

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

**Produção integrada de monossacarídeos e lignosulfonatos a partir de
bagaço de cana-de-açúcar**

OTTO LUCAS HEINZ

Lorena

2022

OTTO LUCAS HEINZ

**Produção integrada de monossacarídeos e lignosulfonatos a partir de
bagaço de cana-de-açúcar**

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

Orientador: Prof. Dr. André Luis Ferraz

Versão Corrigida

Lorena

2022

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

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

Heinz, Otto Lucas
Produção integrada de monossacarídeos e
lignosulfonatos a partir de bagaço de cana-de-açúcar /
Otto Lucas Heinz; orientador André Luis Ferraz -
Versão Corrigida. - Lorena, 2022.
92 p.

Tese (Doutorado em Ciências - Programa de Pós
Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de
Conversão de Biomassa) - Escola de Engenharia de
Lorena da Universidade de São Paulo. 2022

1. Biorrefinaria. 2. Lignina. 3. Lignosulfonato.
I. Título. II. Ferraz, André Luis, orient.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor André Ferraz, por toda dedicação, paciência e ensinamentos ao longo do doutorado.

Aos meus pais, José Elias e Leonir, e ao meu irmão, Renato, pelo amor, suporte e incentivo para que eu alcançasse meus sonhos.

A Jé, pelo amor, paciência, companheirismo e compressão durante todo o doutorado.

Aos técnicos e amigos do laboratório de ciência da madeira, Zé Moreira e Zé Cobrinha por toda a ajuda e ensinamentos.

Aos meus colegas de laboratório ciência da madeira, Fernanda, Ângela, Daniel, Flávia, Ana Maria e em especial a Uirá pela ajuda na reta final do doutorado.

Aos colegas do DEBIQ pela amizade durante todo este período.

À Escola de Engenharia de Lorena e ao Departamento de Biotecnologia por fazer possível minha participação no programa de Biotecnologia Industrial.

À CAPES, CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro.

RESUMO

HEINZ, O. L. **Produção integrada de monossacarídeos e lignosulfonatos a partir de bagaço de cana-de-açúcar**. 2022. 92 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2022.

O pré-tratamento quimiotermodinâmico utilizando sulfito-alcálico demonstra alta eficiência para reduzir a recalcitrância em materiais lignocelulósicos. Porém, a avaliação técnico-econômica desse processo, integrando uma biorrefinaria de primeira e segunda geração (1G2G) com bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol e energia elétrica, indica que o custo elevado dos insumos químicos de processamento é um limitante para a viabilidade econômica de todo o processo. Uma alternativa interessante para melhorar a viabilidade econômica do processo é diversificar os produtos no portfólio 1G2G. Neste contexto, foi proposto um novo modelo de biorrefinaria que utiliza o processamento quimiotermodinâmico com sulfito-alcálico (127°C e 7,5% Na₂SO₃/3,75% NaOH) como pré-tratamento do bagaço da cana-de-açúcar e integra a produção de monossacarídeos por sacarificação enzimática à produção de lignosulfonatos. A sacarificação do material pré-tratado converteu 74% da glucana e 75% da xilana a monossacarídeos com enzimas comerciais Cellic-Cetec 2. Os sólidos residuais do processo de sacarificação (25,5% da massa original do bagaço de cana) foram então reciclados com licor negro de pré-tratamento que continha 7,1 g/L de sulfito de sódio residual para uma segunda etapa de sulfonação da lignina contida nos sólidos (etapa denominada como resulfonação). As condições de resulfonação foram otimizadas indicando um ponto ótimo de rendimento em lignosulfonatos a 159 °C e suplementação de NaOH ao meio reacional correspondente a 13%(m/m). Nestas condições, a concentração de lignosulfonato aumentou dos 7,3 ± 0,3 g/L originalmente contidos no licor negro para 35 ± 1 g/L. O balanço de massa para o processo indicou que o lignosulfonato produzido ficou dividido em 57,3% contido no licor de resulfonação e 16,2% no hidrolisado enzimático que continha os monossacarídeos. Uma fração do lignosulfonato preparado foi purificada por ultrafiltração contra membrana de corte em 1 kDa, gerando um lignosulfonato purificado que continha 16 grupos sulfônicos e 27 grupos fenólicos por 100 unidades C9 de lignina. A análise do RMN-2D confirmou que aproximadamente 9-10% de todas as subestruturas de éter β-O-4' foram α-sulfonadas. Os dados sugerem que o lignosulfonato obtido é semelhante ao disponível comercialmente e pode ser um novo produto a ser adicionado ao portfólio de uma biorrefinaria de bagaço de cana.

Palavras-chave: Biorrefinaria. Lignina. Lignosulfonato.

ABSTRACT

HEINZ, O. L. **Integrated production of monosaccharides and lignosulfonates from sugarcane bagasse.** 2022. 92 p. Thesis (Doctoral of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2022.

Chemothermomechanical pretreatment using alkaline sulfite demonstrates high efficiency to reduce recalcitrance in lignocellulosic materials. However, the technical-economic aspects of this process, integrating a first and second generation (1G2G) biorefinery with sugarcane bagasse for the production of ethanol and electricity, indicate that the high cost of chemical processing inputs is a limiting factor for the economic viability of the entire process. An interesting alternative to improve the economic feasibility of the process is to diversify the products in the 1G2G portfolio. In this context, a new biorefinery model was proposed that uses chemothermomechanical processing with alkaline sulfite (127 ° C and 7.5% Na₂SO₃ / 3.75% NaOH) as a pre-treatment of sugarcane bagasse and integrates the production of monosaccharides by enzymatic saccharification to the production of lignosulfonates. The saccharification of the pre-treated material converted 74% of the glucan and 75% of the xylan to monosaccharides with Cellic-Cetec 2 commercial enzymes. The residual solids from the saccharification process (25.5% of the original mass of the bagasse) were then recycled with pretreatment black liquor containing 7.1 g/L of residual sodium sulfite for a second step of sulfonation of the lignin contained in the solids (step named resulfonation in the present thesis). Optimal resulfonation conditions were obtained at 159 °C and 13% (w/w) NaOH supplementation to the reaction medium, which increased lignosulfonate concentration from 7.1 ± 0.3 g/L in the black liquor to 35 ± 1 g/L in the resulfonation liquor. Mass balance for the process indicates that most of the original sugarcane bagasse lignin was split into lignosulfonates contained in the resulfonation liquor (57.3%) and in the enzymatic hydrolysate (16.2%). A fraction of the prepared lignosulfonate was desalted through ultrafiltration using a 1 kDa cut-off membrane. The desalted fraction of the lignosulfonate contained 16 sulfonic groups and 27 phenolic groups per 100 C9 lignin units. 2D-NMR analysis confirmed that approximately 9-10% of all β-O-4' ether substructures were α-sulfonated. The overall data indicate that the sugarcane bagasse lignosulfonate is similar to that available commercially from other sources and may be a new product to be added to the portfolio of a sugarcane bagasse biorefinery.

Keywords: Biorefinery. Lignin. Lignosulfonate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – a) Estrutura simplificada da parede celular lignificada típica, ilustrando a lamela média (ML), parede primária (P), camadas da parede celular secundária (S1, S2, S3) e lúmen (W). b) Distribuição de lignina e polissacarídeos em nível molecular na camada S2 da parede secundária.	16
Figura 2 – Unidades fenilpropanóides convencionais precursoras da lignina, álcool <i>p</i> -cumárilico, álcool coniferílico e álcool sinapílico (A). Monômeros “não convencionais” da lignina, incluindo monolignóis acilados no γ -OH com acetato, benzoato, <i>p</i> -hidroxibenzoato, <i>p</i> -cumarato, ferulato, álcool cafeíco, álcool 5-hidroxiconiferílico, hidroxicinamaldeídos, álcool dihidroconiferílico e ésteres ferulados (B); compostos fenólicos derivados de flavonóides (tricina) (C), hidroxistilbenos (resveratrol, isorhapontigenina e piceatanol) (D) e hidroxicinamamidas (E).....	18
Figura 3 – Estrutura hipotética da macromolécula de lignina com suas principais ligações.	19
Figura 4 – Fluxograma para o processo de uma biorrefinaria 1G2G integrada. Etapas do processo em destilarias autônomas 1G (blocos brancos) e processo 2G (blocos cinza). 22	
Figura 5 – (a) Mecanismo de sulfonação da lignina pelo processo sulfito ácido e neutro; e b) mecanismo de condensação que ocorre em meio ácido.	24
Figura 6 – Mecanismo de sulfonação da lignina pelo processo sulfito-alcálico.	25
Figura 7 – Modelo de estrutura genérica do lignosulfonato de sódio.	30
Figura 8 – Ilustração de reações de sulfometilação de uma unidade fenilpropanóide. ...	32
Figura 9 – Balança comercial brasileira para lignosulfonatos referentes aos anos de 2000 a 2020.	34
Figura 10 – Fluxograma geral de atividades desenvolvidas no presente estudo. Os blocos cinzas representam os processos e os blocos brancos representam os materiais.....	38
Figura 11 – Curva de calibração de sulfito de sódio(g/L).	42
Figura 12 – Curva padrão de cromatografia de permeação em gel (GPC) utilizado para determinação da massa molar de lignosulfonatos.	46
Figura 13 – Espectro de infravermelho do licor negro (A) e do lignosulfonato comercial (B).....	55

Figura 14 – Conversão de glucana em glicose e xilana em xilose a partir de bagaço de cana pré-tratado empregando 10 FPU/g Cellic CTec2, em consistência de 2% (A,B) e 5% (C,D), respectivamente.	57
Figura 15 – Cromatogramas de permeação em gel de amostras de lignosulfonato (LS) recuperadas de licor negro de pré-tratamento, licor de ressulfonação do ponto ótimo (159 ° C e 13% (m/m) NaOH) e amostra de lignosulfonato comercial de madeira de conífera, cuja massa molar é de 33 kDa (Zinovyev <i>et al.</i> 2018). Os calibradores referem-se a poliestireno sulfonato e ácido vanílico.	63
Figura 16 – Cromatograma de permeação em gel do licor negro em dois comprimentos de onda (280 e 315 nm) (A) e cromatograma do licor negro contaminado com padrão de ácido cumárico (0,01 g/L) (315nm) (B)	64
Figura 17 – Efeitos das variáveis independentes temperatura (°C) e adição de álcali (% m/m) e suas interações sobre o teor de lignosulfonato, % de OH fenólico e valor de Mw do lignosulfonato em função das condições de ressulfonação dos sólidos residuais do processo de sacarificação. Os dados foram calculados a partir de um planejamento experimental 2 ² com arranjo tipo estrela.	67
Figura 18 – Gráfico de superfície de resposta para o teor de lignosulfonato (g/L) em função das condições de ressulfonação dos sólidos residuais do processo de sacarificação.	70
Figura 19 – Balanço de massa para o bagaço de cana-de-açúcar durante pré-tratamento quimiotermodinâmico, seguido da hidrólise enzimática e reação de ressulfonação no ponto ótimo com relação sólido:líquido 1:28.	74
Figura 20 – Modelo proposto de lignosulfonato (tipo siringil) usado para estimar o grau de substituição de de grupos sulfônicos e OH fenólicos.	75
Figura 21 – Cromatogramas de permeação em gel do lignosulfonato (LS) recuperado do licor de ressulfonação do ponto ótimo (159 ° C e 13% (m/m) NaOH) e licor de ressulfonação do ponto ótimo após ultrafiltração. Os calibradores referem-se ao poliestireno sulfonato e ácido vanílico.	76
Figura 22 – Espectros de infravermelho (FTIR) do licor negro (LN) e licor negro purificado (A); bem como do licor de ressulfonação ponto ótimo (LS) antes e após purificação (B).....	78

Figura 23 – Comportamento da absorvidade molar em função do comprimento de onda para o licor negro (LN) purificado e lignossulfonato (LS) purificado a partir do licor de resulfonação gerado no ponto ótimo..... 79

Figura 24- Espectros de RMN-2D-HSQC ($\delta C/\delta H$ 52–146/2,5–8,0) do lignossulfonato purificado recuperado após ultrafiltração do licor de resulfonação. As principais estruturas detectadas estão representadas na parte inferior e incluem éteres $\beta-O-4'$ (A), éteres $\beta-O-4'$ com $C\alpha$ -sulfonados (AL), unidades guaiacil (G), siringil unidades (S), unidades de siringil $C\alpha$ -oxidado (S'), unidades de ácido p-cumárico (pCA) e unidades de ácido ferúlico (FA). Observe que a região que mostra o sinal de correlação $C\beta/H\beta$ de éteres $\beta-O-4'$ $C\alpha$ -sulfonados (AL) foi ampliada (x3) para melhor visualização..... 80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química de diferentes materiais lignocelulósicos.	15
Tabela 2 – Porcentagem de lignina e de cada unidade precursora da lignina em diferentes classes vegetais.	20
Tabela 3 – Delineamento experimental visando o máximo teor de lignosulfonatos, % de OH fenólico e estudo da distribuição da massa molar ponderal média (M_w), tendo como variáveis temperatura(X_1) e adição de álcali(X_2).	44
Tabela 4 – Composição química, rendimento de sólidos e balanço de massas para o pré-tratamento CTMP de bagaço de cana-de-açúcar utilizando 7,5% de Na_2SO_3 e 3,75% de NaOH.	53
Tabela 5 – Conteúdo de ácidos hidroxicinâmicos no bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> e materiais pré-tratados.	53
Tabela 6 – Composição química do licor negro e do licor de lavagem oriundos do pré-tratamento CTMP sulfito-alcálico de bagaço de cana-de-açúcar.	56
Tabela 7 – Composição do resíduo da hidrólise enzimática em maior escala de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado. RHE1- Resíduo Hidrólise Enzimática que não passou pelo refinador; RHE2 - Resíduo Hidrólise Enzimática que passou por refinamento.	60
Tabela 8 – Matriz experimental e resultados obtidos pelo planejamento experimental 2^2 com arranjo tipo estrela utilizado para estudar o teor de lignosulfonato (Y_1), a % de OH fenólico (Y_2) e a distribuição de massa molar ponderal média (M_w) (Y_3) em função das condições de ressulfonação* dos sólidos residuais do processo de sacarificação.	61
Tabela 9 – Modelos matemáticos e coeficiente de determinação (R^2) para as respostas teor de lignosulfonato (Y_1) e % de OH fenólico (Y_2) em função das condições de ressulfonação dos sólidos residuais do processo de sacarificação.	68
Tabela 10 – Análise de variância (ANOVA) usando o programa Desing Expert 9.0 ao nível de confiança de 95% para regressão do modelo apresentado para a resposta teor de lignosulfonatos (Y_1) em função das condições de ressulfonação dos sólidos residuais do processo de sacarificação.	68
Tabela 11 – Análise de variância (ANOVA) usando o programa Desing Expert 9.0 ao nível de confiança de 95% para regressão do modelo apresentado para a resposta % de OH fenólico (Y_2) em função das condições de ressulfonação dos sólidos residuais do processo de sacarificação.	69

Tabela 12 – Concentração de íons sulfito, teor de lignosulfonato, % de OH fenólico, M_w , M_n e dispersibilidade (D) nas frações líquidas produzidas ao longo do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar.....	71
Tabela 13 – Análise elementar de CHNS, % de OH fenólico e M_w , M_n e dispersibilidade do licor negro e licor negro purificado, licor de resulfonação no ponto ótimo e licor de resulfonação no ponto ótimo purificado.	75
Tabela 14 – Atribuição das principais bandas de infravermelho (FTIR) para o lignosulfonato.....	77

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Componentes dos materiais lignocelulósicos	15
2.2 Biorrefinarias de materiais lignocelulósicos.....	20
2.3 Pré-tratamento de materiais lignocelulósicos	22
2.3.1 Pré-tratamento com íons sulfito.....	23
2.4 Lignosulfonatos	29
2.4.1 O mercado atual de lignina e lignosulfonato	32
2.5 Aplicações de lignosulfonatos	34
3 OBJETIVOS	37
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
4.1 Bagaço de cana de açúcar e fluxograma geral dos experimentos.....	38
4.2 Pré-tratamento do bagaço de cana com sulfito-alcálico	38
4.3 Determinação da composição química do bagaço de cana <i>in natura</i> e dos materiais pré-tratados	40
4.4 Ensaios de hidrólise enzimática das amostras de bagaço de cana pré-tratado	42
4.5 Sulfonação dos sólidos residuais de hidrólise enzimática	44
4.6 Determinação do teor de lignosulfonatos em solução	45
4.7 Purificação de lignosulfonatos.....	45
4.8 Estudo das características estruturais do lignosulfonato	46
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
5.1 Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar	51
5.2 Caracterização dos licores de pré-tratamento.....	54
5.3 Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado	57
5.4 Sulfonação dos sólidos residuais do processo de hidrólise enzimática	60
5.4.1 Análise estatística dos dados indicados na Tabela 8	66
5.5 Balanço de massa para os componentes do bagaço de cana-de-açúcar sob processamento na biorrefinaria proposta.....	72
5.6 Purificação do lignosulfonato obtido.....	74
6 CONCLUSÃO.....	82
REFERÊNCIAS	83

1 INTRODUÇÃO

A biorrefinaria de biomassa lignocelulósica pode contribuir para equilibrar o ciclo de carbono no planeta, minimizando o uso de combustíveis fósseis (KUAR *et al.*, 2020). Formas tecnicamente eficientes de processamento de biomassa foram desenvolvidas nas últimas décadas, mas os estudos mais abrangentes, que incluem a avaliação de viabilidade econômica destes processos, apontam também que existem gargalos de processo que impedem o desenvolvimento rentável de alguns modelos de biorrefinaria (KLEIN *et al.*, 2019; VASCONCELOS *et al.*, 2020; CULABA *et al.*, 2021). Entre as conclusões destes estudos fica claro que a diversificação de produtos nas biorrefinarias pode maximizar o uso de todos os componentes da biomassa, agregando valor na cadeia de produção, o que pode permitir amortizar os custos relativamente elevados dos combustíveis líquidos e energia atualmente obtidos a partir da biomassa lignocelulósica (MENDES *et al.*, 2018; KLEIN *et al.*, 2019; DE *et al.*, 2021).

As biorrefinarias de cana-de-açúcar são extremamente atrativas para o cenário nacional, pois o país é um grande produtor de açúcar e etanol a partir de cana, sendo que o etanol brasileiro representa 38,6% da produção mundial (FAOSTAT, 2019). Um dos subprodutos deste processo produtivo é o bagaço de cana que é composto por três componentes principais, celulose, hemicelulose e lignina e representa cerca de 15% (em massa seca) da cana *in natura* processada industrialmente. Neste sentido, o desenvolvimento de tecnologias que visem o aproveitamento dos componentes do bagaço de cana para agregar valor à cadeia produtiva do setor sucroenergético permitirão o crescimento otimizado deste setor industrial (CARPIO; SOUZA, 2017; CAVALCANTI; CARVALHO; DA SILVA; 2020).

O principal limitante para a utilização dos polissacarídeos do bagaço de cana-de-açúcar está relacionado à estrutura complexa da parede celular das células que o compõem. A presença de lignina e hemicelulose revestindo a celulose corresponde à origem de sua recalcitrância. Para que a hidrólise enzimática da fração polissacarídica seja eficiente, é necessário submeter o material lignocelulósico a um pré-tratamento a fim de remover, mesmo que parcialmente, tais compostos e consequentemente aumentar o acesso das enzimas à celulose (ALCÁNTARA *et al.*, 2016).

Nosso grupo de pesquisa tem desenvolvido processos de pré-tratamento quimiotermodinâmicos que utilizam sulfito-alcalino e que resultam em rendimentos elevados em celulose e hemicelulose, além de melhoria significativa da digestibilidade

enzimática do substrato (MENDES *et al.*, 2011; LAURITO-FRIEND *et al.*, 2015; MENDES *et al.*, 2013; REINOSO *et al.*, 2018). Os lignosulfonatos gerados neste tipo de pré-tratamento podem ser uma alternativa interessante para o aproveitamento da lignina em biorrefinarias, pois apresentam amplo potencial de aplicações, tais como aditivos em formulações de rações animais e pesticidas, auxiliar lubrificante em sistemas de perfuração de petróleo (ARO; FATEHI, 2017), preparo de compósitos (YAMINI *et al.*, 2019), complexante de metais (LIU; WANG; WOLCOTT, 2018), surfactantes (XU *et al.*, 2015) e plastificantes em misturas de concreto (TOPÇU; ATEŞIN, 2016; COLOMBO *et al.*, 2017). De fato, atualmente, os lignosulfonatos representam 90% do mercado de comercialização de lignina, sendo normalmente produzidos a partir da sulfonação ou sulfometilação da lignina Kraft produzida nos processos industriais de polpação da madeira (ARO; FATEHI, 2017).

Dentro do contexto mencionado anteriormente, o presente estudo tem como objetivo o desenvolvimento de um modelo de biorrefinaria no qual se emprega o pré-tratamento quimiotermodinâmico que utiliza sulfito-alcálico e destina as frações de polissacarídeos para a produção de açúcares monoméricos e a lignina para produção de lignosulfonatos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Componentes dos materiais lignocelulósicos

Os materiais lignocelulósicos são compostos majoritariamente por celulose, hemicelulose e lignina (FENGEL; WEGENER, 1989). A proporção destes componentes pode variar em função do tipo de solo e do clima onde as plantas se desenvolvem, da disponibilidade de água, da época da safra, bem como da espécie vegetal ou da variedade de uma mesma espécie vegetal (HIMMEL *et al.*, 2007; DEL RIO *et al.*, 2020). A Tabela 1 ilustra a composição química majoritária de diferentes materiais lignocelulósicos classificados de acordo com ao grupo vegetal ao qual pertencem.

Tabela 1 – Composição química de diferentes materiais lignocelulósicos.

