1840, 2011.

KOO, B.; MIN, B.; GWAK, K.-S.; LEE, S.; CHOI, J.; YEO, H.; CHOI, I.; Structural changes in lignin during organosolv pretreatment of *Liriodendron tulipifera* and the effect on enzymatic hydrolysis. **Biomass Bioenergy**, v. 42, p. 24–32, 2012.

LEE, J. M.; SHI, J.; VENDITTI, R. A.; JAMEEL, H. Autohydrolysis pretreatment of coastal bermuda grass for increased enzyme hydrolysis. **Bioresource Technology**, Barking, v. 100, p. 6434-6441, 2009.

LI, M.; SUN, S.; XU, F.; SUN, R.; Ultrasound-enhanced extraction of lignin from bamboo (*Neosinocalamus affinis*): characterization of the ethanol-soluble fractions. **Ultrason. Sonochem.** v. 19 (2), p. 243–249, 2013b.

LI, M.; TU, M.; CAO, D.; BASS, P.; ADHUKARI, S.; Distinct roles of residual xylan and lignin in limiting enzymatic hydrolysis of organosolv pretreated loblolly pine and sweetgum. **J. Agr. Food Chem.** v. 61 (3), p. 646–654, 2013a.

LI, P.; SAKURAGI, K.; MAKINO, H. Técnicas de extração na produção sustentável de biocombustíveis: uma revisão concisa. **Tecnologia de Processo de Combustível**, [s.l.], v. 193, p. 295-303, 2019

- LI, X.; WEI, Y.; XU, J.; XU, N.; HE, Y. Quantitative visualization of lignocellulose components in transverse sections of moso bamboo based on FTIR macro- and micro-spectroscopy coupled with chemometrics. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 11, n. 1, art. 263, 2018.
- LI, X.; SUN, C.; ZHOU, B.; HE, Y. Determination of hemicellulose, cellulose and lignina in moso bamboo by near infrared spectroscopy. **Scientific Reports**, London, v. 5, p. 17210, 2015.
- LIAO, J.; LAFIT N.; TRACHE D.; BROSSE, N.; HUSSIN, M.; Current advancement on the isolation, characterization and application of lignin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 162, p. 985-1024, 2020.
- LIU, Q. et al. A two-stage pretreatment process using dilute hydrochloric acid followed by Fenton oxidation to improve sugar recovery from corn stover. **Bioresource Technology**, v. 211, p. 435–442, 2016a.
- LU, P.; HSIEH, Y. L. Preparation and characterization of cellulose nanocrystals from rice straw. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 87, p. 567-573, 2012.
- LIU, Z. et al. The utilization of soybean straw III: Isolation and characterization of lignin from soybean straw. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 94, p. 12–20, 2016b.
- LIU, Z. et al. The utilization of soybean straw. II. Dissolution & regeneration of soybean straw in LiCl/DMSO. **BioResources**, v. 10, n. 2, p. 2305–2317, 2015.
- MA HA; DC APPERLEY; BW EVANS; IM HUXHAM; WG JARDINE; RJ VIËTOR, et al. Estrutura fina em microfibrilas de celulose: evidência de RMN de cebola e marmelo. **Plant J**, v. 16, p. 183 – 190, 1998.
- MA, H. H.; ZHANG, B. X.; ZHANG, P.; LI, S.; GAO, Y. F.; HU, X. M. Efficient process for lignina extraction and enzymatic hydrolysis of corn stalk by pyrrolidonium ionic liquids. **Fuel Processing Technology**, Amsterdam, v. 148, p. 138-145, 2018.
- MARTELLI-TOSI, M. et al. Chemical treatment and characterization of soybean straw and soybean protein isolate/straw composite films. **Carbohydrate Polymers**, London, v. 157, p. 512–520, 2017.
- MARTIN, L. C. T. **Confinamento de bovinos de corte: modernas técnicas**. 2. ed. São Paulo: Livraria Nobel, 1987. 124 p.
- MCDONOUGH, T.J. The chemistry of organosolv delignification. **Tappi Journal**, Atlanta, v. 76, n. 8 , p. 186-193, 1993
- MEI, Q.; SHEN, X.; LIU, H.; HAN, B., Selectively transform lignin into value-added chemicals, **Chinese Chem. Lett.** v. 30, p. 15–24, 2019.
- MESA, L.; GONZÁLEZ, E.; RUIZ, E.; ROMERO, I.; CARA, C.; FFELISSA, F.; CASTRO, E.; Preliminary evaluation of organosolv pre-treatment of sugar cane bagasse for glucose production: application of 2 3 experimental design. **Appl. Energy**, v. 87 (1), p. 109–114, 2010.