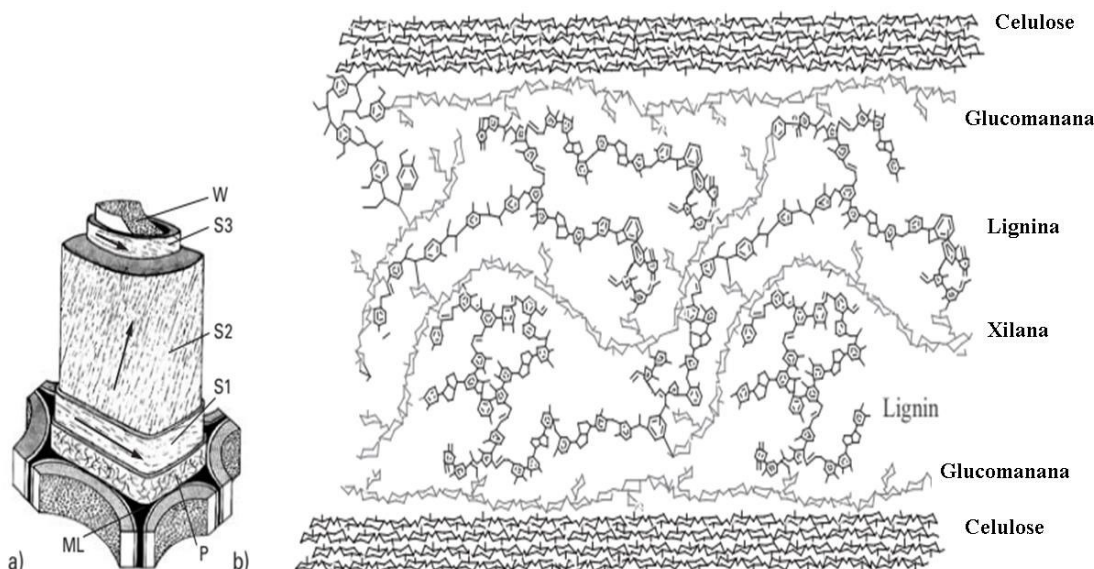
Material lignocelulósico	Composição do material lignocelulósico (g/100 gramas de material)			Fonte
	Celulose	Hemicelulose	Lignina	
Gramineas				
Bagaço de cana-de-açúcar	40,0	21,4	22,4	Reinoso <i>et al.</i> (2018)
Palha de milho	31,9	17,4	15,2	Hijosa-Valsero <i>et al.</i> (2020)
Coníferas				Zhu <i>et al.</i>
Spruce	43,2	21,3	28,3	(2009)
Douglas-fir	44,0	21,2	32,0	Zhang; Houtman; Zhu, (2014)
Folhosas				
<i>Eucalyptus saligna</i>	48,1	12,7	26,9	Zhu <i>et al.</i>
Álamo	45,9	17,9	23,0	(2010)

Fonte: Autoria Própria.

Os componentes mencionados na Tabela 1 ocorrem nas paredes das células que formam os vegetais lignificados. A Figura 1a ilustra a parede celular lignificada e a Figura 1b mostra um modelo de como ocorrem e interagem os principais componentes na parede secundária lignificada (HENRIKSSON, 2009). A celulose é o principal componente da parede celular secundária e corresponde ao polímero natural mais abundante na superfície terrestre. Trata-se de um polímero formado por anidroglicoses unidas entre si por ligações glicosídicas ($\beta 1 \rightarrow 4$), com um grau de polimerização entre 7.000 e 15.000. A linearidade e a alta massa molar das cadeias de celulose, somadas à presença das ligações de hidrogênio e interações de van der Waals, ocasionam a formação de regiões ordenadas (regiões cristalinas), apesar de haver regiões menos ordenadas (regiões amorfas). Na parede celular

vegetal, a celulose organiza-se ainda na forma de microfibrilas de 2 a 20 nm de diâmetro e entre 100 a 40.000 nm de comprimento. (FENGEL; WEGENER, 1989).

Figura 1 – a) Estrutura simplificada da parede celular lignificada típica, ilustrando a lamela média (ML), parede primária (P), camadas da parede celular secundária (S1, S2, S3) e lúmen (W). b) Distribuição de lignina e polissacarídeos em nível molecular na camada S2 da parede secundária.



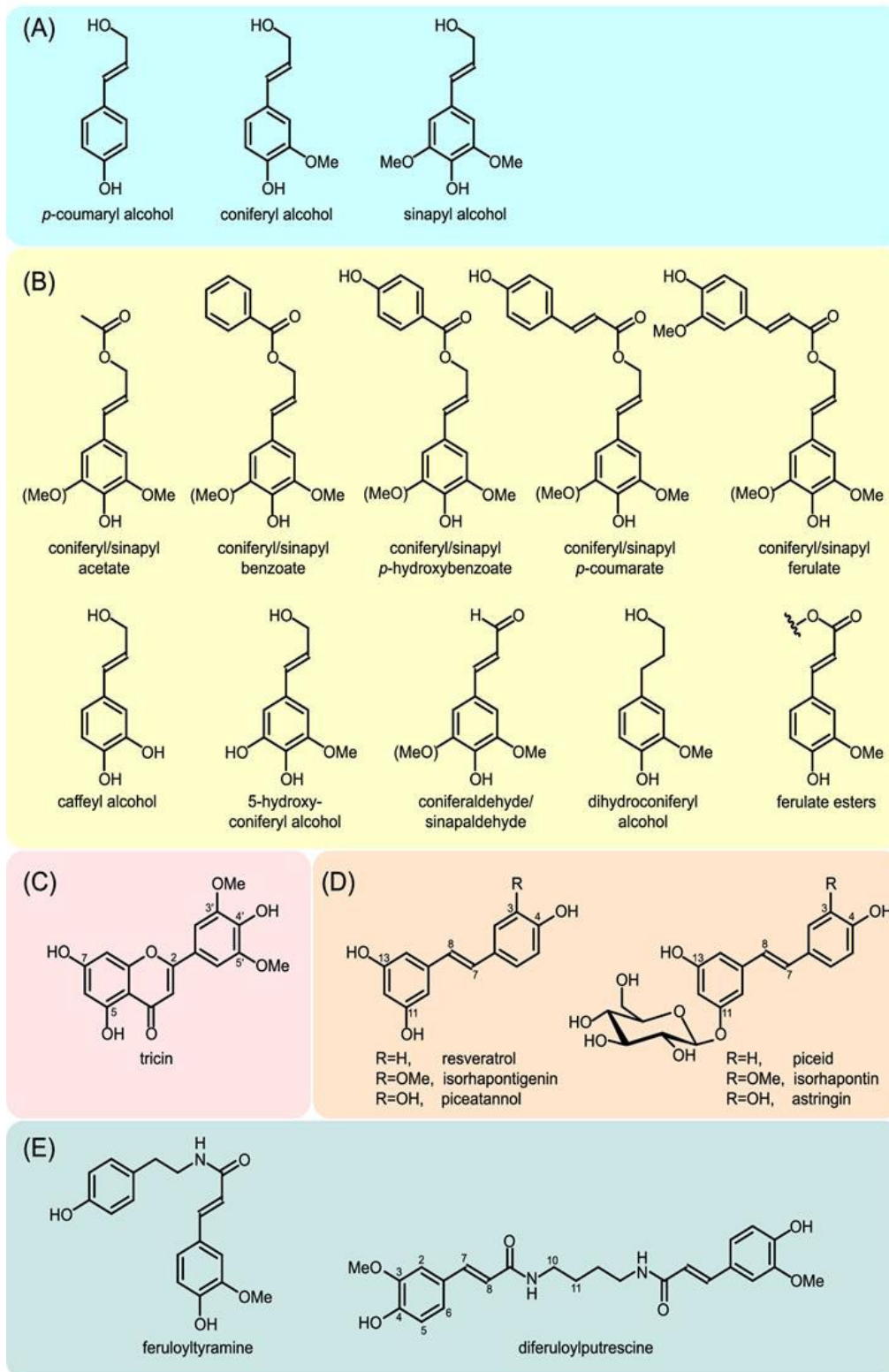
Fonte: Modificado de Henriksson (2009).

A hemicelulose é o segundo polissacarídeo mais abundante na parede celular secundária e trata-se de um polímero ramificado com grau de polimerização na faixa de 80-200 e está associada tanto à celulose como à lignina (PENG *et al.*, 2012). As hemiceluloses podem ser formadas por um único açúcar na cadeia principal, dando origem a homopolímeros como a xilana, ou por mais de um açúcar na cadeia principal, dando origem a heteropolímeros como a glucomanana. As hemiceluloses também apresentam grupos pendentes à cadeia principal que podem incluir diversos açúcares, ácidos urônicos, ácidos hidroxicinâmicos, além de contar com acetilações nas hidroxilas da cadeia principal (FENGEL; WEGENER, 1989). No bagaço de cana-de-açúcar, a principal hemicelulose encontrada é a 4-O-metil-glucuronarabinoxilana (GAX), que contém L-arabinose e ácidos urônicos pendentes da cadeia principal de xilana (SCHELLER; ULVSKOV, 2010; PENG *et al.*, 2012). Nesta hemicelulose ainda existem grupos acetila que esterificam algumas hidroxilas das xilanas, além de grupos feruloila esterificando eventualmente as arabinoses. Estes grupos feruloila podem formar ligações covalentes com a lignina através de suas

hidroxilas fenólicas, dando origem aos complexos lignina-carboidrato encontrados em gramíneas (HATFIELD; MARITA, 2010; HATFIELD; RANCOUR; MARITA, 2017).

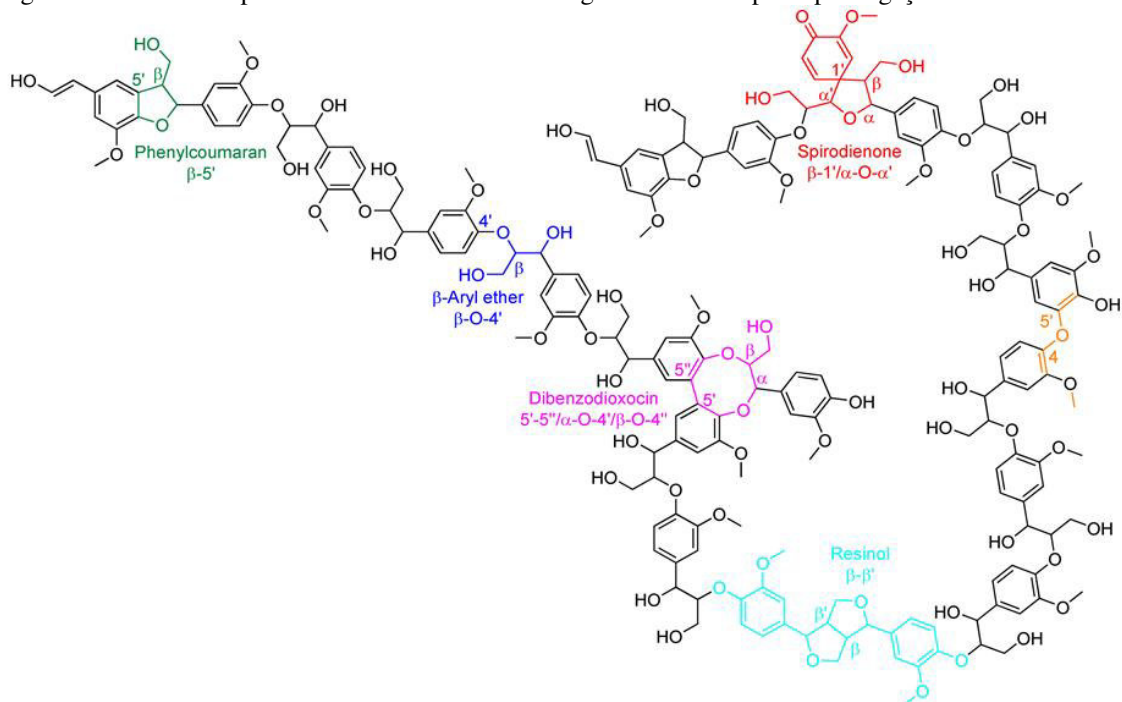
A lignina é o componente não polissacarídico da parede celular secundária e constitui cerca de 15% a 30% de sua massa seca (GALL *et al.*, 2017). A principal função desta macromolécula é atuar como agente de reforço para a rede de polissacarídeos, garantindo, no nível celular, a capacidade de transporte de água e nutrientes além de proteção contra a ação de agentes patogênicos (FENGEL; WEGNER, 1989; VANHOLME *et al.*, 2019). A lignina possui estrutura complexa formada por polimerização oxidativa de precursores fenólicos que incluem os álcoois cinâmicos convencionais indicados na Figura 2A que dão origem a unidades básicas da molécula. Os-álcoois p-cumárico, coniferílico e sinapílico geram unidades básicas denominadas p-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S), respectivamente. Entretanto, nos últimos anos, um maior número de precursores têm sido identificados na biossíntese de lignina e têm sido denominados como “precursores não convencionais de lignina” e incluem o ácido ferúlico, ácido p-cumárico, tricina, álcool dihidroconiferílico, ácido caféico, álcool coniferílico acetilado e coniferaldeído (Figura 2). (DEL RÍO *et al.*, 2020). Vanholme *et al.* (2019) evidenciam que na literatura já foram relatados 35 precursores não convencionais de ligninas em diferentes tipos de espécies vegetais.

Figura 2 – Unidades fenilpropanóides convencionais precursoras da lignina, álcool *p*-cumárico, álcool coniferílico e álcool sinápico (A). Monômeros “não convencionais” da lignina, incluindo monolignóis acilados no γ -OH com acetato, benzoato, *p*-hidroxibenzoato, *p*-cumarato, ferulato, álcool cafeíco, álcool 5-hidroxiconiferílico, hidroxicinamaldeídos, álcool dihidroconiferílico e ésteres ferulados (B); compostos fenólicos derivados de flavonóides (tricina) (C), hidroxistilbenos (resveratrol, isorhapontigenina e piceatanol) (D) e hidroxicinamamidas (E).



Há diferentes ligações entre as unidades estruturais da lignina, sendo a ligação β -O-4 a mais comum (50-80%). Outras ligações éter comumente encontradas são α -O-4 e 5-O-4, além de ligações carbono-carbono, β - β , 5-5 e β -1 (DEL RIO *et al.*, 2020). Em função das diferentes possíveis ligações da lignina não há uma estrutura exatamente conhecida, uma vez que os processos empregados na desconstrução do material lignocelulósico e isolamento de lignina afetam sua estrutura (RUTTEN; RAMÍREZ; DUQUE, 2017; VANHOLME *et al.*, 2019). A Figura 3 representa uma estrutura hipotética de lignina mostrando os diferentes tipos de ligações possíveis entre as unidades estruturais.

Figura 3 – Estrutura hipotética da macromolécula de lignina com suas principais ligações.



Fonte: Augustin *et al.*, (2021).

Os diferentes grupos de plantas apresentam variações nas proporções das unidades precursoras que constituem a lignina. Em gimnospermas (coníferas), a lignina é formada fundamentalmente de unidades G, enquanto que em angiospermas (eudicotiledôneas) a lignina é formada principalmente de unidades G e S. Já as ligninas de gramíneas (monocotiledôneas) compreendem as unidades G, S e H em diferentes proporções, além de apresentar acilações com ácido *p*-cumárico nos carbonos γ (HENRIKSSON, 2009; DEL RÍO *et al.*, 2015). A Tabela 2 apresenta a porcentagem de lignina e de cada unidade precursora em diferentes plantas.

Tabela 2 – Porcentagem de lignina e de cada unidade precursora da lignina em diferentes classes vegetais.

Nome científico	Nome comum	% de lignina	Hidroxifenil (H)(%)	Guaiacil (G) (%)	Siringil (S) (%)
Gimnospermas	Coníferas	27–33	< 5	> 95	0
Eudicotiledôneas	Folhosas	18–25	0–8	25–50	46–75
Monocotiledôneas	Gramíneas	17–24	5–33	33–80	20–55

Fonte: Henriksson, (2009).

Del Rio *et al.* (2015) estudaram a estrutura da lignina proveniente do caule de cana-de-açúcar sendo que observaram uma composição enriquecida em unidades siringil com proporção H:G:S de 2:38:60. Já a lignina da palha de cana (folhas e topo da planta) é rica em unidades guaiacil, apresentando a relação H:G:S de 4:68:28. Essa diferença de composição reflete nas abundâncias relativas das ligações presentes entre as unidades da lignina. A principal ligação encontrada na lignina do bagaço foi β -O-4 (83%), seguido por menor quantidade de β -5 (6%) e outras subestruturas condensadas. Já a lignina da palha tem menos ligações β -O-4, cerca de 75%, e mais ligações β -5 (15%). No bagaço-de-cana os ácidos hidroxicinâmicos são abundantes, com presença majoritária do ácido *p*-cumárico em toda a parede celular ligados ao carbono- γ da lignina na forma de um éster, predominantemente em unidade S, enquanto o ácido ferúlico está preferencialmente ligado a fração de hemicelulose.

2.2 Biorrefinarias de materiais lignocelulósicos

O uso integrado dos componentes dos materiais lignocelulósicos está na base dos processos modernos de biorrefino de biomassa. Uma biorrefinaria pode ser definida, portanto, como uma instalação industrial que processa material lignocelulósico (resíduos agrícolas, resíduos florestais ou mesmo plantas desenvolvidas unicamente para esta finalidade) a fim de agregar valor econômico à biomassa vegetal através da produção de combustíveis líquidos, vapor, energia e diversos insumos para as indústrias química, alimentícia e farmacêutica (IEA, 2009).

No Brasil, dentre os resíduos agrícolas gerados, o bagaço de cana-de-açúcar é a biomassa lignocelulósica de maior interesse para a implementação de biorrefinarias devido ao seu baixo custo, composição e disponibilidade no pátio fabril (CARPIO; SOUZA, 2017; CHANDEL *et al.*, 2021). A safra 2021/2022 de cana-de-açúcar é estimada em 570 milhões de toneladas de acordo com o relatório publicado pelo Conselho Nacional de Abastecimento (CONAB, 2021). Considerando que cerca de 15% (base seca) da cana-de-açúcar *in natura* processada na indústria permanece no pátio fabril na forma de bagaço, estima-se uma

geração de 85 milhões de toneladas de bagaço de cana seco na safra 2021/2022. O principal destino atual deste material é a combustão direta para a geração de vapor e eletricidade (CARPIO; SOUZA, 2017; CHANDEL *et al.*, 2021).

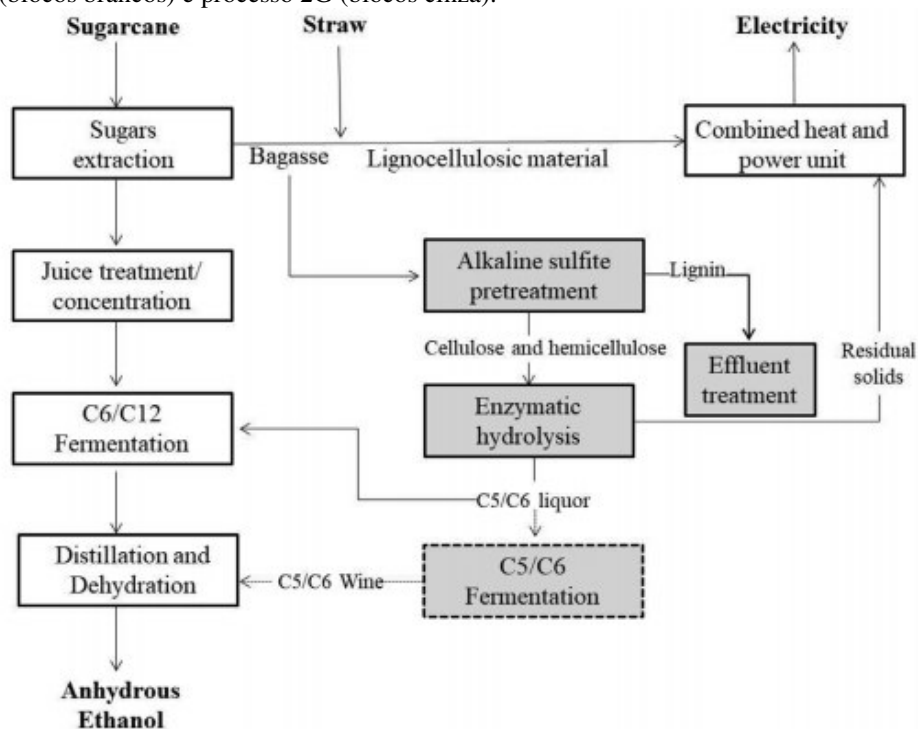
As biorrefinarias estão propostas no sentido de gerar alternativas de uso de materiais como o bagaço de cana. No entanto, a grande limitação para o uso integral dos componentes dos materiais lignocelulósicos reside na estrutura complexa da parede celular lignificada (HIMMEL *et al.*, 2007; REZANIA *et al.*, 2020). Neste contexto, uma série de processos têm sido desenvolvidos para viabilizar biorrefinarias de cana-de-açúcar a fim de produzir sacarose, vapor e eletricidade dentro de um conjunto de operações unitárias denominadas como tecnologia de 1ª geração. Acoplado a este processo produtivo, busca-se viabilizar a produção de monossacarídeos da fração polissacarídica contida no bagaço de cana, a fim de gerar, por exemplo, mais etanol, agregando mais uma série de operações unitárias denominadas de tecnologia de 2ª geração. As indústrias de primeira geração estão atualmente instaladas e em operação, já possuindo tecnologia consolidada. A tecnologia de 2º geração ainda é nascente na escala industrial, apesar de já dispor de inúmeras instalações em operação em todo o mundo (CHANDEL *et al.*, 2021). Nota-se que tanto nas tecnologias de 1ª como de 2ª geração, a lignina contida no bagaço de cana ou nos resíduos de hidrólise dos polissacarídeos é fundamentalmente empregada para gerar vapor e eletricidade através da queima. Porém, este componente também pode ser destinado à cadeia produtiva de insumos químicos, visando melhorar a viabilidade econômica deste complexo industrial (JÖNSSON; ALRIKSSON; NILVEBRANT, 2013; LIU; WANG; WOLCOTT, 2017; REZANIA *et al.*, 2020; FREITAS *et al.*, 2021).

Segundo Sivagurunathan *et al.* (2021) e Liu *et al.* (2021) as biorrefinarias de base lignocelulósica possuem desafios e oportunidades para a lignina, tendo aplicações versáteis em combustível e produtos químicos que podem reduzir a “pegada” de carbono do processo produtivo devido a diminuição da dependência de combustíveis fósseis. Klein *et al.* (2019) e Freitas *et al.* (2021) ressaltam que a diversificação do portfólio de produtos da biorrefinaria de biomassa vegetal pode ajudar em sua viabilidade econômica.

Apesar das biorrefinarias de 1º e 2º geração poderem operar de forma independente uma da outra, grande parte das publicações sugerem à implementação de uma indústria com a coprodução integrada, de forma que haja um melhor desempenho da cadeia produtiva do etanol (MENDES *et al.*, 2018). Reshmy *et al.* (2021) relatam que, em geral, cerca de 50% da biomassa lignocelulósica disponível deve ser empregada para a produção de vapor e energia em uma biorrefinaria. O excedente pode ser utilizado como matéria-prima

para a produção de bioetanol 2G em uma planta versátil que pode alternar entre as duas configurações para otimizar a receita com base nos preços de energia e bioetanol. Um possível modelo de uma biorrefinaria integrada da cana-de-açúcar é exemplificado na Figura 4. O exemplo ilustrado inclui a produção autônoma de etanol, sem a produção de sacarose. No entanto, o processo 1G pode facilmente ser integrado com a produção de sacarose com a consequente diminuição na produção de etanol (MENDES *et al.*, 2018).

Figura 4 – Fluxograma para o processo de uma biorrefinaria 1G2G integrada. Etapas do processo em destilarias autônomas 1G (blocos brancos) e processo 2G (blocos cinza).



Fonte: Mendes *et al.* (2018).

2.3 Pré-tratamento de materiais lignocelulósicos

Nos materiais lignocelulósicos, a hemicelulose, a celulose e a lignina interagem de forma físico-química entre si, dando origem a uma parede celular estruturalmente complexa o que torna difícil o isolamento de cada uma das frações mencionadas (Figura 1) (HIMMEL *et al.*, 2007; REZANIA *et al.*, 2020). Deste modo, para utilização da biomassa lignocelulósica em biorrefinarias é necessário o emprego de algum tipo de pré-tratamento que permita romper ou diminuir as interações existentes entre a celulose, a hemicelulose e a lignina (REZANIA *et al.*, 2020).

Os pré-tratamentos são classificados em biológicos, mecânicos e químicos ou, usualmente, resultantes da combinação de dois ou mais destes princípios e têm como

principal objetivo remover ou modificar os limitantes estruturais dos materiais lignocelulósicos que causam sua recalcitrância (XU *et al.*, 2015; CHANDEL *et al.*, 2021).

Os pré-tratamentos biológicos utilizam fungos de degradação branca, como *Phanerochaete chrysosporium*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus* e *Ceriporiopsis subvermispora* que apresentam a capacidade de degradar lignina seletivamente e preservar parte dos polissacarídeos presentes na biomassa. Apesar de pouco intensivos em termos do emprego de reagentes químicos, estes pré-tratamentos são menos utilizados, pois possuem como desvantagens a necessidade do emprego de processos de biodegradação de lignocelulósicos em grande escala mantidos por longos períodos de pré-tratamento (SALVACHÚA *et al.*, 2011; DONG *et al.*, 2013; MACHADO; FERRAZ, 2017).

Os pré-tratamentos mecânicos visam à redução do tamanho das partículas de biomassa com a eventual ruptura da parede celular vegetal, culminando no aumento da área superficial do substrato, facilitando assim, etapas subsequentes de sacarificação. Estes processos empregam essencialmente etapas de moagem, trituração por corte e/ou refinamento mecânico em discos. Estes processos não demandam reagentes químicos nem longos tempos de pré-tratamento; no entanto, são muito intensivos em energia demandada para o processo de moagem da biomassa (ZAKARIA; HIRATA; HASSAN, 2014).

Os pré-tratamentos químicos, por sua vez, solubilizam a hemicelulose e/ou lignina da biomassa, deixando um substrato rico em celulose e conseqüentemente aumentando o rendimento de glicose durante as etapas de hidrólise enzimática (PUTRO *et al.*, 2016). Os tratamentos com ácido diluído (até cerca de 10 % de ácido em relação à massa de biomassa) proporcionam majoritariamente a remoção da fração hemicelulósica, levando a um aumento na eficiência da hidrólise enzimática da celulose (VERGARA *et al.*, 2018). O meio alcalino proporciona a remoção predominante de lignina e a hidrólise de ésteres ligados aos polissacarídeos e lignina, tornando o substrato gerado mais acessível à hidrólise enzimática da celulose e da hemicelulose (WOICIECHOWSKI *et al.*, 2020).

2.3.1 Pré-tratamento com íons sulfito

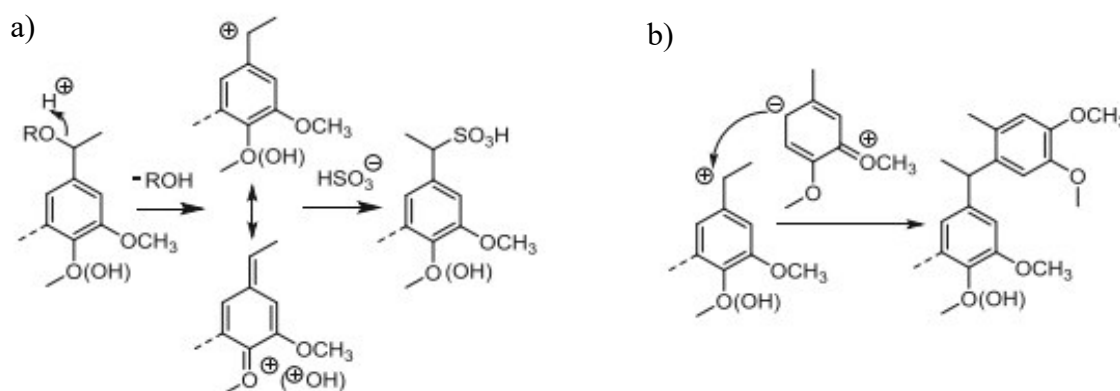
O pré-tratamento objeto do desenvolvimento experimental no presente trabalho decorre dos processos tradicionais de polpação quimitemomecânica que empregam íons sulfito como agente deslignificante (SJOSTROM, 1993). Uma das principais características dos processos com íons sulfito é a possibilidade de reação em meio ácido, neutro ou alcalino, gerando produtos de diferentes características e aplicações comerciais (SJOSTROM, 1993; LIU; WANG; WOLCOTT, 2017). Os processos em meio ácido ocasionam a remoção

predominante de lignina e hemicelulose, gerando polpas adequadas aos processos de fabricação de derivados de celulose (polpa de dissolução). Já os processos conduzidos em meio alcalino e neutro promovem a remoção predominante de lignina, retendo parte expressiva da hemicelulose e integralmente a celulose. Na indústria de polpas celulósicas, estes processos também são empregados na preparação de polpas quimiotermomecânicas destinadas à fabricação de papéis de embalagens, de impressão e absorventes (SJOSTROM, 1993).

O agente de deslignificação no processo sulfito é formado no equilíbrio de dissolução do gás SO_2 em água ou solução alcalina ($\text{SO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{SO}_3$) e a subsequente ionização do H_2SO_3 . As proporções destas espécies dependem dos pKas do H_2SO_3 e, obviamente, do pH do licor de cozimento. Assim, em $\text{pH} < 2$, observa-se maior concentração de SO_2 no meio, enquanto que em pH entre 2 e 7, há predominância de íons bissulfito (HSO_3^-). Já em $\text{pH} > 7$ há predominância dos íons sulfito (SO_3^{2-}) (SJOSTROM, 1993).

Os processos sulfito ácido (pH 2-5) e sulfito “neutro” (pH 5-7) são similares no que diz respeito à reação com lignina, pois dependem da eliminação do substituinte oxigenado do carbono alfa e a formação do íon carbônio que é estabilizado por ressonância conforme mostra a Figura 5a. A este íon carbônio ocorre a adição dos íons bissulfito (HSO_3^-), sulfonando, desta forma, a molécula de lignina. A formação do íon carbônio gera a possibilidade da ocorrência de reações de condensação entre o íon carbônio e outro núcleo aromático conforme ilustrado na Figura 5b para a condensação no carbono da posição 6 do anel aromático (MATSUSHITA, 2015). Os métodos sulfito ácido e neutro diferem na preservação da hemicelulose, sendo que em sulfito ácido ocorre hidrólise mais expressiva da hemicelulose, enquanto que em sulfito neutro a hemicelulose é melhor preservada.

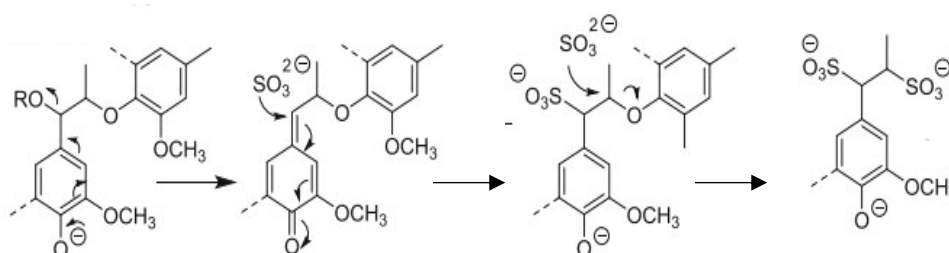
Figura 5 – (a) Mecanismo de sulfonação da lignina pelo processo sulfito ácido e neutro; e b) mecanismo de condensação que ocorre em meio ácido.



Fonte: Matsushita, (2015).

O processo sulfito-alcalino (pH 9-13) depende da desprotonação dos grupos OH fenólicos da lignina, cuja estrutura está pouco disponível na macromolécula. A desprotonação do OH fenólico resulta na formação da metileno quinona com eliminação do substituinte ligado originalmente ao carbono α . Em sequência, ocorre a sulfonação da metileno quinona. Em condições mais severas, ocorre a quebra das ligações β -O-aryl, conforme ilustrado na Figura 6. Em toda faixa de pH mencionada ocorre a solubilização de parte da lignina para o licor de reação decorrente da sulfonação/degradação e consequente aumento de solubilidade em água (GELLERSTEDT, 2009).

Figura 6 – Mecanismo de sulfonação da lignina pelo processo sulfito-alcalino.



Fonte: Matsushita, (2015).

O processo sulfito tem sido relativamente pouco estudado como ferramenta de pré-tratamento de biomassa para posterior hidrólise enzimática. A principal aplicação deste processo tem origem na fabricação de celulose e papel que remonta à 1840 (LIU; WANG; WOLCOTT, 2017). Com o desenvolvimento do processo Kraft (que emprega sulfeto de sódio como agente deslignificante) no início de 1900, o processo sulfito perdeu importância na fabricação de celulose e papel, mas se mantém útil para a produção de polpas de dissolução (celulose livre de lignina e hemicelulose) (GELLERSTEDT, 2009). Já o emprego de sulfito-alcalino em processos de polpação quimiotermodinâmica e polpação semi-

química tem aplicação industrial relevante, pois o processo é muito seletivo para a remoção de até 50% da lignina, perdendo seletividade para níveis de deslignificação superiores a 50% (FENGEL; WEGNER, 1989).

A aplicação do processo sulfito como etapa de pré-tratamento para posterior digestão enzimática do material pré-tratado foi desenvolvido de forma mais extensa quase que simultaneamente por dois grupos de pesquisa (ZHU *et al.*, 2009; MENDES *et al.*, 2011).

O uso de sulfito ácido para o pré-tratamento de madeira foi originalmente denominado SPORL (*Sulfite Pretreatment to Overcome Recalcitrance of Lignocellulose*) e mostrou eficiência expressiva para aumentar a digestibilidade da celulose (e da hemicelulose residual) dos materiais pré-tratados (conversões de glucanas da ordem de 90% em 96 h de hidrólise enzimática) (ZHU *et al.*, 2009; ZHOU *et al.*, 2016). A redução da recalcitrância do substrato foi atribuída à combinação de diferentes efeitos. Entre eles destaca-se a dissolução parcial da hemicelulose, a despolimerização da celulose, a deslignificação, além da sulfonação parcial da lignina residual contida no material pré-tratado. Como consequência destas transformações, o material pré-tratado sofre aumento da área superficial que também decorre do processo de fibrilação mecânica associado ao pré-tratamento (ZHOU *et al.*, 2016). Note-se que o processo de pré-tratamento originalmente desenvolvido com sulfito ácido é muito similar aos processos de polpação semi-química que contam com duas etapas: cozimento e posterior refinamento mecânico. Apesar da alta eficiência deste pré-tratamento, este processo gera produtos de degradação de açúcares decorrente da condição ácida, além da necessidade de temperaturas elevadas na etapa de cozimento quando o material pré-tratado é madeira (LIU; WANG; WOLCOTT, 2017).

O uso de sulfito-alcálico como pré-tratamento de bagaço de cana foi descrito inicialmente no trabalho de Mendes *et al.* (2011). Um trabalho posterior avançou na descrição das alterações físico-químicas infringidas ao bagaço de cana que permitiam o aumento de digestibilidade do material pré-tratado (MENDES *et al.*, 2013). Em síntese, os dois estudos mostraram os efeitos do processo quimiotermodinâmico utilizando sulfito-alcálico em cana de açúcar onde, através da microscopia ótica e eletrônica, identificaram-se alterações físicas na fibra, resultantes da remoção parcial de lignina e hemicelulose. Além disso, os autores observaram que houve um inchamento das fibras e aumento da capacidade de retenção de água, características estas que resultaram em um aumento na conversão dos polissacarídeos na etapa de hidrólise enzimática.

Laurito-Friend *et al.* (2015) estudaram o processo quimiotermodinâmico utilizando sulfito-alcálico com diferentes cargas de sulfito (5, 7,5 e 10%) em híbridos de cana de açúcar

com teores variados de lignina. Neste trabalho ficou demonstrado que o aumento de carga de sulfito leva a uma maior solubilização de lignina, mas também a uma maior perda de hemicelulose. Neste sentido, fica evidenciado que o tempo de reação e a concentração de reagentes podem ser ajustados dependendo da concentração inicial de lignina do material durante a etapa de pré-tratamento.

Mendes *et al.* (2015) estudaram o efeito do processo quimiotermomecânico utilizando sulfito-alcálico sobre a superfície das fibras do bagaço de cana. Foi possível verificar estruturas das paredes celulares colapsadas após o pré-tratamento e a simultânea diminuição da cobertura da superfície externa das fibras por lignina, aumentando a fração de polissacarídeos acessíveis às enzimas nestas superfícies externas. Os componentes inorgânicos, como cálcio e magnésio foram removidos e parcialmente redistribuídos sobre as superfícies das fibras. Estes resultados indicaram que a lignina foi dissolvida durante o pré-tratamento, enquanto as hemiceluloses ficaram mais expostas ou reposicionadas no material pré-tratado.

Mesquita *et al.* (2015) estudaram a fermentação alcoólica de hidrolisados enzimáticos preparados a partir de bagaço de cana pré-tratado por sulfito-alcálico e observaram que cargas crescentes de sulfito (entre 4 e 8%) levaram a um melhor rendimento de etanol ao final do processo. Em um dos experimentos adicionaram surfactantes *tween* 20 e *tween* 80, evidenciando que ao utilizar o surfactante *tween* 20 há uma melhora na hidrólise enzimática.

Mendes *et al.* (2016) estudaram o efeito do pré-tratamento sulfito-alcálico sobre diferentes frações do caule da cana de açúcar. Foi possível verificar que a digestão enzimática foi criticamente afetada, dependendo da região do entrenó e do híbrido de cana de açúcar. As frações mais externas do caule da cana de açúcar foram significativamente mais recalcitrantes do que as outras regiões do entrenó, independente do híbrido de cana estudado. Neste sentido, concluiu-se que as frações externas do caule que são pobres em sacarose poderiam ser removidas e usadas, por exemplo, para a queima e geração de vapor/eletricidade, enquanto que o restante da cana poderia então ser processado, exigindo menos energia no processo de extração de sacarose, fornecendo um bagaço mais adequado para o pré-tratamento e subsequente hidrólise enzimática. Esta hipótese foi posteriormente confirmada no estudo de Sartori *et al.* (2019).

Siqueira *et al.* (2017) demonstraram que no pré-tratamento sulfito-alcálico, a lignina residual se torna mais hidrofílica devido a incorporação de íons sulfito, promovendo o inchamento das fibras e aumentando a porosidade da parede celular. Esta característica da

lignina residual também diminui significativamente sua capacidade de adsorção de celulases, o que implica em menores perdas de eficiência de hidrólise de polissacarídeos por adsorção improdutiva das enzimas. MODIFICAR TEXTO..

Reinoso *et al.* (2018) estudaram o comportamento dos ácidos hidroxicinâmicos e estrutura da hemicelulose residual após o pré-tratamento de bagaço de cana com sulfito-alcalino. O pré-tratamento removeu 38% da lignina e 20,6% da hemicelulose. Os grupos acetil foram extensivamente removidos (97%) e 40% dos ácidos hidroxicinâmicos permaneceram na amostra mesmo quando se aplicou a maior carga de sulfito-alcalino (5% NaOH / 10% Na₂SO₃). Os resultados indicaram que uma fração de ácidos hidroxicinâmicos era inacessível ao licor alcalino e/ou que suas ligações éster eram clivadas, mas eles permaneceram ligados fisicamente à lignina residual.

Mendes *et al.* (2018) avaliaram a integração de uma biorrefinaria de segunda geração que utiliza processo sulfito-alcalino a uma biorrefinaria autônoma de primeira geração (produzindo etanol e eletricidade). Os resultados das análises indicaram que altas cargas de sulfito de sódio foram úteis para aumentar a produção de etanol na biorrefinaria 1G2G. No entanto, o custo do sulfito de sódio foi relevante no custo final do etanol 1G2G a ponto de gerar baixas taxas de retorno de investimento (TIR) para a biorrefinaria proposta quando os custos de sulfito ultrapassavam cerca de 0.3 USD/kg.

Estudos recentes empregando sulfito-alcalino também foram estendidos para outros substratos e condições de processo mais severas em bagaço de cana. Wang *et al.* (2018) estudaram a utilização do pré-tratamento sulfito-alcalino nas condições de 5% NaOH/20% Na₂SO₃ e temperatura de reação de 120 °C em um híbrido de *Pennisetum* (gramínea). Nesse estudo foi observado que o processo sulfito-alcalino acarretou em extensa remoção de lignina, de modo a proporcionar 91% de conversão da celulose do material pré-tratado, mesmo empregando baixa carga de celulases na etapa de digestão enzimática (5 FPU/g). Tavares *et al.* (2018) estudaram a utilização do pré-tratamento sulfito-alcalino em bagaço de cana, comparando diferentes cargas de sulfito (5-10%), temperaturas (140-160 °C) e tempos de tratamento (30-60 min). Observou-se que o tratamento com 10% de sulfito, 150° C e 45 min ocasionou a remoção de 77,2% de lignina e proporcionou uma conversão de celulose e xilana do material pré-tratado de 79,9% e 70,7%, respectivamente.

A limitação econômica do processo sulfito como etapa de pré-tratamento, apontada por Mendes *et al.* (2018) para bagaço de cana, também foi descrita para processos aplicados a outras biomassas, como por exemplo madeira de coníferas (CAVKA *et al.*, 2015). Estes autores observaram que a utilização de sulfito de sódio no processo poderia ser

justificada economicamente pela redução da carga enzimática na etapa de hidrólise enzimática posterior.

Buscando superar as limitações econômicas do emprego do pré-tratamento com sulfito-alcálico, há trabalhos que estudaram a integração da recuperação de lignosulfonatos à biorrefinaria de biomassas. Zhou *et al.* (2016) estudaram o processo SPORL em escala piloto utilizando resíduos de *Pinus* como biomassa e obtiveram eficiente conversão das frações de polissacarídeos em etanol, além de integrar a obtenção de lignosulfonato no processo. Apesar de o lignosulfonato produzido apresentar baixa massa molar, possuía grau de sulfonação similar ao de lignosulfonatos comerciais e foram indicados como passíveis de comercialização.

Huang *et al.* (2016) estudaram um novo processo que inclui a sulfometilação dos resíduos de hidrólise de madeira dura para produção de lignosulfonatos, demonstrando que a inclusão desta etapa poderia melhorar a viabilidade do processo. Du *et al.* (2017) estudaram a integração de processo utilizando madeira de conífera no qual, além de açúcares monoméricos, foram produzidos lignosulfonatos e celulose nanocristalina como forma de melhorar a viabilidade do processo.

2.4 Lignosulfonatos

Os lignosulfonatos são produzidos industrialmente como subprodutos dos processos de polpação sulfito (GELLERSTEDT, 2009; MATSUSHITA, 2015). Os lignosulfonatos correspondem a moléculas de lignina funcionalizadas nos carbonos α e eventualmente nos carbonos β com o grupo sulfônico (SO_3^{-2}) e apresentam, portanto, enxofre em sua composição (ARO; FATEHI, 2017; BAJWA *et al.*, 2019). São surfactantes aniônicos de natureza anfifílica, uma vez que apresentam grupos sulfônicos polares e estruturas aromáticas hidrofóbicas (GAO *et al.*, 2020). Os lignosulfonatos são solúveis em água e soluções de pH ácido devido ao baixo pKa dos grupos sulfônicos ($\text{pKa} \leq 2$), além de serem solúveis em solventes orgânicos polares. Myrvold (2008) propôs que em soluções aquosas, as moléculas de lignosulfonato formam uma esfera (similar a uma micela) com os grupos sulfônicos na superfície.