MORAIS, S. A. L. **Contribuição ao estudo químico de Ligninas de Eucalyptus grandis**. Belo Horizonte, 1987. 175 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1987.

MORAIS, S. A. L. **Contribuição ao estudo químico e espectroscópico da lignina de madeira moída do Eucalyptus grandis: isolamento, quantificação e análise estrutural**. Belo Horizonte, 1992. 260 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1992.

MONRROY, M.; IBAÑEZ, J.; MELIN, V.; BAEZA, J.; MENDONÇA, R.T.; CONTRERAS, D.; FREER, J.; Bioorganosolv pretreatments of *P. radiata* by a brown rot fungus (*Gloeophyllum trabeum*) and ethanolysis. **Enzyme Microb. Technol.** v. 47 (1), p. 11–16, 2010.

MU, X. et al. Mechanistic Insights into Formaldehyde-Blocked Lignin Condensation: A DFT Study. **Journal of Physical Chemistry**, v. 123, p. 8640-8648, 2019.

MUÑOZ, C.; MENDONÇA, R.; BAEZA, J.; BERLIN, A.; SADDLER, J.; FREER, J.; Bioethanol production from bio-organosolv pulps of *Pinus radiata* and *Acacia dealbata*. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** v. 82 (8), p. 767–774, 2007.

NALI, E. C.; RIBEIRO, L. B. N. M; HORA, A. B. **Biorrefinaria integrada à indústria de celulose no Brasil: oportunidade ou necessidade?** Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social, Rio de Janeiro, v. 43, n. 43, p. 257-294, 2016.

NIU YF; ZHANG MH; LI DW, ET AL. Melhoria da biossíntese de lipídios neutros e ácidos graxos poliinsaturados pela superexpressão de uma diacilglicerol aciltransferase tipo 2 na diatomácea marinha *Phaeodactylum tricornutum*. **Drogas Mar**, v. 11, p. 11, 2013.

NUCCI, E. P. D. **Substituição parcial de silagem de milho por palha de trevo vesiculoso (*Trifolium vesiculosum* Savi cv. “Iuchi”) no desempenho de novilhos da raça Charolês em confinamento**. Santa Maria, RS, 1994. 61 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 1994.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010.

OSTOVAREH, S.; KARIMI, K.; ZAMANI. Efficient conversion of sweet sorghum stalks to biogas and ethanol using organosolv pretreatment. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 66, p. 170-177, 2015.

PASQUINI, D.; BALOGH, D. T.; ANTUNES, P. A.; CONSTANTINO, C. J. L.; CURVELO, A. A. S.; AROCA, R. F.; OLIVEIRA, O. N. Surface morphology and molecular organization of lignins in Langmuir-Blodgett films. **Langmuir**, Washington, v. 18, p. 6593-6596, 2002.

PAN, X.; GILKES, N.; KADLA, J.; PYE, K.; SAKA, S.; GREGG, D.; EHARA, K.; XIE, D.; LAM, D.; SADDLER, J.; Bioconversion of hybrid poplar to ethanol and co-products using an organosolv fractionation process: optimization of process yields. **Biotechnol. Bioeng.** v. 94 (5), p. 851–861, 2006.