A estrutura e forma geral dos lignosulfonatos não é bem estabelecida, assim como da lignina (MATSUSHITA, 2015). A Figura 7 ilustra um modelo de estrutura de lignosulfonato de sódio.

Figura 7 – Modelo de estrutura genérica do lignosulfonato de sódio.



Fonte: Zhu *et al.*, 2022.

As ligninas obtidas por processos sulfito normalmente apresentam maior massa molar e maior dispersibilidade do que a lignina Kraft e sofrem influência das condições do processo seja ele ácido, neutro ou alcalino (ZAKZESKI *et al.*, 2010; MATSUSHITA, 2015). Os lignosulfonatos oriundos de folhosas apresentam massa molar menor do que os lignosulfonatos produzidos a partir de madeira de coníferas, possivelmente devido a lignina de coníferas sofrerem mais reações de condensação em meio ácido (Figura 5) (MATSUSHITA, 2015).

A determinação de massa molar absoluta em ligninas/lignosulfonatos não é trivial, pois segundo Lin e Dence (1992) é comum que ligninas apresentem o fenômeno de agregação entre moléculas, além de eventualmente apresentarem carga em pontos eventuais de sua estrutura. Esses problemas podem ser parcialmente compensados com a derivatização da lignina por acetilação ou metilação. No entanto, estas técnicas de derivatização nem sempre são quantitativas e introduzem alterações nas massas molares obtidas (TOLBERT *et al.*, 2014).

A forma mais tradicional de determinar a distribuição de massas molares de amostras de lignina/lignosulfonatos envolve o emprego de cromatografia de permeação em gel. Nesta técnica, as massas molares absolutas de cada material são estimadas com base na calibração do sistema cromatográfico com polímeros lineares como o poliestireno em sistemas de solventes orgânicos ou poliestireno sulfonato (PS) e polietileno glicol (PEG) em sistemas de solventes aquosos. A diferença macro-estrutural entre os padrões de calibração e as moléculas de lignina/lignosulfonatos acarretam em determinações de massas molares relativas e muitas vezes diferentes dos valores absolutos (ZINOVYEV *et al.*, 2018). Além

das dificuldades de calibrações adequadas do sistema cromatográfico, outra característica da lignina/lignosulfonatos é que apresentam características de moléculas polirramificadas, o que culmina em determinação de massas molares super ou sub-estimadas dependendo da heterogeneidade das ramificações (LEDO *et al.*, 2008; TOLBERT *et al.*, 2014; ZINOVYEV *et al.*, 2018).

Os licores de polpação sulfito contém, além dos lignosulfonatos em concentrações relativamente baixas, também outros componentes removidos da biomassa, o que demanda etapas de concentração e purificação a fim de agregar valor ao produto final (ARO; FATEHI, 2017). Há diferentes formas de purificação de lignosulfonatos. Uma delas envolve o método de Howard, no qual o licor de polpação sulfito é tratado com CaO até atingir pH 8,5, resultando na precipitação inicial de parte do sulfito residual na forma de sulfito de cálcio (CaSO₃). Em seguida, o licor é alcalinizado até pH >12 onde então o lignosulfonato de cálcio se torna insolúvel e pode ser filtrado do licor. A recuperação de lignosulfonato através do método de Howard pode atingir até 95%. Outro processo de recuperação e purificação é o método Pekilo no qual o licor do processo de polpação sulfito ácido é inicialmente fermentado pelo fungo filamentosos *Paecilomyces variot* a fim de remover os açúcares presentes. O licor livre de açúcares é então submetido a ultrafiltração para purificação do lignosulfonato com recuperação superior a 90% (ARO; FATEHI, 2017).

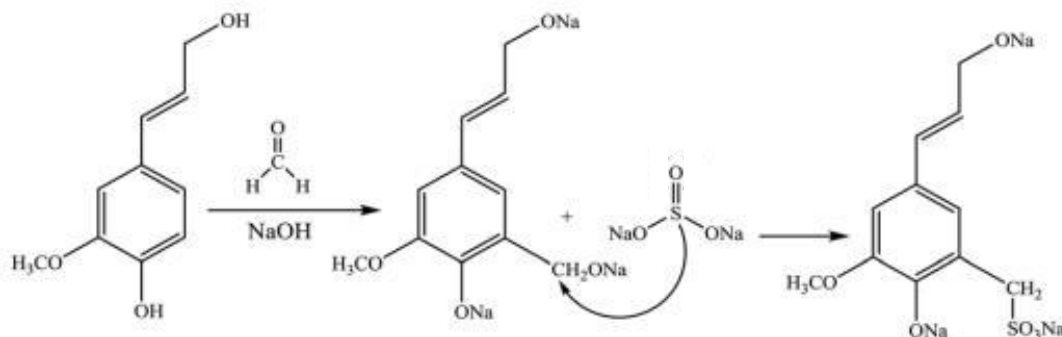
O método comercialmente utilizado atualmente para a purificação de lignosulfonatos é a ultrafiltração, pois permite uma purificação mais efetiva devido à diferença de massa molar entre os lignosulfonatos e outros componentes do licor (BHATTACHARYAA *et al.*, 2005; HUMPERT; EBRAHIMI; CZERMAK, 2015). A Borregaard LignoTech (Noruega) possui uma planta industrial de ultrafiltração para concentração de lignosulfonato operando desde 1981. Esta planta permite a produção de um licor concentrado enriquecido em lignosulfonato com aproximadamente 95% de pureza e somente baixas porcentagens de açúcares e sais (FERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2015).

Um derivado de lignina semelhante ao lignosulfonato é a lignina sulfometilada, que é solúvel em água e possui aplicabilidade semelhante à dos lignosulfonatos. De fato, tem havido um aumento no número de estudos e no desenvolvimento tecnológico com foco na sulfometilação de ligninas técnicas (Kraft e organosolve) para busca atender a demanda do mercado por ligninas solúveis em água com propriedades similares às dos lignosulfonatos (HE; ZHANG; FATEHI, 2015; KONDURI; FATEHI, 2015, DERUMER *et al.*, 2021).

A reação de sulfometilação introduz um grupo metileno sulfonato (-CH₂SO₃) no anel aromático da lignina. Esta reação prossegue inicialmente por substituição eletrofílica

em condições alcalinas onde o anel aromático da lignina reage com formaldeído. Em seguida, ocorre a sulfonação deste intermediário por eliminação de água (Figura 8) (KONDURI; FATEHI, 2015; KAZZAZ; FEIZI, FATEHI, 2019; DEMUNER *et al.*, 2021).

Figura 8 – Ilustração de reações de sulfometilação de uma unidade fenilpropanóide.



Fonte: Kazzaz; Feizi; Fatehi, (2019).

2.4.1 O mercado atual de lignina e lignosulfonato

Há um grande interesse em aproveitar a fração de lignina dos materiais lignocelulósicos. Pesquisas para o melhor aproveitamento desta fração vêm sendo desenvolvidas há décadas e atualmente há uma série de publicações que apontam para desenhos de biorrefinarias onde a lignina seria o principal componente a ser utilizado (“*lignin first biorefineries*”) (NANDAL; ARORA; VIRMANI, 2021; GIRALDO; TORO; ALZATE, 2021). Os fatores que influenciam positivamente o emprego da lignina são: alta disponibilidade, alto poder calorífico e uma fonte sustentável de compostos fenólicos e aromáticos. No entanto, devido há sua estrutura não uniforme e altamente complexa sua atual utilização por parte da indústria ainda é limitada (VISHTAL; KRASLAWSKI, 2011; BAJWA *et al.*, 2019; GIRALDO; TORO; ALZATE, 2021).

Apesar das dificuldades de se utilizar a lignina, algumas empresas como Borregaard LignoTech, MeadWestvaco Corporation, Tembec Inc., Domtar Corporation, Domsjö Fabriker AB, Changzhou Shanfeng Chemical Industry Co. Ltd, Nippon Paper Industries Co. Ltd., UPMKymmene Corporation, Asian Lignin Manufacturing Pvt. Ltd., Lignol Energy Corporation, Green Value e Liquid Lignin Company (LLC) investem em pesquisa e desenvolvimento de novos produtos oriundos da lignina (MANDLEKAR *et al.*, 2018). No Brasil empresas como a Suzano e a Klabin estão investindo na valorização da lignina Kraft (IEA, 2021).

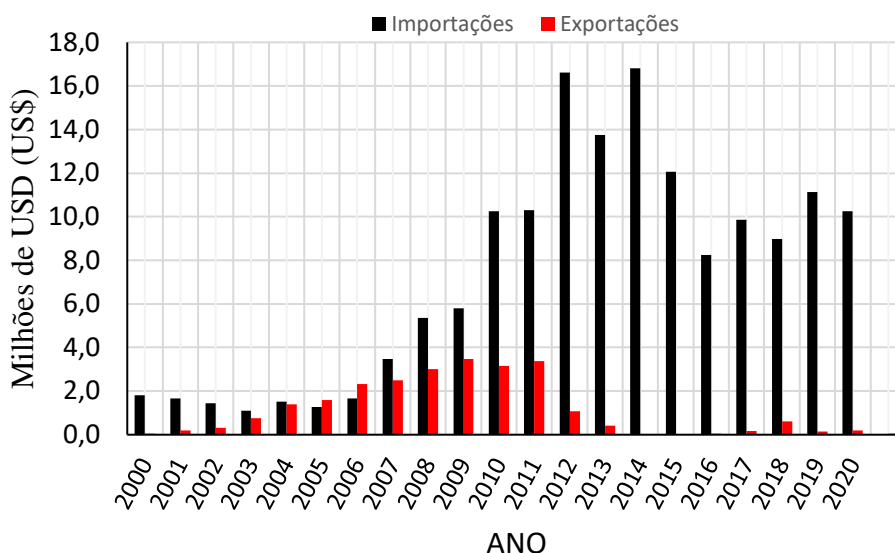
A produção mundial de lignina é estimada em 100 milhões de toneladas/ano, sendo que essencialmente se trata de ligninas técnicas contidas em licores da indústria de polpa celulósica (DESSBESELL *et al.*, 2020). Aproximadamente 98% desta lignina é queimada após concentração dos licores Kraft, pois esta apresenta alto poder calorífico, permitindo que as indústrias de polpa celulósica que operam com o processo Kraft gerem vapor e energia elétrica suficiente para o processo industrial, além de viabilizar a recuperação de reagentes químicos (Na_2S e NaOH) essenciais para viabilizar economicamente o processo industrial (GELLERSTEDT, 2009; BAJWA *et al.*, 2019). Apesar do uso integrado à produção de polpas celulósicas, a lignina Kraft disponível para comercialização aumentou 150% de 2014 a 2018 (DESSBESELL *et al.*, 2020).

A quantidade de lignosulfonatos comercialmente disponível para aplicações diversas foi da ordem de 1,315 milhões de toneladas em estimativa de 2018 reportada por DESSBESELL *et al.* (2020). O valor de mercado destes lignosulfonatos é da ordem de 180 a 520 USD/ton, dependendo do grau de pureza (HODÁSOVÁ *et al.*, 2015; BAJWA *et al.*, 2019; DESSBESELL *et al.*, 2020).

Os dois maiores produtores de lignosulfonatos atualmente são Borregaard LignoTech (Noruega) e Tembec (Canadá). A Borregaard LignoTech tem uma produção anual de 500.000 toneladas de lignosulfonatos enquanto a Tembec produz 57.000 toneladas/ano. Outras empresas produzem quantidades muito inferiores de lignosulfonato como a DomsjoFabriker (Suécia), Nippon (Japão) e La Rochette Venizel (França) (TRIBOT *et al.*, 2019).

O Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior, denominado COMEX STAT, vinculado ao Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços (MDICS), permitiu verificar que, no Brasil, o mercado de lignosulfonatos seguiu as características ilustradas na Figura 9 (NCM 3804.00.20). É possível observar que, nos 20 anos analisados, somente em 2005 e 2006 a balança comercial para lignosulfonatos foi positiva, demonstrando que o Brasil é dependente de fornecedores externos para lignosulfonatos. Ainda de acordo com os dados do COMEX STAT, os principais países exportadores de lignosulfonatos para o Brasil no ano de 2020 foram África do Sul, Noruega, Estados Unidos e Alemanha, respondendo por cerca de 82% do total das importações brasileiras, cerca de 10 milhões de dólares no ano de 2020. Até setembro de 2021 já foram importados cerca de 13 milhões de dólares em lignosulfonatos.

Figura 9 – Balança comercial brasileira para lignosulfonatos referentes aos anos de 2000 a 2020.



Fonte: Autoria Própria.

2.5 Aplicações de lignosulfonatos

Atualmente, o maior consumidor de lignosulfonato é a indústria de concreto devido às capacidades plastificantes e de reduzir a demanda por água atribuídas aos lignosulfonatos. Trata-se de uma aplicação de baixo valor agregado, visto que mesmo lignosulfonatos com baixa pureza, podem ser empregados com resultados adequados para a melhoria da qualidade do concreto. Por outro lado, lignosulfonatos de maior grau de pureza que apresentam maior valor agregado têm demonstrado melhor desempenho como aditivo de concreto (ARO; FATEHI, 2017; TOPÇU; ATEŞIN, 2016). A ação de reduzir o teor de água no concreto está relacionada com a capacidade dos lignosulfonatos de melhorar a dispersão dos flocos de cimento em finas partículas (ARO; FATEHI, 2017; TOPÇU; ATEŞIN, 2016). Supõe-se que isso ocorra em função das forças de repulsão eletrostática e impedimento estérico resultantes da interação entre o lignosulfonato e as partículas do cimento (COLOMBO *et al.*, 2017). A capacidade dispersante do lignosulfonato também pode ser utilizada para uso em perfuração de poços de petróleo e dispersante em tintas (ARO; FATEHI, 2017).

Gao *et al.* (2020) estudaram a utilização de lignosulfonatos para aumentar a estabilidade de armazenamento de resinas ureia-formaldeído (UF). Foi observado que o lignosulfonato pode aumentar a repulsão eletrostática de resinas UF evitando desta forma seu envelhecimento. O estudo demonstrou que a estabilidade de armazenamento que era de

apenas 30 dias foi para 200 dias com a adição de lignosulfonato à resina, sem alterar as propriedades adesivas finais do material.

O lignosulfonato pode ser utilizado como aglutinante em diversas aplicações como na produção de briquetes de carvão, madeira ou materiais cerâmicos, ou para peletização de ração animal (SHIMIT *et al.*, 2004; BAJWA *et al.*, 2019). Seu uso se deve ao fato de aumentar a taxa de peletização em até 20 %, redução da energia requerida para a produção dos pellets/briquetes, redução de finos durante a produção, uniformização e estabilização dos pellets, além de ser atóxico (SHIMIT *et al.*, 2004).

A capacidade aglutinante do lignosulfonato também pode ser utilizada para suprimir a poeira em estradas e construções, além de ser um bom agente estabilizador do solo (ARO; FATEHI, 2017; TA'NEGONBADI; NOORZAD, 2017; SINGH; SAHOO, 2021).

Uma possível aplicação para lignosulfonatos é sua utilização como complexante de metais pesados, sendo uma alternativa ao uso de carvão ativado que, apesar de mais eficaz, tem custo muito elevado. A capacidade quelante do lignosulfonato para íons metálicos é atribuída à basicidade dos grupos que contém oxigênio e enxofre, tais como grupos hidroxila, carbonila, carboxila e sulfônicos (ARO, FATEHI, 2017; LIU *et al.*, 2019).

Zhang *et al.* (2021) utilizaram uma blenda de quitosana/lignosulfonato para adsorção de Pb (II) onde observaram que o processo de adsorção de quitosana / lignosulfonato é do tipo adsorção eletrostática. Além disso, o adsorvente de quitosana / lignosulfonato passou por 5 ciclos de regeneração e a eficiência de remoção de Pb (II) ainda atingia 92% ao final do processo.

Chen *et al.* (2021) utilizaram o lignosulfonato de sódio na flotação dos minérios calcopirita e galena e demonstraram que seu uso é eficiente. O diferencial deste trabalho foi a utilização de peróxido de hidrogênio e lignosulfonato para flotação seletiva dos minérios calcopirita e galena, sendo que ficou evidenciado que a utilização de lignosulfonato oxidado pode remover o mineral galena completamente do meio, mas tem um efeito de flotação fraco na calcopirita, o que proporcionou uma forma eficiente de separação destes minerais.

Vinardell, Ugartondo e Mitjans (2008) observaram que o lignosulfonato apresenta capacidade antioxidante e não é irritante a pele e olhos, o que lhe confere potencial uso em produtos cosméticos. Lorquin *et al.* (2021) utilizaram lignosulfonato na formulação de protetor solar, onde 5 % de lignosulfonato pode ser utilizado sem alterar as características da emulsão, garantindo sua estabilidade, propriedade antioxidante e não toxicidade do produto formulado. Os lignosulfonatos também podem ser usados para o desenvolvimento

de drogas para estimular o sistema imunológico (MARTÍNEZ; MITJANS; VINARDELL, 2012; ARO; FATEHI, 2017).

Uma outra aplicação de lignina/lignosulfonato é utilização em adesivos de madeira e fibras lignocelulosicas. Neste contexto a lignina/lignosulfonatos podem ser utilizados em substituição ao fenol oriundo da indústria de petróleo (HU *et al.*, 2013; KALAMI *et al.*, 2017). Hu *et al.* (2013) demonstraram que é possível substituir 30% do fenol por lignosulfonatos oxidados na preparação de resinas fenol/formaldeído do tipo resol. Os resultados demonstraram que a resina resultante mantém as propriedades adesivas da resina com 100% de fenol.

Em resinas tipo epóxi há vários compostos sendo estudados em substituição ao bisfenol A (BPA), como óleos vegetais (SHAH; AHMAD, 2012), eugenol (KAUFMAN, 2015), taninos (AOUF *et al.*, 2014), catecol (ZHAO; ABU-OMAR, 2019) e lignina (ZHANG *et al.*, 2020). Dentre esses recursos renováveis, a lignina e/ou os lignosulfonatos são candidatos promissores para a produção de resina epóxi devido à sua estrutura de rede tridimensional, grande massa molar e estrutura química com grupos que se assemelham ao bisfenol A (YAMINI *et al.*, 2019).

Yamini *et al.* (2018) estudaram a utilização de lignosulfonatos na preparação de resinas epóxi. Para tal procedimento, os autores realizaram reação do lignosulfonato com formaldeído e subsequente epoxidação e posterior reticulação com trietilenotetramina. Os resultados demonstram que 20 % do BPA pode ser substituído por lignosulfonatos sem alteração do módulo de Young (medida de rigidez de tração ou compressão).

3 OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo estudar um novo modelo de biorrefinaria que emprega pré-tratamento sulfito-alcálico do bagaço-de-cana para a geração de monossacarídeos associada à produção de lignosulfonatos.

Para atingir este objetivo, foram propostas e desenvolvidas as seguintes etapas:

- Produção de bagaço de cana pré-tratado pelo processo sulfito-alcálico simulando condições industriais de polpação quimiotermomecânica, empregando escala ampliada a 1200 g/batelada;
- Caracterização do licor de pré-tratamento sulfito-alcálico;
- Ampliação de escala de hidrólise enzimática do material pré-tratado para 800 g/batelada, avaliando o balanço de massa de todos os componentes do bagaço de cana;
- Utilização do licor de pré-tratamento como agente de sulfonação da lignina residual do processo de hidrólise enzimática;
- Purificação e caracterização dos lignosulfonatos obtidos.

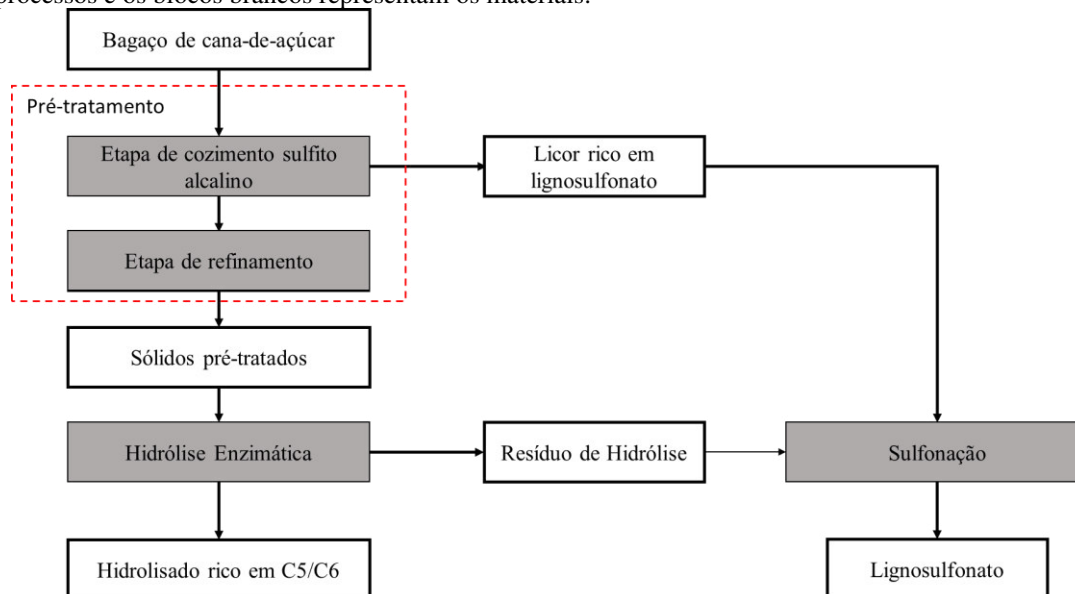
4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Bagaço de cana de açúcar e fluxograma geral dos experimentos

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado neste trabalho foi proveniente da safra de 2016-2017 e cedido pela usina Zilor, unidade Quatá, SP (22° 14' 51" S; 50° 41' 54" W). O bagaço recebido foi seco ao ar até cerca de 10% de umidade, ensacado e estocado em temperatura ambiente até a sua utilização.

O fluxograma geral empregado nos experimentos que foram desenvolvidos nesta tese está ilustrado na Figura 10. O detalhamento das metodologias aplicadas em cada etapa encontra-se descrito nos próximos tópicos.

Figura 10 – Fluxograma geral de atividades desenvolvidas no presente estudo. Os blocos cinzas representam os processos e os blocos brancos representam os materiais.



Fonte: Autoria Própria.

4.2 Pré-tratamento do bagaço de cana com sulfito-alcalino

O processo de pré-tratamento de bagaço de cana com sulfito-alcalino desenvolvido em trabalhos anteriores (MENDES *et al.*, 2011; REINOSO *et al.*, 2018) foi avaliado em escala ampliada, envolvendo o uso de 1200 g de bagaço de cana (base seca) por batelada experimental. O bagaço foi inicialmente acondicionado em um reator de aço inoxidável dotado de tampa de nylon com conexões que permitem a aplicação de vácuo e o deslocamento simultâneo de licor para o interior do reator. Após a adição do bagaço de cana, o reator foi fechado e submetido à vácuo por 30 min através de uma entrada específica ligada à tampa do reator. Após este tempo, o licor de pré-tratamento foi deslocado para o interior

do reator e realizada a impregnação à vácuo por 15 min adicionais. O licor em questão correspondeu a 12 L de água contendo sulfito de sódio e hidróxido de sódio suficientes para uma carga de 7,5% de Na_2SO_3 e 3,75% de NaOH expressos com base na massa de bagaço seco. O reator foi transferido para uma autoclave e a digestão da biomassa foi realizada a 127 °C por 2 h (tempo medido após a autoclave atingir 127 °C). Após a digestão, os sólidos pré-tratados foram separados do licor de reação por centrifugação contra malha porosa de 200 *mesh* (tecido de algodão). O líquido (licor negro) foi coletado e resfriado à temperatura ambiente. O líquido recebeu borbulhamento de N_2 por 15 min para remoção de oxigênio dissolvido, selado em frasco plástico e armazenado em refrigerador até o momento do reuso. Os sólidos pré-tratados foram suspensos em água pré-aquecida a 95 °C até um volume final que permitiu obter 3% de consistência no refinador REGMED MD-300 (REGMED, Brasil). O volume total de água usado foi de aproximadamente 32 L, divididos em cerca de 26 L adicionados diretamente no tanque do refinador, cerca de 4 L de água contido na biomassa pré-tratada e cerca de 2 L usados para lavagem do recipiente que continha a biomassa pré-tratada. O processo de refino se deu por circulação inicial dos 26 L de água, momento no qual foi iniciada a medida de consumo de energia pelo motor do refinador. A biomassa úmida foi progressivamente sendo adicionada ao tanque do refinador (tempo de adição de aproximadamente 5 min), seguida de adição de cerca de 2 L de água de lavagem do recipiente que continha biomassa. O refinador operou permanentemente com um espaço entre os discos de 0,1 mm até atingir um consumo total de energia de 650 kWh. Os discos do refinador foram mantidos aquecidos a 95 °C durante a operação de refino. Os sólidos resultantes foram recuperados por centrifugação e o licor de lavagem foi armazenado para caracterização química posterior. O material pré-tratado foi seco ao ar e caracterizado quanto a composição química, bem como submetido à hidrólise enzimática, conforme descrito nos itens subsequentes.

O rendimento de sólidos pré-tratados foi calculado relacionando a massa (em gramas) recuperada após pré-tratamento pela massa inicial, segundo a equação 1 (ambas as massas em base seca).

$$\text{Rendimento de sólidos}(\%) = \frac{m_F}{m_i} \times 100 \quad (1)$$

m_F = Massa após pré-tratamento(g);

m_i = Massa inicial(g).

4.3 Determinação da composição química do bagaço de cana *in natura* e dos materiais pré-tratados

4.3.1 Determinação do teor de extrativos

Três gramas (3 g) de bagaço moído (20 mesh) *in natura* foram extraídos em um extrator de Soxhlet com etanol 95% por 6 h para determinação do teor de extrativos. O teor de extrativos da amostra *in natura* foi determinado com base na diferença de massa do material seco antes e após o processo de extração. A análise foi realizada em triplicata. Amostras dos bagaços pré-tratados não foram extraídas com etanol, apenas secas ao ar e moídas (20 mesh), antes da determinação da composição de lignina e carboidratos.

4.3.2 Determinação de lignina e carboidratos

A metodologia para determinação dos teores de lignina e carboidratos baseia-se na hidrólise ácida do material, gerando um resíduo sólido e um licor hidrolisado, conforme descrito por Ferraz *et al.* (2000). Em tubos de ensaio, aproximadamente 0,3 g das amostras de bagaço foram submetidas à hidrólise ácida durante 1 h a 30 °C usando 3,0 mL de ácido sulfúrico 72% (m/m). Em seguida, a mistura foi transferida quantitativamente para frascos Erlenmeyer de 250,0 mL com adição de 79,0 mL de água destilada. O material parcialmente hidrolisado foi autoclavado a 120 °C por 1 h. Depois de resfriado, o material foi filtrado sob vácuo em filtro com placa de vidro sinterizado n° 3 (SCHOTT). O material retido foi lavado com água (cerca de 30 mL) e seco em estufa a 100 °C até que atingisse massa constante para determinação gravimétrica de lignina insolúvel. O filtrado foi avolumado com água a 200 mL em balão volumétrico. Para a determinação de lignina solúvel, uma parte do filtrado foi analisada em espectrofotômetro UV-visível a 205 nm, considerando a absorvidade molar da lignina solúvel igual a 105 L/gcm. A outra parte da fração solúvel foi filtrada em filtros SepPack C18 e analisada por cromatografia líquida (HPLC) para determinação do teor de açúcares monoméricos e ácido acético. Para a análise por HPLC foi utilizada uma coluna BioRad HPX-87H a 45 °C, acoplado a um detector de índice de refração a uma temperatura controlada de 35 °C. Ácido sulfúrico 5 mM foi empregado como fase móvel a um fluxo de 0,6 mL/min. A análise foi realizada em triplicata. Padrões dos açúcares e ácido acético de grau analítico foram empregados para o estabelecimento de uma curva de calibração externa.

4.3.3 Determinação de Cinzas

Os teores de cinzas do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e dos materiais pré-

tratados foram determinados gravimetricamente seguindo metodologia descrita por Sluiter *et al.* (2005). A análise foi realizada em triplicata, empregando-se cerca de 0,5 g de cada material (base seca), moídos a 20 mesh. A incineração foi conduzida em cadinhos de porcelana de massas conhecidas, empregando uma mufla por 4 h a 575 °C. Após o resfriamento completo dos materiais, determinaram-se suas massas secas. Calculou-se o teor de cinzas de cada amostra com base na massa do resíduo obtido relativa à massa do material seco inicial.

4.3.4 Determinação de ácidos hidroxicinâmicos

O teor de ácidos hidroxicinâmicos foi determinado no material *in natura* e pré-tratado. Foram utilizados 200 mg de amostra (massa seca) e 2 mg de antraquinona em reatores de aço inoxidável de volume total 100 mL. Ao reator foi adicionado 16,0 mL de NaOH 4,0 mol/L. Os reatores foram fechados e levados a um banho de silicone a 170 °C por 2 h. Após esse tempo, os reatores foram resfriados e a mistura acidificada para pH 2,0 com HCl 6 mol/L. O volume da suspensão foi ajustado a 100 mL em balão volumétrico que foi então mantido em repouso a 4 °C por 16 h (MASARIN *et al.*, 2011). Ao final do tempo de repouso, uma alíquota do sobrenadante foi filtrada em membrana de 0,45 µm. Para quantificação dos ácidos hidroxicinâmicos, as amostras foram analisadas por cromatografia líquida (AKTA, GE) utilizando coluna ODS Hypersyl da Thermo-Scientific, fluxo de 0,8 mL.min⁻¹ de fase móvel contendo acetonitrila:água (1:4 v/v) com 1% de ácido acético e detector UV a 315 nm. Padrões de ácido p-cumárico e ferúlico de grau analítico foram empregados para o estabelecimento de uma curva de calibração externa, conforme descrito em Masarim *et al.* (2011).

4.3.5 Caracterização do licor negro e do licor de lavagem oriundos do pré-tratamento

O teor de sólidos totais no licor negro e licor de lavagem foi determinado por gravimetria. Para isso, 100 mL de amostra foi transferido para um pesa filtro previamente tarado que foi levado a estufa inicialmente a 60 °C e posteriormente a 105 °C até a completa remoção de água.

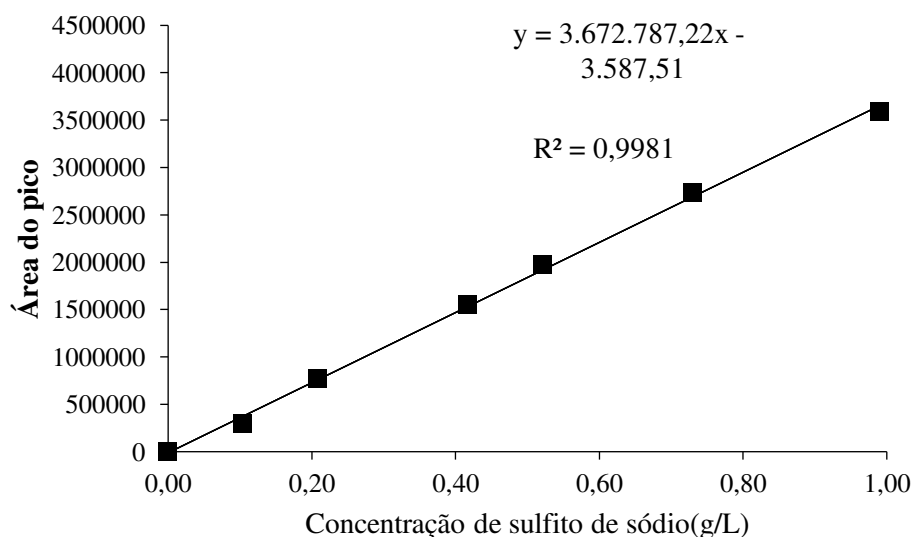
Os licores que foram submetidos à determinação de composição química foram previamente secos em rotaevaporador. Os sólidos foram analisados quanto à composição

química de forma similar ao descrito para a caracterização de biomassa lignocelulósica. O teor de cinzas dos licores foi determinado conforme descrito no item 4.3.3.

4.3.6 Determinação de sulfito residual no licor negro

Para determinação de sulfito, o licor negro foi ajustado para pH 2 e filtrado sob vácuo em filtro sinterizado n° 3 (SCHOTT), seguido de filtração em membrana de 0,45 µm. As amostras foram então diluídas 10 vezes com H₂SO₄ 5 mM. O sobrenadante foi analisado por cromatografia líquida (HPLC - Waters, modelo 2414) equipado com uma coluna BIORAD AMINEX HPX – 87H mantida a 45 °C, empregando H₂SO₄ 5 mM como fase móvel a um fluxo de 0,6 mL/min. Um detector de índice de refração foi utilizado em temperatura controlada de 35°C. A concentração de sulfito, cujo tempo de retenção foi de 12,6 min, foi determinada contra curva de calibração externa que empregou sulfito de sódio grau analítico, preparado por diluição a partir de uma solução estoque de 0,96 g/L de Na₂SO₃ dissolvido em H₂SO₄ 5 mM. As concentrações de sulfito foram calculadas usando a curva padrão apresentada na Figura 11.

Figura 11 – Curva de calibração de sulfito de sódio(g/L).



Fonte: Autoria Própria.

4.4 Ensaios de hidrólise enzimática das amostras de bagaço de cana pré-tratado

4.4.1 Hidrólise em microescala

A hidrólise enzimática foi realizada inicialmente em pequena escala em diferentes consistências de sólidos: 2% e 5% (m/v). Nestes ensaios foram utilizados,

respectivamente, 20 mg e 50 mg de bagaço de cana pré-tratado (base seca) moído a 20 mesh e suspensos em um volume final de reação de 1,0 mL de solução tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8 e 0,01% de azida sódica, contendo o preparado comercial de celulases Cellic Ctec2 (131 ± 4 FPU/mL) (Cellic CTec2 - SAE0020, SIGMA) numa carga de 10 FPU/g de sólidos (10,5 mg de proteína/g de material pré-tratado) (MACHADO *et al.*, 2020). As condições experimentais pré-estabelecidas foram agitação de 120 rpm a 45 °C por 72 h. Durante o processo de hidrólise, as reações foram amostradas em intervalos de 4, 8, 24, 48 e 72 h. Para cada etapa de amostragem, os tubos foram retirados do agitador, imersos em banho de gelo/água e centrifugados a 3400xg a 4°C por 15 min. Após a centrifugação, 20 µL de sobrenadante foram retirados e posteriormente adicionado 20 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (m/v) para a precipitação das proteínas. A suspensão foi então diluída com 360 µL de água e congelada para análise posterior. Os tubos, após amostragem, retornaram ao sistema de agitação para a continuidade do processo de hidrólise.

Prévio a análise dos açúcares as amostras diluídas foram descongeladas, agitadas e centrifugadas por 15 min a 3400xg. O sobrenadante foi analisado conforme descrito no item 4.3.2.

4.4.2 Hidrólise enzimática em maior escala

Para o estudo de sulfonação dos sólidos residuais da hidrólise enzimática foi realizado experimento de hidrólise enzimática em maior escala, utilizando o bagaço pré-tratado com o processo sulfito-alcalino. Neste caso, a hidrólise foi realizada utilizando Autoclave AU/E-20 (REGIMED, Brasil) como reator, com capacidade nominal de 23 L, velocidade de reciclo sobre eixo excêntrico de 4 rpm, a 45°C.

A hidrólise enzimática foi realizada em escala preparativa utilizando 800 g (massa seca) de material pré-tratado. A reação foi realizada de duas formas: na primeira, o material passou pelo processo de refinamento novamente para se obter uma melhor homogeneização da enzima com o substrato e então seguiu para o reator de hidrólise, gerando a amostra RHE1. Na segunda reação de hidrólise, o material não passou por processo de refinamento adicional e foi direto ao reator de hidrólise, a qual gerou a amostra RHE2.

No reator foi realizado o processo de hidrólise em batelada sendo adicionados 800 g de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado (base seca) e água para atingir uma consistência de 4% de sólidos. O pH da suspensão foi ajustado para 4,8 e a mistura foi agitada por 16 h a 45 °C para impregnação e equilíbrio da temperatura. Após este período

foi adicionado o preparado comercial de celulases Cellic Ctec2 (131 ± 4 FPU/mL) (Cellic CTec2 - SAE0020, SIGMA) numa carga de 10 FPU/g de sólidos (10.5 mg de proteína/g de materia pré-tratado) (MACHADO *et al.*, 2020). Após 72 h, os sólidos residuais foram separados do hidrolisado por filtração. O líquido foi analisado quanto ao teor de glicose, xilose, arabinose e ácido acético e os sólidos foram secos a temperatura ambiente e caracterizados quanto à composição química.

4.5 Sulfonação dos sólidos residuais de hidrólise enzimática

A etapa de sulfonação tem como objetivo o melhor aproveitamento da fração de lignina do resíduo sólido da hidrólise enzimática utilizando o licor negro como agente de sulfonação. As reações foram conduzidas em reator de aço inox 316, utilizando relação sólido-líquido 1:10, por 3 h em banho de silicone. As condições para a sulfonação foram estudadas com base em delineamento experimental 2^2 com arranjo tipo estrela, para quantificar a influência das variáveis temperatura (X_1) e adição de álcali (X_2) sobre a produção de lignosulfonatos, % de OH fenólico na fração solúvel e distribuição de massa molar dos lignosulfonatos. O delineamento foi realizado de acordo com os níveis apresentados na Tabela 3, sendo realizados 11 experimentos no total, com triplicata no ponto central.

Tabela 3 – Delineamento experimental visando o máximo teor de lignosulfonatos, % de OH fenólico e estudo da distribuição da massa molar ponderal média (M_w), tendo como variáveis temperatura (X_1) e adição de álcali (X_2).

Parâmetros	Níveis				
	$-\sqrt{2}$	-1	0	+1	$+\sqrt{2}$
Temperatura (X_1) (°C)	131,7	140	160	180	188,3
Adição de álcali (X_2) (% m/m)	2,9	5	10	15	17,1

Fonte: Autoria Própria.

Após a reação de sulfonação, os reatores foram resfriados em banho de gelo, seguido de separação sólido-líquido por filtração em filtro poroso n° 3 (SCHOTT). A fração líquida foi utilizada para quantificação de lignosulfonatos (Y_1), % de OH fenólico (Y_2) e estudo da distribuição da massa molar (Y_3).

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando o programa *Statistica* (versão 13.5), considerando como variável dependente (variável resposta) o teor de lignosulfonatos (Y_1), porcentagem de OH fenólico (Y_2) e a massa molar ponderal média em massa dos lignosulfonatos (M_w) (Y_3). Os resultados foram expressos em gráficos de Pareto e tabelas de análise de variância (ANOVA) considerando a significância mínima de $p < 0,05$.

As condições ótimas para a produção de lignosulfonatos do experimento foram determinadas pela análise dos gráficos de superfície de resposta, sendo realizados ensaios para a confirmação do modelo estatístico obtido.

4.5.1 Sulfonação dos sólidos residuais de hidrólise na condição otimizada

A sulfonação dos sólidos residuais de hidrólise enzimática foi realizada em condição otimizada e em escala ampliada em Autoclave AU/E-20 (REGIMED, Brasil) adaptada com tampa contendo 4 reatores independentes com capacidade de 1,5 L cada. As condições adotadas foram 159 °C e 13% (m/m) de adição de álcali por 3 horas. As reações foram realizadas com 50 g e 17,8 g (massa seca) e 500 mL de licor negro adicionado a cada reator, obtendo-se desta forma a relação sólido:líquido 1:10 e 1:28.

4.6 Determinação do teor de lignosulfonatos em solução

Para o presente estudo foi considerado como lignosulfonato a porção de lignina presente nos licores que não precipita após acidificação até pH 2, sendo empregada a técnica de espectroscopia UV-Vis para quantificar a lignina na fração solúvel. Para isso, cada licor foi acidificado até pH 2 utilizando solução HCl 4 mol/L. A suspensão obtida foi filtrada sob vácuo em filtro sinterizado n° 3 (SCHOTT). O filtrado teve o pH elevado a 12 com solução de NaOH 4 mol/L e submetido à leitura de absorbância em 280 nm em espectrofotômetro Evolution 201 (THERMO-SCIENTIFIC). A concentração de lignosulfonatos foi calculada considerando-se um valor de absorvidade de 16,8 L/g.cm. Esta absorvidade foi determinada a partir da fração de lignosulfonato purificado por ultrafiltração em membrana de 1 kDa (item 4.7) e seco em rotaevaporador a 45°C e posteriormente em dessecador com pentóxido de fósforo (P₂O₅) sob vácuo.

4.7 Purificação de lignosulfonatos

Os lignosulfonatos passaram por ultrafiltração contra membrana de 1kDa (Ultracel-1kDa, Millipore, USA) para purificação (remoção de sais, açúcares e produtos de degradação da biomassa que apresentem baixa massa molar) e concentração. Esta etapa foi conduzida com as amostras de licor negro e de lignosulfonato preparado na reação de sulfonação no ponto ótimo (159 °C e 13% (m/m) de adição de álcali) na condição 1:10 sólido/líquido. Um volume de 400 mL de cada amostra foi ultrafiltrado usando dispositivo de filtração Amicon (Merck, USA) e lavado com um volume total de 7 L de água (pH 2) até

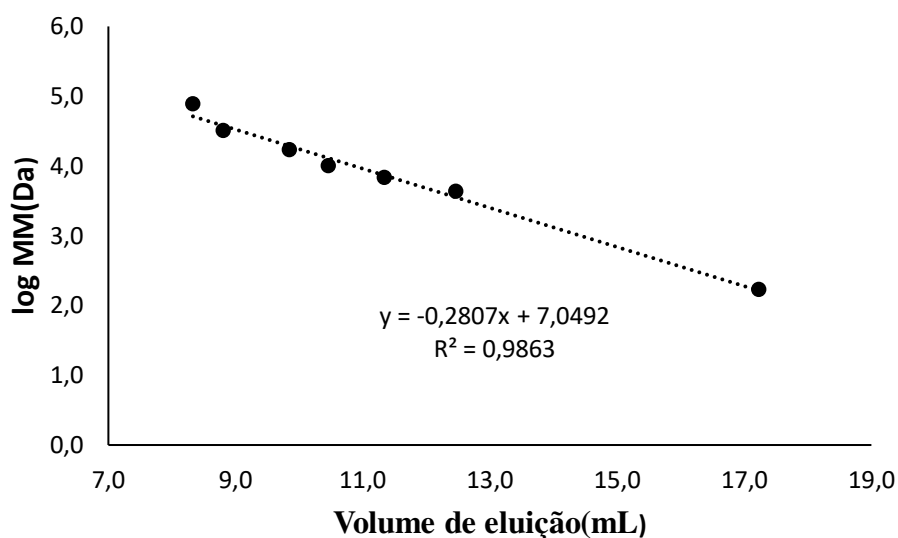
a redução/estabilização da condutividade do líquido que passava pela membrana filtrante. Ao final foi recolhido 150 mL de lignosulfonato concentrado livre de sais e de fragmentos de lignosulfonato de baixa massa molar.