- PAN, X.; XIE, D.; YU, Y. W. The bioconversion of mountain pine beetle-killed Lodgepole pine to fuel ethanol using the organosolv process. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 101, n. 1, p. 39-48, 2008.
- PANDEY, K. K. A study of chemical structure of soft and hardwood and wood polymers by FTIR spectroscopy. **Journal of Applied Polymer Science**, [S. l.], v. 71, n. May, p. 1969–1975, 1999.
- PANG, C. H. et al. Relationship between thermal behaviour of lignocellulosic components and properties of biomass. **Bioresource Technology**, Barking, v. 172, p. 312–320, 2014.
- PARK, N. et al. Organosolv pretreatment with various catalysts for enhancing enzymatic hydrolysis of pitch pine (*Pinus rigida*). **Bioresour. Technol.** v.101, n.18, p.7046–7053, 2010.
- PAWAR, S. N. et al. Engineering physical and chemical properties of softwood kraft lignin by fatty acid substitution. **Industrial Crops & Products**, [S. l.], v. 89, p. 128–134, 2016.
- PERLACK, R. Biomass as a raw material for a bioenergy and bioproducts industry: the technical feasibility of an annual supply of billions of tons. United States: **Laboratório Nacional de Oak Ridge**, 2005.
- PILÓ-VELOSO, D.; NASCIEM, E. A.; MORAIS, S. S. L. Isolamento e análise estrutural de ligninas. **Química Nova**, São Paulo, v. 16, p. 435-448, 1993.
- PRADYAWONG, S. et al. Adhesion properties of soy protein adhesives enhanced by biomass lignin. **International Journal of Adhesion and Adhesives**, [S. l.], v. 75, n. August 2016, p. 66–73, 2017.
- QING, Q. et al. Comparison of alkaline and acid pretreatments for enzymatic hydrolysis of soybean hull and soybean straw to produce fermentable sugars. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 109, p. 391–397, Sept. 2017.
- RABELO, S. C. et al. Production of bioethanol, methane and heat from sugarcane bagasse in a biorefinery concept. **Bioresource technology**, v. 102, p. 7887-7895, 2011.
- RAHIM, A. H. A.; KHOOS, K. S.; YUNUS, N. M.; HAMZAH, W. S. W. Ether-functionalized ionic liquids as a solvent for dissolution of *Gigantochloa scortechini*. **AIP Conf Proc.** 2157: 020025-1-020025-6, 2019.
- RALPH, J.; LAPIERRE, C.; BOERJAN, W.; Lignin structure and its engineering, **Current Opinion in Biotechnology**, v.56, p. 240-249, 2019.
- RAMOS E PAULA, L. E. et al. Characterization of residues from plant biomass for use in energy generation. **Cerne**, Lavras, v. 17, n. 2, p. 237–246, 2011.
- REDDY, K. O.; MAHESWARI, C. U.; DHLAMINI, M. S.; MOTHUDI. B. M.; KOMMULA, V. P.; ZHANG, J.; RAJULU, A. V. Extraction and characterization of cellulose

single fibers from native African Napier grass. **Carbohydrate Polymers**, Oxford v. 188, p. 85-91, 2018.

REDDY, N.; YANG, Y. Natural cellulose fibers from soybean straw. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 14, p. 3593–3598, 2009.

ROBERTS, V. M. et al. Towards Quantitative Catalytic Lignin Depolymerization. **Chem. Eur. J.**, v. 17, p. 5939–5948, 2011.

ROCHA, A. P. **Estudo do efeito da presença de espécies derivadas do ácido bórico durante pré-tratamento alcalino na sacarificação de palha de soja**. Pirassununga, SP, 2019, 108 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Materiais) – Curso de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Materiais, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

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**, Campinas, v. 34, n. 7, p.1242-1254, maio 2011.

SANNIGRAHI, P.; MILLER, S. J.; RAGAUSKAS, A. J. Effects of organosolv pretreatment and enzymatic hydrolysis on cellulose structure and crystallinity in Loblolly pine. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 345, p. 965-970, 2010.

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H. de; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial de palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012

SARKANEN, K. V. Chemistry of solvent pulping. **Tappi Journal**, Atlanta, v. 73, p. 215-219, 1990.

SARKAR, N.; GHOSH, S. K.; BANNERIEE, S.; AIKAT, K. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**, Oxford, v. 37, p.19-27, 2012.

SAWATDEENARUNAT, C., SURENDRA, K. C., TAKARA, D., OECHSNER, H., & KHANAL, S. K.; Anaerobic digestion of lignocellulosic biomass: Challenges and opportunities. **Bioresource Technology**, v. 178, p. 178-186, 2015.

SCAPIN, E. et al. Production of Furanic Compounds and Organic Acids from Brazilian Pequi (*Caryocar brasiliensis* Camb.) Residues Using Green Chemistry. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, [s.l.], 2020.

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

SCHOLL, A. L.; MENEGOL, D.; PITARELO, A. P.; FONTANA, R. C.; ZANDONÁ FILHO, A.; RAMOS, L. P. Elephant grass pretreated by steam exploding for inducing secretion of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum* S1M29 solid-state cultivation. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 77, p 97-107, 2015.