4.8 Estudo das características estruturais do lignosulfonato

4.8.1 Determinação da distribuição de massa molar dos lignosulfonatos

A massa molar dos lignosulfonatos foi determinada por cromatografia de permeação em gel utilizando coluna ENrich SEC 70 (Bio rad, USA) e NaOH (0,01 mol/L) + NaCl (0,2 mol/L) como eluente. Para preparo das amostras, o pH dos licores foi ajustado para 2 utilizando HCl 4 mol/L e a suspensão foi inicialmente filtrada sob vácuo em filtro sinterizado n° 3 (SCHOTT). O pH do filtrado foi posteriormente elevado a 12 pela adição de NaOH 4 mol/L e, então, realizada diluição da amostra até que a leitura de absorvância em 280 nm desta solução atingisse o valor próximo a 0,5 u.a.. Um volume de 1 mL da solução de lignosulfonatos foi aplicado na coluna, com eluição a um fluxo de 0,6 mL/min. A coluna foi calibrada com padrões de poliestireno sulfonado (77.000, 32.000, 17.000, 10.000, 6.800, 4.300 Da ou g/mol – Sigma Aldrich, Brasil) e ácido vanílico (168,14 g/mol– Sigma Aldrich, Brasil) detectados a 254 nm. A calibração da coluna foi obtida ao graficar o log MM dos padrões versus o volume de eluição em mL conforme indicado na Figura 12.

Figura 12 – Curva padrão de cromatografia de permeação em gel (GPC) utilizado para determinação da massa molar de lignosulfonatos.



Fonte: autoria própria.

A detecção dos lignosulfonatos foi realizada por um detector UV em 280 nm. A partir dos cromatogramas obtidos foi possível estimar a massa molar média ponderada em massa (M_w) (Eq. 2) e a massa molar média ponderada em número (M_n) (Eq. 3). Com base nos valores de M_w e M_n , foi determinada a dispersibilidade (D) (Eq. 4) (GUERRA, *et al.*, 2000).

$$M_w = \frac{\sum(m_i \cdot a_i)}{\sum a_i} \quad (2)$$

$$M_n = \frac{\sum a_i}{\sum (a_i / m_i)} \quad (3)$$

$$D = \frac{M_w}{M_n} \quad (4)$$

Onde:

D = dispersibilidade;

a_i = área do cromatograma sobre uma fração “i”;

m_i = massa molar da fração “i” obtido por interpolação na curva de calibração;

M_n = massa molar média ponderada em número;

M_w = massa molar média ponderada em massa;

4.8.2 Determinação de hidroxilas fenólicas

O método utilizado foi baseado na espectroscopia UV diferencial que consiste na varredura de um espectro de uma solução de lignosulfonato em meio básico contra uma solução de mesma concentração em meio ácido. A determinação de grupos hidroxila fenólica é realizada baseando-se na absorvidade média de compostos modelos de lignina, conforme descrito por Wexler (1963). Para o preparo das amostras, o pH dos licores foram ajustados para 2 utilizando HCl 4,0 mol/L e a suspensão foi filtrada sob vácuo em filtro com placa de vidro sintetizado n° 3 (SCHOTT). A solução obtida foi então diluída e teve seu pH ajustado a 13 com NaOH 0,1 mol/L. Um branco foi realizado com a mesma diluição, porém em pH 1, ajustado pela adição de HCl 0,1 mol/L. A varredura foi realizada utilizando espectrofotômetro Evolution 201 (THERMO-SCIENTIFIC). O teor de hidroxilas fenólicas foi calculado pela equação 5.

$$\%OH_{\text{fenólico}} = \frac{(\Delta Abs_{250nm} \times 0,192)}{C_{\text{lig}}} \quad (5)$$

% OH_{fenólico}= porcentagem de hidroxilas fenólicas;

$\Delta Abs_{250\text{ nm}}$ = Absorbância da solução em 250 nm, subtraída da absorbância relativa à linha base do espectro;

0,192 = relação de porcentagem de OH fenólico por absorvidade em 250 nm (L/g.cm), determinada para vários compostos modelos de lignina e lignosulfonato (WEXLER, 1963);

C_{lig} = concentração de lignina no licor (g/L).

4.8.3 Análise na região do ultravioleta (UV) e determinação da absorvidade molar

Para determinação do coeficiente de absorvidade molar do lignosulfonato purificado foi preparado uma solução estoque de 0,98 g/L e em seguida realizado uma diluição em série com solução de NaOH 0,01 mol/L. Os valores de absorbância em 280 nm destas diferentes diluições foram determinadas em espectrofotômetro Evolution 201 (THERMO-SCIENTIFIC). A partir dos dados obtidos foi determinada a absorvidade molar que corresponde ao valor do coeficiente angular da reta formada no gráfico. Os carboidratos contidos na fração purificada foram descontados quando a absorvidade do lignosulfonato foi calculada.

Foi realizado também uma varredura em espectrofotômetro Evolution 201 (THERMO-SCIENTIFIC) na região do UV de 240 a 400 nm do lignosulfonato purificado, diluídos a 0,05 g/L em solução de NaOH 0,01 mol/L.

4.8.4 Espectroscopia de infravermelho (FTIR)

Para o estudo dos grupos funcionais na estrutura química do lignosulfonato foi realizada análise de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Os licores foram secos em rota- evaporador e posteriormente com pentóxido de fósforo (P_2O_5) sob vácuo. Foram preparadas pastilhas de KBr contendo 1% de amostra, compactadas a 8-10 kgf.cm⁻¹ sob vácuo. Os espectros foram obtidos na região de 4000 cm⁻¹ a 400 cm⁻¹, utilizando o espectrômetro modelo Spectrun One, Perkin Elmer, pela Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (CAIQ-USP).

4.8.5 Análise elementar CHN e S

Para o estudo de composição química do lignosulfonato foi realizada análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio (CHN). Amostras de licor contendo lignosulfonato foram secas em rotaevaporador e posteriormente em pentóxido de fósforo (P_2O_5) à vácuo. As análises foram realizadas em equipamento Perkin Elmer - CHN 2400, pela Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (CAIQ-USP).

O teor de enxofre nas amostras de lignosulfonatos foram determinados por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES), conforme metodologia de Oliveira *et al.* (2015). Esta análise foi realizada pela Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (CAIQ-USP). O teor de oxigênio foi determinado por diferença entre 100% menos C+H+N+S (GUTIEREZ *et al.*, 2020).

O teor de oxigênio foi calculado por diferença para 100%.

4.8.6 Ressonância Magnética Nuclear Bidimensional (RMN-2D)

A análise de RMN em duas dimensões foi realizada em colaboração com o grupo liderado pelo Dr. José Carlos del Rio do Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla, CSIC, Av. Reina Mercedes, 10, 41012 Seville, Spain. Aproximadamente 60 mg de lignosulfonato purificado seco foi dissolvido em 0,5 mL de DMSO-*d*₆ e analisados em um instrumento de RMN (Bruker AVANCE III 500 MHz), a 25 °C equipado com uma sonda de gradiente TCI de 5 mm refrigerada com geometria inversa (bobinas de prótons mais próximas da amostra). Experimentos de HSQC (*heteronuclear single quantum correlation*) utilizarão o programa de pulso do equipamento Bruker 'hsqcetgpsisp2', sendo que as larguras espectrais de 5000 Hz (de 10 a 0 ppm) e 25,063 Hz (de 200 a 0 ppm) para as dimensões ¹H e ¹³C. O pico central do solvente foi usado como referência interna (δ_C 39,5;

δH 2,49). Os sinais de correlação do HSQC foram atribuídos por comparação com a literatura (DEL RÍO et al., 2015; AYUSO-FERNÁNDEZ et al., 2019) e com padrões de lignossulfonato.

A análise semiquantitativa das integrais de volume dos sinais HSQC foi realizada para estimar as razões S/G, bem como a porcentagem de unidades de lignina sulfonada. Os sinais usados para quantificar as abundâncias relativas das unidades de lignina S e G foram $S_{2,6}$ e G_2 ; como o sinal $S_{2,6}$, envolve dois pares próton-carbono, suas integrais de volume foram reduzidas à metade. O grau de sulfonação de lignina foi estimado usando o sinal de correlação C_β/H_β de éteres α -O-4' sulfonados (AL_β) comparado com o respectivo sinal de β -O-4' não sulfonado (A_β).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado neste trabalho continha originalmente 20,3 % de lignina total, 40,2% de glucana e 26,9% de hemicelulose (21,6% de xilana, 2,1% de grupos arabinosil e 3,2% de grupos acetil) (Tabela 4). Esses valores estão em conformidade com os dados de composição química de bagaço de cana-de-açúcar reportados na literatura, que são 38-48% para celulose, 25-30% para hemiceluloses e 19-25% para lignina (MASARIN *et al.*, 2011; TAVARES *et al.*, 2018).

O pré-tratamento quimiotermodinâmico (CTMP) que utiliza sulfito-alcálico como agente deslignificante foi anteriormente desenvolvido nos trabalhos de Mendes *et al.* (2011), Laurito-Friend *et al.* (2015) e Reinoso *et al.* (2018). O presente estudo empregou uma escala ampliada de pré-tratamento, além de ter buscado simular condições experimentais mais próximas das obtidas em um processo CTMP de polpação industrial. Vale enfatizar que o processo CTMP, empregado industrialmente na fabricação de polpas celulósicas, é caracterizado pela polpação química e refinamento mecânico ocorrendo de forma concomitante e contínua a cerca de 130 °C (SJOSTROM, 1993). O processo contínuo empregado industrialmente é de difícil simulação em escala de laboratório. No entanto, é possível simular a eficiência de deslignificação e o rendimento de sólidos (MENDES *et al.*, 2011; REINOSO *et al.*, 2018) a partir de um processo em duas etapas realizado em batelada. Neste sentido, o pré-tratamento desenvolvido no presente estudo empregou uma etapa de cozimento do bagaço de cana a 127 °C na escala de 1,2 kg de bagaço e 12 L de licor de pré-tratamento (contendo 7,5% de Na₂SO₃ e 3,75% de NaOH em base a massa de bagaço seco) seguido de uma segunda etapa de refinamento mecânico a 95 °C no refinador de discos. A carga de sulfito e álcali empregada foi inferior ao anteriormente otimizado 10% de Na₂SO₃ e 5% de NaOH (LAURITO-FRIEND *et al.*, 2015) devido ao uso de um bagaço de cana originalmente com menor teor de lignina e o emprego de temperatura maior nas etapas de digestão e refino.

O material pré-tratado foi obtido com um rendimento de sólidos médio de $80,0 \pm 0,5\%$ e o processo demonstrou reprodutibilidade entre as 3 repetições em escala ampliada (Tabela 4). A composição química do material pré-tratado e o balanço de massa para os componentes do bagaço de cana-de-açúcar também estão apresentados na Tabela 4 e reforçam a reprodutibilidade entre bateladas. Em média, o pré-tratamento promoveu a remoção de $49 \pm 2\%$ da lignina e $16 \pm 1\%$ da xilana originalmente contidas no bagaço de

cana. A perda de glucana foi limitada a 9 ± 2 %. A remoção de lignina durante o pré-tratamento em questão está diretamente ligada a eficiência de sulfonação e eventual ruptura de ligações β -O-aryl, de forma que ocorra a despolimerização mais extensiva da lignina e sua consequente solubilização mais eficiente, conforme ilustrado na Figura 5 (SJOSTROM, 1993). Com relação a maior solubilização de xilana em relação a de glucana, isso deve-se a menor massa molar da xilana, maior solubilidade em meio alcalino, bem como sua estrutura amorfa (FENGEL; WEGENER, 1989).

O pré-tratamento também promoveu a remoção de $93,7 \pm 0,1\%$ dos grupos acetila, $64,7 \pm 0,1\%$ de ácido ferúlico e de $66 \pm 3\%$ de ácido *p*-cumárico (Tabela 5). A remoção extensiva destes componentes é atribuída a hidrólise alcalina das ligações éster que ocorrem nos grupos mencionados. Os grupos acetila e ferulato esterificam predominantemente as xilanas. Já os cumaratos esterificam predominantemente a lignina (MASARIN *et al.*, 2011; PENG *et al.*, 2012).

Tabela 4 – Composição química, rendimento de sólidos e balanço de massas para o pré-tratamento CTMP de bagaço de cana-de-açúcar utilizando 7,5% de Na₂SO₃ e 3,75% de NaOH.

Amostra	Composição de bagaço (g/100 g de amostra)					Rendimento de sólidos (%) ^a	Balanço de massa para componentes de bagaço após o Pré-tratamento (g /100 g de bagaço <i>in natura</i>)				
	Lignina	Glucana	Hemicelulose				Lignina	Glucana	Hemicelulose		
			Xilana	Arabinosil	Acetil				Xilana	Arabinosil	Acetil
<i>In Natura</i>	20,3±1,2	40,2±0,6	22,6±0,3	22,1±0,1	3,2±0,1	100,0	20,3	40,2	21,6	2,1	3,2
PT-1	13,5±0,5	46,1±0,4	22,7 ±0,2	2,5±0,1	0,3±0,1	80,4	10,8	37,1	18,2	2,0	0,2
PT-2	12,6±0,2	45,7±0,1	22,9±0,1	2,5±0,1	0,3±0,1	80,1	10,0	36,6	18,3	2,0	0,2
PT-3	12,7±0,3	45,2±0,5	22,5±0,2	2,4±0,1	0,3±0,1	79,5	10,0	35,9	17,9	1,9	0,2

(*) Os teores de extrativos e cinzas no bagaço da cana-de-açúcar foram $2,7 \pm 0,1$ e $3,8 \pm 0,3$ g /100 g, respectivamente.

(*) Em amostras pré-tratadas, os extrativos não foram determinados e os teores de cinzas foram $6,7 \pm 0,3\%$, $5,5 \pm 0,2\%$ e $7,7 \pm 0,5\%$ para os lotes 1 a 3, respectivamente.
Fonte: Autoria Própria.

Tabela 5 – Conteúdo de ácidos hidroxicinâmicos no bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e materiais pré-tratados.

Amostras	Composição de bagaço (g/100 g de bagaço)			Rendimento de sólidos (%)	Balanço de massa para componentes de bagaço após o Pré- tratamento (g /100 g de bagaço <i>in natura</i>)		
	Ácido Ferúlico	Ácido Cumárico	Soma		Ácido Ferúlico	Ácido Cumárico	Soma
<i>In Natura</i>	1,7±0,1	6,0±0,2	7,7±0,3	100	1,7	6,0	7,7
PT-1	0,8±0,1	2,8±0,3	3,6±0,4	80,4	0,6	2,2	2,8
PT-2	0,7±0,1	2,5±0,1	3,3±0,1	80,1	0,6	2,0	2,6
PT-3	0,7±0,1	2,4±0,3	3,2±0,5	79,5	0,6	1,9	2,5

Fonte: Autoria Própria.

5.2 Caracterização dos licores de pré-tratamento

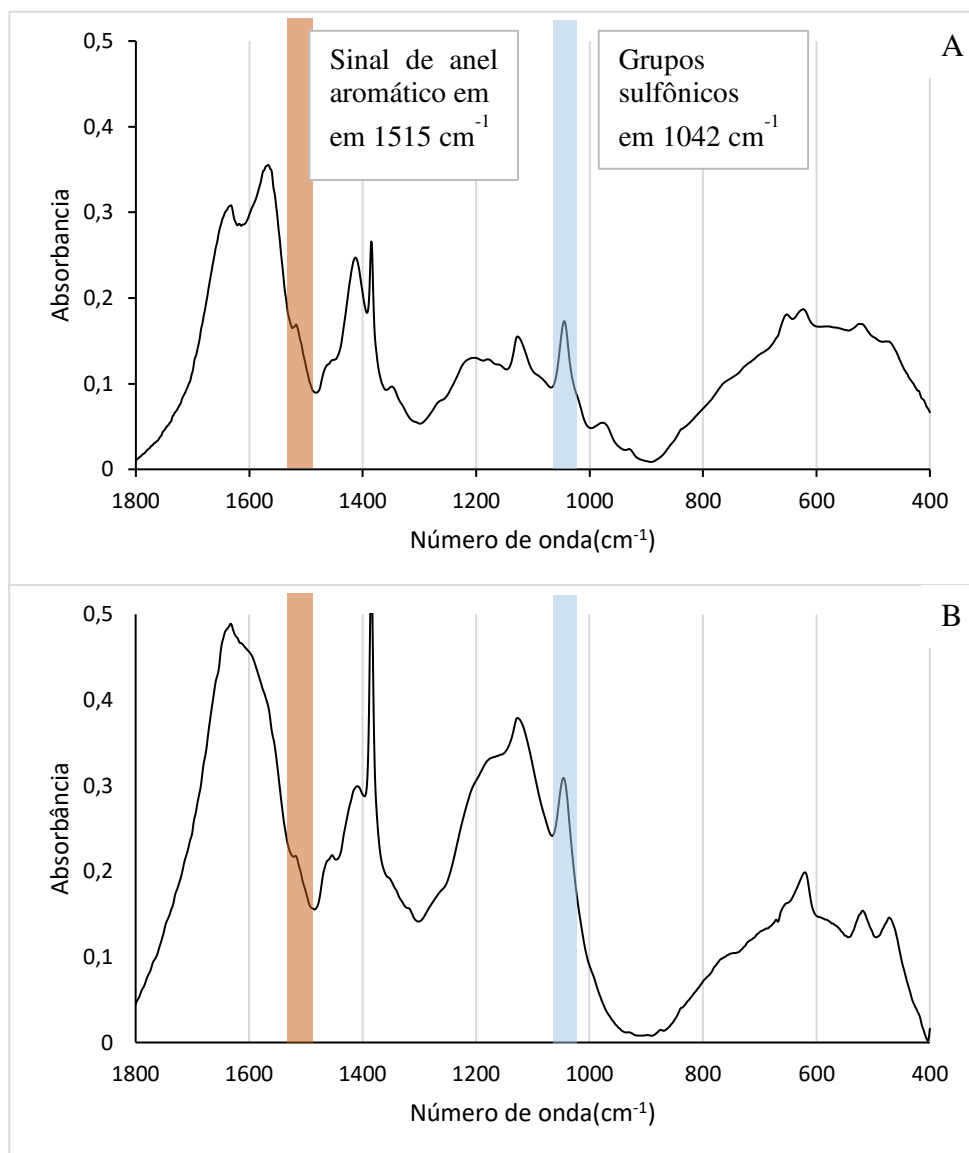
O pré-tratamento CTMP utilizando sulfito-alcálico gerou dois licores: o licor negro que correspondeu essencialmente à fração líquida recolhida por centrifugação após a etapa de cozimento e o licor de lavagem que foi gerado durante a etapa de refinamento mecânico do material sólido previamente digerido com sulfito.

O licor negro apresentou $35,2 \pm 0,5$ g/L de sólidos totais, tendo em sua composição todo o material solubilizado durante o pré-tratamento, além do resíduo de reagentes empregados na reação. Os dados da Tabela 6 indicam que quase todo o álcali foi consumido durante a etapa de pré-tratamento, pois o pH que inicialmente era 13,5, diminuiu para 8,5 ao final do pré-tratamento. O teor de sulfito de sódio que era originalmente 7,5 g/L decresceu para $7,1 \pm 0,3$ g/L no licor negro, sugerindo grande disponibilidade de íons sulfito passíveis de utilização em etapas subsequentes de resulfonação da lignina contida no resíduo de hidrólise enzimática.

O teor de lignina total encontrado no licor negro foi de $8,3 \pm 0,4$ g/L, sendo que a fração solúvel em pH 2 foi de $7,3 \pm 0,3$ g/L, correspondendo a 87,9% da lignina presente no licor. Esta fração de lignina que não precipita em pH 2 foi considerada como sendo lignosulfonato formado durante a etapa de pré-tratamento. Em contraste ao processo sulfito-ácido (ZHOU *et al.*, 2016), nem toda a lignina dissolvida sob pré-tratamento com sulfito-alcálico corresponde a lignosulfonatos porque uma pequena fração representa lignina de baixa massa molar dissolvida por clivagem alcalina. Para evitar superestimar os lignosulfonatos em solução, as medidas de absorção no UV das frações líquidas foram realizadas após a precipitação ácida das frações de lignina não sulfonadas.

A análise de infravermelho (FTIR) do licor negro (Figura 13A) apresentou semelhança ao FTIR de um lignosulfonato comercial (Figura 13B). A banda intensa em 1042 cm^{-1} pode ser atribuída a ligações S=O e várias bandas de média intensidade entre 800 cm^{-1} e 400 cm^{-1} são atribuídas a ligações S-O e C-S dos grupos sulfônicos ligados à lignina (VIDAL *et al.*, 2021).

Figura 13 – Espectro de infravermelho do licor negro (A) e do lignosulfonato comercial (B).



Fonte: Autoria Própria.

A etapa de refinamento mecânico do material pré-tratado, além de promover alterações físicas e morfológicas que proporcionam a individualização das fibras, proporcionou também a lavagem dos sólidos pré-tratados com um volume relativamente baixo de água (26,7 L/kg de bagaço de cana originalmente usado no processo). O teor de sólidos totais no licor de lavagem foi de 3,2 g/L (Tabela 6). O teor de lignina total encontrado no licor foi de 0,8 g/L, sendo a fração solúvel em pH 2 próxima a 0,2 g/L, além de baixas concentrações de oligossacarídeos de glucana e xilana. Devido ao baixo teor de sólidos totais, o licor de lavagem foi descartado após a caracterização química.

Tabela 6 – Composição química do licor negro e do licor de lavagem oriundos do pré-tratamento CTMP sulfito-alcálico de bagaço de cana-de-açúcar.