- SHAH, S. H.; RAJA, I. A.; MAHMOOD, Q.; PERVEZ, A. Improvement in lipid extraction processes for biodiesel production from wet microalgae pellets grown in combinations of diammonium phosphate and sodium bicarbonate. **Tecnology Bioresour**, v. 2014, p 199-209, 2016.
- SHATALOV, A. A.; PEREIRA, H.; Kinetics of organosolv delignification of fibre crop *Arundo donax* L. **Ind. Crops Prod.** v.21 (2), p. 203–210, 2005.
- SIDIRAS, D.; KOUKIOS, E.; Simulation of acid-catalysed organosolv fractionation of wheat straw. **Bioresour. Technol.** v. 94 (1), p. 91–98, 2004.
- SILLS, D.; GOSSETT, J. M. Using FTIR to predict saccharification from enzymatic hydrolysis of alkali-pretreated biomasses. **Biotechnology and Bioengineering**, Alemanha, v. 109, p. 353-362, 2012.
- SILVA, J.A.L. Borate esters of polyols: Occurrence, applications and implications. **Inorganica Chimica Acta**, v. 520, 120307, 2021.
- SINGH, S. et al. Mechanistic Investigation in Ultrasound-Assisted (Alkaline) Delignification of *Parthenium hysterophorus* Biomass. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 53, n. 37, p. 14241–14252, 17 set. 2014.
- SLUITER, A. et al. Determination of Ash in Biomass. **National Renewable Energy Laboratory (NREL)**, v.1, n. 4, p. 1-8, 2005.
- SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D. **Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass**. Golden: National Renewable Energy Laboratory, 2012. (Technical Report NREL/TP-510-42618).
- STARK, A. Ionic liquids in the biorefinery: a critical assessment of its potential . **Energy Environment Sci**, v. 4, p. 19-32, 2011.
- SRIVASTANA, N.; KHARWAR, R. K.; MISHRA, P. K. Analysis of the cost savings of producing biomass-based biofuels. *In: Celulose para Celulase, estratégias para melhorar a produção de biocombustíveis*. Varanasi, 2019.
- SUN, J. X.; XU, F.; SUN, X. F.; XIAO, B.; SUN, R. C. Physico-chemical and termal characterization of cellulose from barley straw. **Polymer Degradation and Stability**, London, v. 88, p. 521-531, 2005.
- SUN, N.; RODRIGUEZ, H.; RAHMAN, M.; ROGERS, R. D. Where are ionic liquid strategies most suited in the pursuit of chemicals and energy from lignocellulosic biomass? **Chemical Communications**, Cambridge, v. 47, p. 1405-1421, 2011.
- SUN, R. C. et al. Structure-property relationships for technical lignins for the production of lignin-phenol-formaldehyde resins. **Industrial Crops and Products**, v.108, p. 316–326, 2017.
- SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for etanol production: a review. **Bioresource Technology**, Barking, v. 83, p. 1-11, 2002.

SUHAS, N.; GUPTA, V.K.; CARROTT, P.J.M.; SINGH, R.; CHAUDHARY, M.; KUSHWAKA, Cellulose: A review as natural, modified and carbon adsorbent. **activated Bioresource Technology**, v. 216, n. 11, p.1066-1076, 2016.

TANG, D. Y. Y.; KHOO, K. S.; CHEW, K. W.; TAO, Y.; HO, S. H.; SHOW, P. L. Potential to use microalgae bioproducts to improve the quality of natural products. **Tecnology Bioresour**, v 304, p. 122-197, 2020.

TEJADO, A. et al. Physico-chemical characterization of lignins from different sources for use in phenol-formaldehyde resin synthesis. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 98, n. 8, p. 1655– 1663, 2007.

TERAMOTO, Y.; LEE, S. H.; Endo, T.; Pretreatment of woody and herbaceous biomass for enzymatic saccharification using sulfuric acid-free ethanol cooking. **Bioresour. Technol.** v. 99 (18), p. 8856–8863, 2008.

TOLEDANO, A.; SERRANO, L.; LABIDI, J. Improving base catalyzed lignina depolymerization by avoiding lignin repolymerization. **Fuel**, v.116, p. 617–624, 2014.

TRIBOT, A.; AMER, G.; ALIO, M.A.; de BAYNAST, H.; DELATTRE, C.; PONS, A. Wood-lignin: supply, extraction processes and use as bio-based material, **Eur. Polym. J.** v. 112, p. 228–240, 2019.

VANHOLME, R.; DE MEESTER, B.; RALPH, J.; BOERJAN W.; Lignin biosynthesis and its integration into metabolism, **Current Opinion in Biotechnology**, v. 56, p. 230-239, 2019.

VENTURIN, B.; CAMARGO, A. F.; SCAPINI, T.; MULINARI, J.; BONATTO, C.; BAZOTI, S.; SIQUEIRA, D. P.; COLLA, L. H.; ALVES JR, S. L.; BENDER, J. P.; STEINMTZ, R. L. R.; KUNZ, A.; FONGARO, G.; TREICHEL, H. Effect of pretreatments on corn stalk chemical properties for biogas production on purpose. **Bioresource Technology**, Holanda, v. 266, p. 116-124, 2018.

WAN, C.; ZHOU, Y.; LI, Y. Liquid hot water and alkaline pretreatment of soybean straw for improving cellulose digestibility. **Bioresource Technology**, Barking, v. 102, n. 10, p. 6254–6259, 2011.

WEN, J.; SUN, S.; YUAN, T.; XU, F.; SUN, R.; Structural elucidation of lignin polymers of eucalyptus chips during organosolv pretreatment and extended delignification. **J. Agr. Food Chem.** V.61 (46), p. 11067–11075, 2013.

WILDSCHUT, J.; SMIT, A.T.; REITH, J.H.; HUIJGEN, W.J.; Ethanol-based organosolv fractionation of wheat straw for the production of lignin and enzymatically digestible cellulose. **Bioresour. Technol.** V. 135, p. 58–66, 2013b.

WILDSCHUT, J.; SMIT, A.T.; REITH, J.H.; HUIJGEN, W.J.; Ethanol-based organosolv fractionation of wheat straw for the production of lignin and enzymatically digestible cellulose. **Bioresour. Technol.** v.135, p. 58–66, 2013a.

XU, F. et al. Qualitative and quantitative analysis of lignocellulosic biomass using infrared techniques: A mini-review. **Applied Energy**, v. 104, p. 801–809, 2013.

XU, Z. et al. Enzymatic hydrolysis of pretreated soybean straw. **Biomass and Bioenergy**, v. 31, n. 2–3, p. 162–167, 2007.

YANG, J; PAN Y; LANÇADOR C; ZHANG L; HU H. Knockdown de fosfoenolpiruvato carboxiquinase aumenta o fluxo de carbono para a síntese de lipídios em *Phaeodactylum tricornutum*. **Algas Res**, v. 15, p. 50 – 58, 2016.

YANG, J. et al. Molecular Weight Distribution and Dissolution Behavior of Lignin in Alkaline Solutions. **Polymers**, v. 13, p 4166, 2021.

ZHANG, C. W.; XIA, S. Q.; MA, P. S. Facile pretreatment of lignocellulosic biomass using deep eutectic solvents. **Bioresource Technology**, Barking, v. 219, p. 1-5, 2016.

ZHANG, M.; XU, Y.; LI, K. Removal of residual lignin of ethano-based organosolv pulp by an alkali extraction process. **Journal of Applied Polymer Science**, Hoboken, v. 106, p. 630-636, 2007.

ZHANG, Y. H. Reviving the carbohydrate economy via mult-product lignocellulose biorefineries. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, Houndmills, n. 35, p. 75-367, 2008.

ZHANG, H.; WU, S. Generation of lignin and enzymatically digestible cellulose from ethanol-based organosolv pretreatment of sugarcane bagasse. **Cellulose**, London, v. 22, n. 4, p. 2409–2418, 2015.

ZHENG, Y.; ZHAO, J.; XU, F.; LI, Y.; Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 42, p. 35–53, 2014.

ZHUANG, X.; WANG, W.; YU, Q.; QI, W.; WANG, Q.; TAN, X.; ZHOU, G.; YUAN, Z. Liquid hot water pretreatment of lignocellulosic biomass for bioethanol production accompanying with high valuable products. **Bioresource Technology**, Barking, v. 199, p. 68-75, 2016.

ZHANG, H.; WU, S. Generation of lignin and enzymatically digestible cellulose from ethanol-based organosolv pretreatment of sugarcane bagasse. **Cellulose**, [s.l.], v. 22, n. 4, pp. 2409–2418, 2015.

ZHAO, C.; SHAO, Q.; MA, Z.; LI, B.; ZHÃO, X. Physical and chemical characterizations of corn stalk resulting from hydrogen peroxide presoaking prior to ammonia fiber expansion pretreatment. **Industrial Crops and Products**, Holanda, v. 83, p. 86-93, 2016.

ZHAO, J. et al. TG–DSC analysis of straw biomass pyrolysis and release characteristics of noncondensable gas in a fixed-bed reactor. **Drying Technology**, v. 35, n. 3, p. 347–355, 2017.

ZHOU, Z.Y. et al. Lignocellulosic biomass to biofuels and biochemicals: A comprehensive review with a focus on ethanol organosolv pretreatment technology. **Biotechnology And Bioengineering**. v. 115, n.11, p.2683-2702, 2018.

ZHU, Y.; XIN, F.; CHANG, Y.; ZHAO, Y.; WEICHONG, W.; Feasibility of reed for biobutanol production hydrolyzed by crude cellulase. **Biomass Bioenergy**, v. 76, p. 24–30, 2015.