Licor dos pré-tratamentos**	pH final do licor	Teor de sólidos totais no licor (g/L)	Volume (L)	Composição do licor* (g/L)						
				Lignina Total***	Lignina solúvel em pH 2 ***	Glucana	Xilana	Arabinosil	Acetil	Cinzas
LN-PT-1	8,4	34,7±0,1	8,5	8,2±0,1	7.2 ± 0.3	0,6±0,1	1,6±0,1	0,5±0,1	3,4±0,3	13,0±0,5
LN-PT-2	8,5	35,3±0,4	8,5	8,3±0,3	7.0 ± 0.2	0,6±0,3	1,6±0,2	0,5±0,1	3,5±0,2	13,2±0,5
LN-PT-3	8,7	35,6±0,4	8,5	8,4±0,2	7.6 ± 0.1	0,6±0,1	1,6±0,1	0,5±0,1	3,5±0,2	13,4±0,3
LL-PT-1	7,8	3,2±0,4	22	0,8±0,2	0,2±0,1	0,1±0,1	0,1±0,1	0,1±0,2	0,3±0,2	1,2±0,3
LL-PT-2	7,9	3,2±0,4	22	0,8±0,1	0,2±0,1	0,1±0,2	0,1±0,3	0,1±0,2	0,3±0,2	1,2±0,5
LL-PT-3	8,2	3,2±0,4	22	0,8±0,2	0,2±0,1	0,1±0,2	0,1±0,2	0,1±0,2	0,3±0,2	1,2±0,3

*Sulfito de sódio presente no licor negro $7,1 \pm 0,3$ g/L;

** LN = licor negro; LL = licor de lavagem;

*** Determinação por UV-VIS;

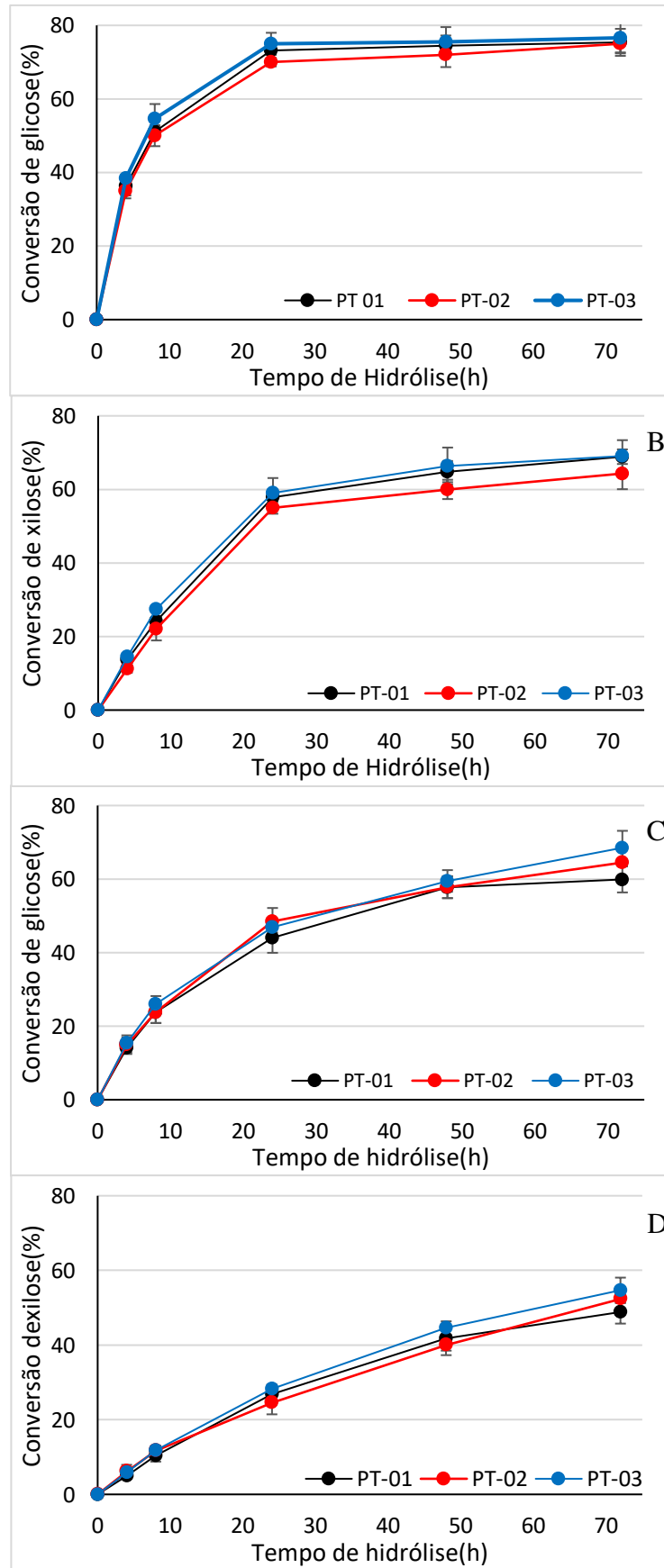
Fonte: Autoria Própria

5.3 Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado

5.3.1 Hidrólise em microescala

Para um estudo inicial de hidrólise, o bagaço pré-tratado foi hidrolisado em microescala empregando consistências de sólidos de 2% e 5%. Os resultados indicados na Figura 14 demonstram altas porcentagens de sacarificação tanto para glucana quanto para xilana nas diferentes consistências. A conversão média da glucana em glicose foi da ordem de 76 ± 3 % em 2% de consistência e 64 ± 4 %, em 5% de consistência. Já para a xilana, houve conversão média de 67 ± 3 % e 51 ± 3 em 2% e 5% de consistência, respectivamente. O comportamento cinético das conversões enzimáticas da glucana e xilana (Figura 15) demonstra que, para a consistência de 2 % a reação atinge um valor já próximo do máximo nas primeiras 24 h. Porém, em 5 % de consistência o valor máximo de hidrólise ocorre em 48 h. Esses resultados evidenciam que o aumento de consistência de 2% para 5% acarreta em um leve decréscimo na eficiência da hidrólise. Para efeitos de comparação, vale mencionar que Mendes *et al.* (2011), estudando bagaço de cana que continha originalmente 24,4 % de lignina oriundo de pré-tratamento sulfito-alcálico com maior carga de sulfito (10%) a 121 °C, obtiveram valores similares de conversão de glucana, correspondendo a 75%, quando a consistência na hidrólise era de 2%.

Figura 14 – Conversão de glucana em glicose e xilana em xilose a partir de bagaço de cana pré-tratado empregando 10 FPU/g Cellic CTec2, em consistência de 2% (A,B) e 5% (C,D), respectivamente.



Fonte: Aatoria Própria.

5.3.2 Hidrólise em escala ampliada

Após os ensaios iniciais de sacarificação em micro-escala com 2% e 5% de consistência, os experimentos foram reproduzidos em escala ampliada empregando 800 g de material pré-tratado (massa seca) numa consistência de 4% e um sistema de agitação orbital excêntrica (“tombo”). A partir destes experimentos foi possível confirmar a eficiência de hidrólise em maior escala, além de permitir gerar sólidos residuais do processo de sacarificação em quantidade suficiente para os estudos subsequentes de resulfonação da lignina residual previstos nesta tese. A sacarificação enzimática dos sólidos pré-tratados na escala ampliada foi conduzida de duas formas experimentais distintas. A primeira delas empregou a mistura de substrato e água e um período de 16h sob agitação para impregnação/homogeneização do substrato, antes da adição de enzimas ao reator de hidrólise. Neste cenário, a conversão de glucana e xilana atingiu 74% e 75%, respectivamente, após 72 h de hidrólise. A segunda forma de hidrólise envolveu a impregnação/homogeneização do substrato e a mistura das enzimas empregando o próprio refinador de discos usado no processo CTMP. Neste caso, a mistura, após homogeneização, seguiu para o reator de hidrólise e proporcionou sacarificação muito similar à obtida no cenário anterior, correspondendo a 72% e 74% de conversão de glucana e xilana, respectivamente após 72 h de reação. Esses resultados demonstram que não há melhora significativa na sacarificação quando o material é homogeneizado no refinador de discos antes do início da hidrólise. Mesmo não havendo melhora na eficiência de hidrólise pela homogeneização no refinador de discos, os dados também mostram que a enzima resiste a este processo de passagem pelo refinador de discos, sugerindo que processos em maior escala podem fazer uso desta modalidade de mistura de substrato e enzima.

Os sólidos não digeridos que restaram do processo de sacarificação em escala ampliada representaram 25,5% e 27,6% do bagaço de cana original que entrou no processo, no primeiro e segundo cenário de hidrólise, respectivamente. Estes sólidos correspondem à matéria-prima usada em estudos de sulfonação subsequentes relatados no presente trabalho e suas composições químicas estão indicadas na Tabela 7.

Tabela 7 – Composição do resíduo da hidrólise enzimática em maior escala de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado. RHE1- Resíduo Hidrólise Enzimática que não passou pelo refinador; RHE2 - Resíduo Hidrólise Enzimática que passou por refinamento.

Amostras	Composição do resíduo da hidrólise (g/100 g de resíduo da hidrólise)				
	Lignina	Glucana	Xilana	Arabinose	Cinzas
RHE1	28,0±0,2	37,5±0,2	17,6±0,3	1,7±0,1	10,1 ± 0,8
RHE2	22,8±0,1	37,2±0,2	16,4±0,3	1,5±0,1	12,9 ± 0,3

Fonte: Autoria Própria.

5.4 Sulfonação dos sólidos residuais do processo de hidrólise enzimática

Os sólidos residuais do processo de hidrólise enzimática (RHE1 - Tabela 7) foram empregados como insumo básico para gerar mais lignosulfonato na biorrefinaria desenhada no presente estudo. Para isso, estes sólidos foram submetidos a uma série de reações com o próprio licor de pré-tratamento, etapa que denominamos como “ressulfonação”. O sistema reacional empregado foi o mais simples possível, evitando processos descritos como custosos e desfavoráveis ao meio ambiente como é o caso da sulfometilação da lignina que emprega formaldeído no meio reacional (HE; FATEHI, 2015; LEITÃO *et al.*, 2017). Vale ressaltar que as reações de ressulfonação não ficaram limitadas às condições brandas comumente utilizadas na etapa de pré-tratamento, que visa preservar a maior parte da fração polissacarídica original (REINOSO *et al.*, 2018; ZHOU *et al.*, 2016).

Em face do mencionado anteriormente, o estudo de ressulfonação dos sólidos residuais da hidrólise enzimática empregou o licor negro como agente de sulfonação (continha $7,1 \pm 0,3$ g/L de sulfito residual) avaliando a influência das variáveis: temperatura de reação (X_1) e adição de álcali ao meio reacional (X_2), sobre o teor de lignosulfonatos (Y_1), o teor de OH fenólico no material solubilizado (Y_2) e a distribuição de massa molar dos lignosulfonatos gerados (Y_3). A matriz experimental empregada assim como as respostas obtidas estão apresentadas na Tabela 8.

A concentração inicial de lignosulfonato no licor negro utilizado como agente de sulfonação foi de 7,3 g/L. Os tores de lignosulfonato no licor após a etapa de ressulfonação variaram entre 18,4 e 33,1 g/L, o que corresponde a um aumento de lignosulfonato no licor de 2,4 a 4,5 vezes, respectivamente (Tabela 8), demonstrando que a etapa de sulfonação apresenta potencial para um melhor aproveitamento da fração de lignina do resíduo de hidrólise enzimática.

Tabela 8 – Matriz experimental e resultados obtidos pelo planejamento experimental 2^2 com arranjo tipo estrela utilizado para estudar o teor de lignosulfonato (Y_1), a % de OH fenólico (Y_2) e a distribuição de massa molar ponderal média (M_w) (Y_3) em função das condições de resulfonação* dos sólidos residuais do processo de sacarificação.

ENSAIOS	VARIÁVEIS REAIS E CODIFICADAS		RESPOSTAS				
	Temperatura (°C) X_1	Adição de álcali (% m/ m) X_2	Lignosulfonato (g/L) Y_1^{**}	% OH Fenólico Y_2	M_w (Da) Y_3	M_n (Da)	Dispersibilidade
1	140 (-1)	5 (-1)	19,6	3,22	5090	523	9,7
2	180(+1)	5 (-1)	23,8	2,05	4353	447	9,7
3	140 (-1)	15 (+1)	32,0	1,94	5799	594	9,8
4	180 (+1)	15 (+1)	30,9	1,83	3596	485	7,4
5	131,72 (- $\sqrt{2}$)	10 (0)	29,8	1,89	5073	560	9,1
6	188,28(+ $\sqrt{2}$)	10 (0)	27,7	2,05	4320	466	9,3
7	160 (0)	2,93 (- $\sqrt{2}$)	18,4	2,70	6573	510	12,9
8	160 (0)	17,07(+ $\sqrt{2}$)	33,1	1,95	3516	440	8,0
9	160 (0)	10 (0)	30,9	2,07	5484	593	9,3
10	160 (0)	10 (0)	32,0	2,10	5898	637	9,3
11	160 (0)	10 (0)	33,0	1,97	5071	589	8,6

(*) O licor negro de pré-tratamento empregado como agente de resulfonação continha 7,1 g/L de Na_2SO_3 ;

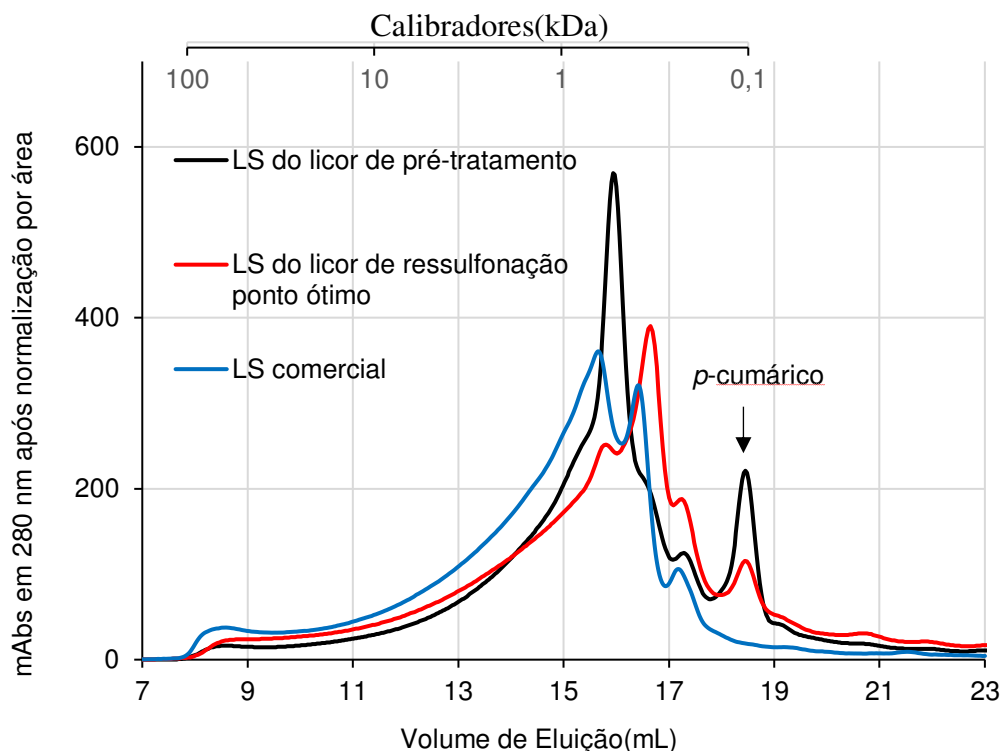
(**) O teor de lignossulfonato no licor negro de pré-tratamento corresponde a 7,3 g/L.

Fonte: Autoria Própria.

A segunda resposta monitorada durante a reação de ressulfonação foi a porcentagem de OH fenólico dos lignosulfonatos gerados (Y_2). Este teor variou entre 1,83 % e 3,22 %. Observa-se que em condições de baixa temperatura e baixo teor de álcali, a porcentagem de OH fenólico foi superior ao observado nos produtos de reação à alta temperatura e alto teor de álcali, sugerindo que em condições mais severas de reação (maior temperatura e maior teor de álcali) ocorreram reações simultâneas de oxidação das estruturas fenólicas do lignosulfonato. Na literatura, a porcentagem de OH fenólicos em lignosulfonatos varia de 1,4% a 2,2% estando condizente com os dados obtidos no presente estudo (EL MANSOURI; SALVADO, 2007; MYRVOLD, 2013; GAO; FATEHI, 2019).

A terceira resposta monitorada foi a distribuição de massa molar dos lignosulfonatos gerados. Os cromatogramas de permeação em gel obtidos para as amostras de lignosulfonato resultantes de cada reação de ressulfonação mostraram uma ampla distribuição de sinais eluindo de 8 mL a 18 mL (Figura 15). De acordo com a calibração da coluna com padrões de poliestireno sulfonato, as moléculas que eluíram de 8 mL a 18 mL apresentaram massas molares de 70 kDa a 0,5 kDa.

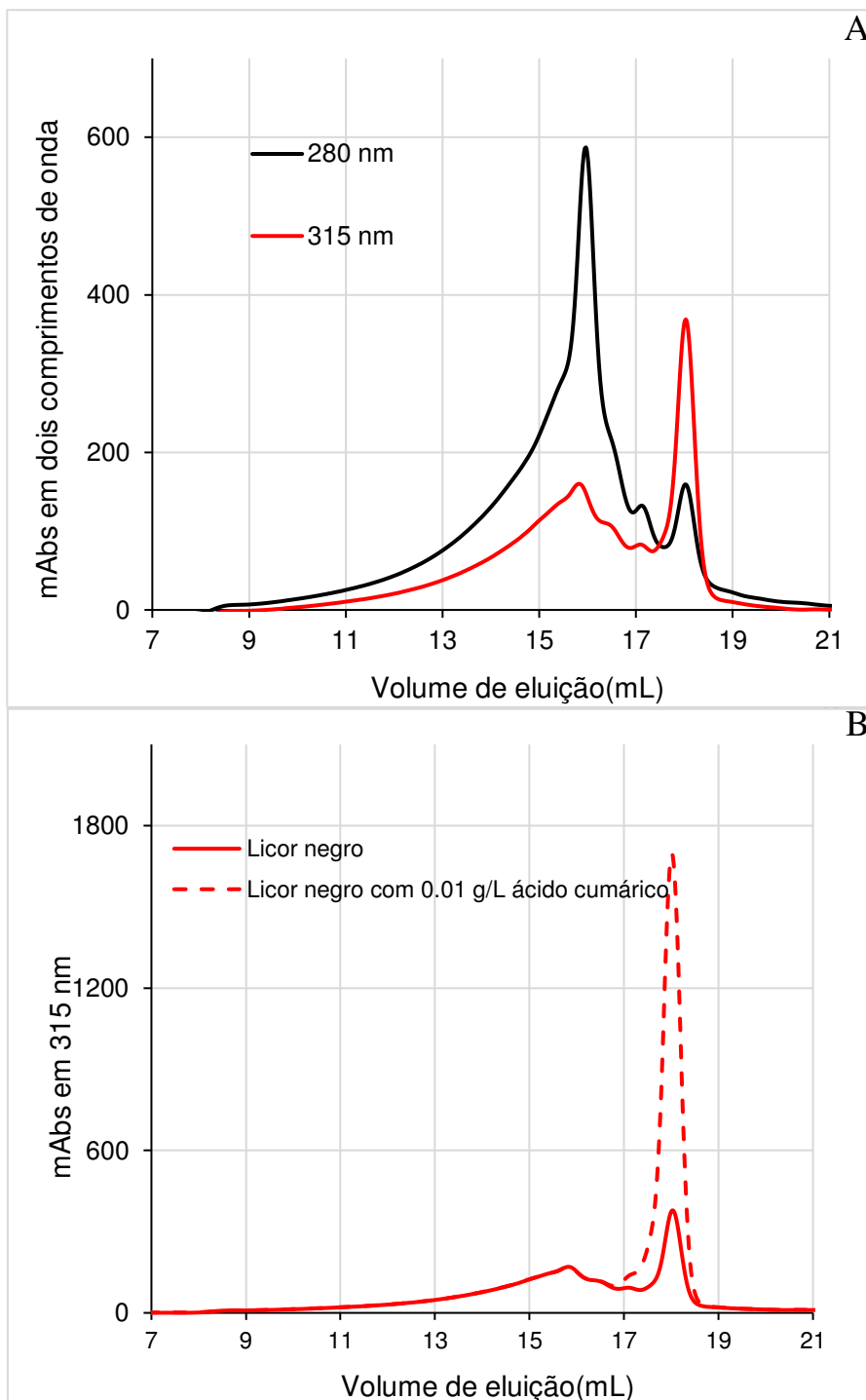
Figura 15 – Cromatogramas de permeação em gel de amostras de lignosulfonato (LS) recuperadas de licor negro de pré-tratamento, licor de resulfonação do ponto ótimo (159 ° C e 13% (m/m) NaOH) e amostra de lignosulfonato comercial de madeira de conífera, cuja massa molar é de 33 kDa (Zinovyev *et al.* 2018). Os calibradores referem-se a poliestireno sulfonato e ácido vanílico.



Fonte: Autoria Própria.

Além da formação de uma grande diversidade de fragmentos de lignosulfonatos, os cromatogramas do licor de pré-tratamento também apresentaram um sinal intenso entre 18 mL e 19 mL que pode ser atribuído a presença de p-cumarato e/ou ferulato. Esta identificação foi confirmada pela maior intensidade do sinal em 315 nm quando comparado com 280 nm, o que é típico do espectro UV em meio alcalino dos ácidos hidroxicinâmicos (LEITE *et al.*, 2016) e pela co-eluição da amostra de licor negro com padrão de ácido p-cumárico, conforme ilustrado na Figura 16. Está descrito na literatura que a maior parte do p-cumarato e ferulato do bagaço de cana-de-açúcar é liberada nas condições de pré-tratamento alcalino de grupos éster ligados à lignina e arabinosilanos, respectivamente (REINOSO *et al.*, 2018). Após as reações de resulfonação, os ácidos hidroxicinâmicos ainda são detectáveis no licor de reação, entretanto em menor concentração (Figure 16). Note-se que o pico identificado como sendo ácido cumárico não foi utilizado para calcular os valores de Mw e Mn descritos a seguir.

Figura 16 – Cromatograma de permeação em gel do licor negro em dois comprimentos de onda (280 e 315 nm) (A) e cromatograma do licor negro contaminado com padrão de ácido cumárico (0,01 g/L) (315nm) (B)



Fonte: Autoria Própria.

A calibração da coluna cromatográfica com padrões de poliestireno sulfonatos (Figura 12) é uma abordagem comum para a determinação de massa molar em lignosulfonatos e mesmo para ligninas dissolvidas em pH alcalino (ZINOVYEV *et al.*, 2018). No entanto, essa abordagem tende a subestimar a massa molar absoluta dos

lignosulfonatos devido às diferenças estruturais dos poliestirenos sulfonatos e dos lignosulfonatos. Em um trabalho esclarecedor sobre a determinação de massas molares em lignina e lignosulfonatos, Zinovyev *et al.* (2018) empregaram detecção dos eluentes da cromatografia por um sistema de espalhamento de luz laser (MALS) a partir de um detector especial em 785 nm que evita interferência da auto-fluorescência da lignina. Neste sistema, os autores avaliaram o mesmo lignosulfonato comercial usado como referência no presente trabalho e estimaram uma massa molar média ponderal (M_w) de 33 kDa. Para fins de comparação, este lignosulfonato comercial, que é preparado a partir de madeiras de coníferas, é mostrado na Figura 16. Note-se que empregando a calibração com poliestireno sulfonatos, este lignosulfonato comercial apresenta uma massa molar ponderal média (M_w) de 4442 Da, corroborando que a calibração com poliestirenos sulfonatos tende a subestimar as massas molares de ligninas estimadas por cromatografia de permeação em gel (ZINOVYEV *et al.*, 2018).

A massa molar ponderal média (M_w) do lignosulfonato presente nos licores de resulfonação foi calculada integrando toda área do cromatograma entre 8 mL a 18 mL e variou entre 3516 Da e 6573 Da nas condições estudadas (Tabela 8). De maneira geral, as reações que ocorreram em maior temperatura e maior teor de álcali geraram lignosulfonatos que mostraram maiores tempos de eluição sugerindo materiais de menores massas molares. As condições de maior temperatura e maior teor de álcali favorecem a clivagem de ligações α -O-4 e β -O-4 dos lignosulfonatos, reduzindo desta forma sua massa molar (ARO; FATEHI, 2017). Esperava-se que com a diminuição da massa molar o percentual de OH fenólico dos lignosulfonatos aumentassem. Porém, esse comportamento não foi observado, devido a severidade da reação que também pode ter ocasionado a oxidação dos OH fenólicos do lignosulfonato formando quinonas (EL MANSOURI; SALVADO, 2007; DING *et al.*, 2020).

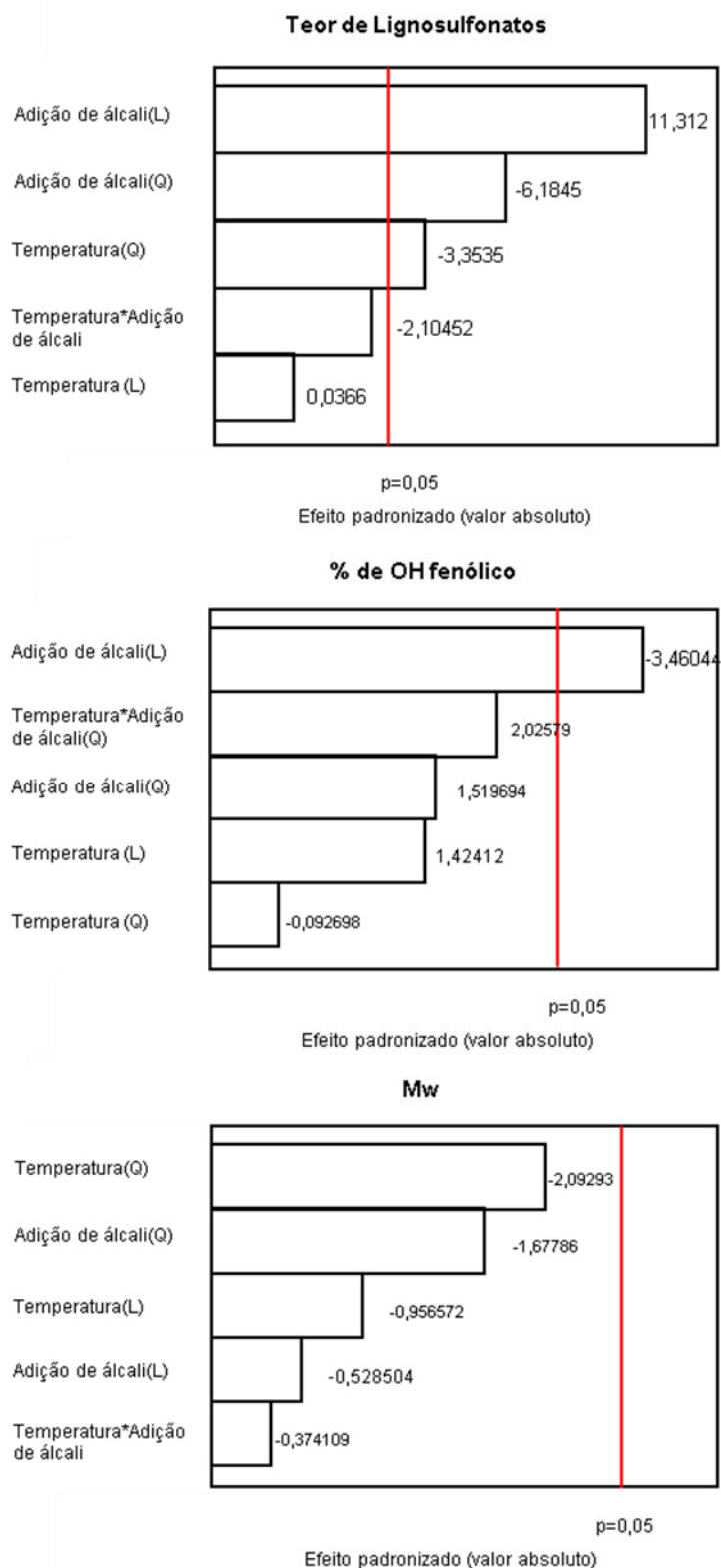
Os valores de massa molar média ponderada em número (M_n) dos lignosulfonatos foram muito menores em relação aos valores de M_w e não variaram consideravelmente entre as condições do estudo (440-628 Da). Com isso, a dispersibilidade para os lignosulfonatos foi elevada e variou entre 7,4 e 12,9 nas diferentes condições estudadas, o que é condizente com a literatura para macromoléculas polidispersas.

5.4.1 Análise estatística dos dados indicados na Tabela 8

Foi utilizado o programa *Statistica* 13.5 para a análise dos efeitos das variáveis independentes no teor de lignosulfonatos (Y_1), % de OH fenólico (Y_2) e nos valores de M_w (Y_3). A Figura 18 apresenta gráficos de Pareto nos quais as barras representam os efeitos individuais de cada uma das variáveis nas respostas estudadas. Como o planejamento experimental do tipo 2^2 expandido em estrela permite gerar um modelo quadrático, o efeito quadrático de cada uma das variáveis também está apresentado na Figura 18 (BARROS NETO; SCARMÍNIO; BRUNS, 2002).

Não houve efeito significativo das variáveis avaliadas na resposta M_w do lignosulfonato. No caso do teor de OH fenólico, somente a adição de álcali ao meio reacional mostrou efeito significativo e negativo, sugerindo que menores teores de OH fenólico são obtidos nas maiores cargas de álcali no meio reacional. O teor de lignosulfonatos (Y_1) foi afetado significativamente pela temperatura e adição de álcali ao meio reacional sendo que maiores cargas de álcali implicaram em maior teor de lignosulfonato (Figura 17).

Figura 17 – Efeitos das variáveis independentes temperatura (°C) e adição de álcali (% m/m) e suas interações sobre o teor de lignosulfonato, % de OH fenólico e valor de Mw do lignosulfonato em função das condições de resulfonação dos sólidos residuais do processo de sacarificação. Os dados foram calculados a partir de um planejamento experimental 2^2 com arranjo tipo estrela.



Fonte: Autoria Própria.

Modelos quadráticos foram ajustados para prever o efeito das variáveis nos teores de lignosulfonato no meio reacional e para os teores de OH fenólico neste lignosulfonato. As análises de regressão destes modelos estão mostradas nas Tabelas 9-11. No caso da resposta Mw do lignosulfonato, o modelo não foi desenvolvido visto que não houve efeito significativo das variáveis de reação nesta resposta.

Tabela 9 – Modelos matemáticos e coeficiente de determinação (R^2) para as respostas teor de lignosulfonato (Y_1) e % de OH fenólico (Y_2) em função das condições de resulfonação dos sólidos residuais do processo de sacarificação.

Modelo matemático	R^2
$Y_1 = -126,277 + 1,555 * X_1 + 5,749 * X_2 - 0,013 * X_1 * X_2 - 0,004 * X_1^2 - 0,131 * X_2^2$	0,9719
$Y_2 = 7,99 - 0,025 * X_1 - 0,62 * X_2 + 0,026 * X_1 * X_2 - 0,000025 * X_1^2 + 0,0069 * X_2^2$	0,8057

Os valores de X_1 e X_2 , não escalonados, correspondem à temperatura em °C e concentração de álcali adicionado em % m/m.

Fonte: Autoria Própria.

Para avaliar os modelos matemáticos gerados quanto à sua utilização para fins preditivos e interpretativos, foi conduzida a Análise de Variância (ANOVA) (BARROS NETO; SCARMÍNIO; BRUNS, 2002) e os resultados estão apresentados na Tabela 10 e Tabela 11.

Tabela 10 – Análise de variância (ANOVA) usando o programa Desing Expert 9.0 ao nível de confiança de 95% para regressão do modelo apresentado para a resposta teor de lignosulfonatos (Y_1) em função das condições de resulfonação dos sólidos residuais do processo de sacarificação.

Fonte de Variação	Grau de liberdade	Soma Quadrática	Média Quadrática	F Valor	p-valor
Modelo	274,66	5	54,93	34,63	0,0007
Temperatura	0,002	1	0,002	0,001	0,9723
Adição de álcali	202,90	1	202,90	127,92	< 0,0001
Temperatura X Adição de álcali	7,02	1	7,02	4,43	0,0893
Temperatura²	17,83	1	17,83	11,24	0,0203
Adição de álcali²	60,65	1	60,65	38,23	0,0016
Resíduo	7,93	5	1,50	--	--
Falta de ajuste	5,72	3	1,91	1,73	0,3868
Erro Puro	2,21	2	1,10	--	--
Cor Total	282,59	10	--	--	--

Fonte: Autoria Própria.

Tabela 11 – Análise de variância (ANOVA) usando o programa Desing Expert 9.0 ao nível de confiança de 95% para regressão do modelo apresentado para a resposta % de OH fenólico (Y_2) em função das condições de ressulfonação dos sólidos residuais do processo de sacarificação.

Fonte de Variação	Grau de liberdade	Soma Quadrática	Média Quadrática	F Valor	p-valor
Modelo	5	1,42	0,28	4,15	0,0723
Temperatura	1	0,14	0,14	2,03	0,2138
Adição de álcali	1	0,82	0,82	11,97	0,0180
Temperatura X Adição de álcali	1	0,28	0,28	4,10	0,0987
Temperatura²	1	5,885E-004	5,885E-004	8,596E-003	0,9297
Adição de álcali²	1	0,16	0,16	2,31	0,1891
Resíduo	5	0,34	0,068	--	--
Falta de ajuste	3	0,33	0,11	23,96	0,0403
Erro Puro	2	9,267E-003	4,633E-003	-	--
Cor Total	10	1,76	--	--	--

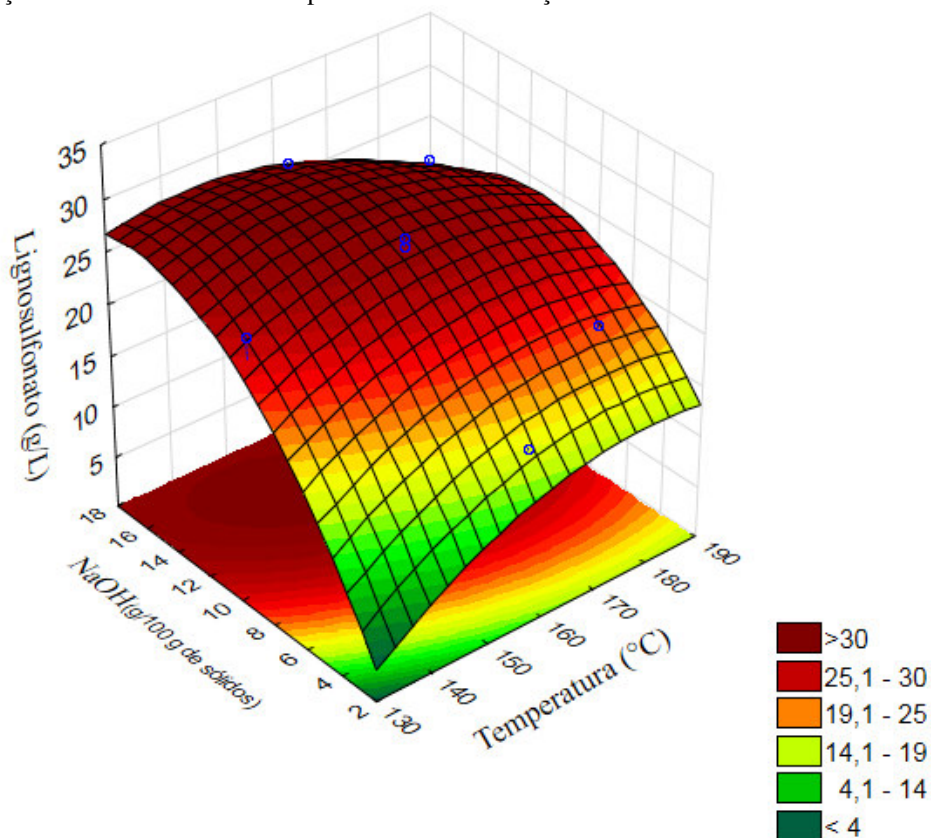
Fonte: Autoria Própria.

Conforme verificado na Tabela 9 e Tabela 10, o modelo que prevê o teor de lignosulfonato (Y_1) no meio reacional pode ser considerado satisfatório, explicando 97,19% ($R^2=0,9719$) da variação em torno da média ao nível de 95% de confiança. No teste de Fisher (teste F), foi verificado que o valor de $F_{\text{calculado}}$ foi superior ao valor de F_{tabelado} , indicando que o modelo quadrático obtido é adequado para explicar a distribuição dos dados e o modelo pode ser utilizado para fins preditivos (BOX; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S., 1978). Esses resultados, associados às altas porcentagens de variância explicadas e à não significância da falta de ajuste ($p\text{-valor} > 0,05$) indicam que o modelo quadrático obtido é robusto para descrever a região experimental estudada para o teor de lignosulfonato.

Para a resposta % de OH fenólico (Y_2), o modelo gerado (Tabela 9 e Tabela 11) explicou apenas 80,57% ($R^2=0,8057$) da variação em torno da média ao nível de 95% de confiança. No teste de Fisher (teste F), foi verificado que o valor de $F_{\text{calculado}}$ (4,15) foi inferior ao valor de F_{tabelado} (5,05), indicando que o modelo quadrático obtido não é adequado para explicar a distribuição dos dados e o modelo não deve ser utilizado para fins preditivos (BOX; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S., 1978). Esses resultados, associados às baixas porcentagens de variância explicadas e significância da falta de ajuste ($p\text{-valor} < 0,05$) indicam que o modelo quadrático obtido não é adequado para descrever a região experimental estudada para a resposta % de OH de fenólico.

Como somente o modelo matemático para o teor de lignosulfonato foi estatisticamente significativo, foi gerado o gráfico de superfície para esta resposta, o qual está apresentado na Figura 18.

Figura 18 – Gráfico de superfície de resposta para o teor de lignosulfonato (g/L) em função das condições de resulfonação dos sólidos residuais do processo de sacarificação.



Fonte: Autoria Própria.

Com base no modelo indicado na Tabela 9, a condição para a obtenção do teor máximo de lignosulfonatos foi estimada em temperatura de 159 °C e 13,2 % (m/m) de adição de álcali, com uma produção estimada de 33,8 g/L. Sob essas condições foram realizados 3 experimentos adicionais de validação e o teor experimental de lignosulfonatos obtido para esse ponto foi de $33,5 \pm 0,7$ g/L, o que demonstra que o modelo foi bem ajustado aos dados experimentais para esta resposta.

5.4.2 Reações de resulfonação com diferentes razões sólido/líquido na condição otimizada

A etapa de resulfonação, realizada sob temperatura de reação previamente otimizada (159 °C) e adição de álcali (13%), foi ajustada para cobrir dois cenários diferentes, considerando o volume de licor negro de pré-tratamento disponível no

processo (Tabela 6). As reações ocorreram em escala 10 vezes maior do que a escala utilizada para os experimentos de otimização.

O primeiro cenário (cenário 1) empregou uma proporção sólido:líquido de 1:10 derivada de condições otimizadas, mas significou subutilização do licor de pré-tratamento disponível, pois o licor negro de pré-tratamento recuperado correspondeu a 0,71 L.L⁻¹ de licor branco de pré-tratamento (que iniciou o processo de pré-tratamento) a cada 100g de bagaço de cana-de-açúcar. Os sólidos não hidrolisados que restaram da etapa de sacarificação corresponderam a apenas 25,5 g/100 g de bagaço originalmente empregado no processo (Figura 20). Portanto, o segundo cenário empregou todo o licor negro de pré-tratamento recuperado experimentalmente no processo, o que significou uma relação sólido: líquido de 1:28 (m/v) (25,5g/710 mL) (cenário2). O último cenário maximiza o uso de íons sulfito que entram no processo porque todo o licor negro de pré-tratamento disponível reage com os sólidos residuais não hidrolisados. Os teores de lignosulfonato, concentração de sulfito de sódio residual, % de OH fenólicos, massa molar ponderal média (M_w), massa molar média ponderada em número (M_n) e dispersibilidade (D) detectadas nessas reações são relatadas na Tabela 12.

O teor de lignosulfonatos no licor de reação determinado para o cenário 1 foi de 33,5 ± 1,0 g/L e 16,3 ± 0,5 g/L para o cenário 2. Nota-se também que com a diminuição da relação sólido:líquido ocorreu maior consumo de sulfito na resulfonação. A massa molar ponderal média (M_w) aumentou com a diminuição da relação de sólido:líquido, o que poderia estar associado com a maior disponibilidade de íons sulfito no meio que pode favorecer maior intensidade de sulfonação da lignina e conseqüentemente dissolução de ligninas de maior massa molar. Foi observado também que a porcentagem de OH fenólico aumentou com a diminuição da relação sólido:líquido, sugerindo maior clivagem de ligações β-O-4 na lignina contida nos resíduos sólidos.

Tabela 12 – Concentração de íons sulfito, teor de lignosulfonato, % de OH fenólico, M_w, M_n e dispersibilidade (D) nas frações líquidas produzidas ao longo do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar.

Amostra	Na ₂ SO ₃ (g.L ⁻¹)	Lignosulfonato (g.L ⁻¹)	% OH fenólico	M _w (Da)	M _n (Da)	D
Licor branco de pré-tratamento	7,5	0,0	--	--	--	--
Licor negro	7,1	7,3 ± 0,3	2,38±0,1	2641	498	5,3
cenário 1 (1:10)	4,9	33,5±1,0	2,10±0,1	3646	487	7,5
cenário 2 (1:28)	3,5	16,3±0,5	3,41±0,1	5061	461	11

Fonte: Autoria Própria.

5.5 Balanço de massa para os componentes do bagaço de cana-de-açúcar sob processamento na biorrefinaria proposta

A Figura 19 mostra o balanço de massa global para a biorrefinaria proposta, no qual fica evidenciado o destino de cada fração durante o processamento. Os dados de balanço consideram a massa de sólidos insolúveis recuperados de cada etapa do processo e sua composição química e o cenário 2 de reação de resulfonação, que corresponde a 1:28 (m/v) para a relação sólido:líquido.

A maior parte da glucana e xilana originais contidas no bagaço da cana-de-açúcar foram retidas nos sólidos pré-tratados (91% e 84%, respectivamente), enquanto os grupos acetila foram quase completamente liberados para o licor de pré-tratamento (94%) (Figura 20). Uma fração significativa da lignina original foi removida do bagaço da cana-de-açúcar durante o pré-tratamento (49%). Esta lignina foi recuperada no licor de pré-tratamento, principalmente como uma solução diluída de lignosulfonato (7,3 g/L). No entanto, uma pequena fração de lignina também foi descartada na água de lavagem dos sólidos pré-tratados (Tabela 6).

Uma etapa de hidrólise enzimática converteu 67% da glucana e 63% da xilana originalmente disponível no bagaço da cana em monossacarídeos que ficaram contidos no hidrolisado enzimático. Este hidrolisado também continha parte da lignina na forma de lignosulfonatos (Figura 19). No entanto, o teor de lignosulfonato neste hidrolisado pode estar superestimado devido à presença de proteínas solúveis remanescentes do coquetel enzimático usado na etapa de sacarificação (MACHADO *et al.*, 2020), que podem interferir na determinação do teor de lignosulfonatos, pois os dois grupos de componentes absorvem na região de 280 nm.

Os sólidos não digeridos (cerca de 25,5% do bagaço que entrou no processo) continham 35% da lignina do bagaço da cana-de-açúcar *in natura*, representando a matéria-prima para as reações de resulfonação desenvolvidas para o desenho de biorrefinaria explorado na presente tese.

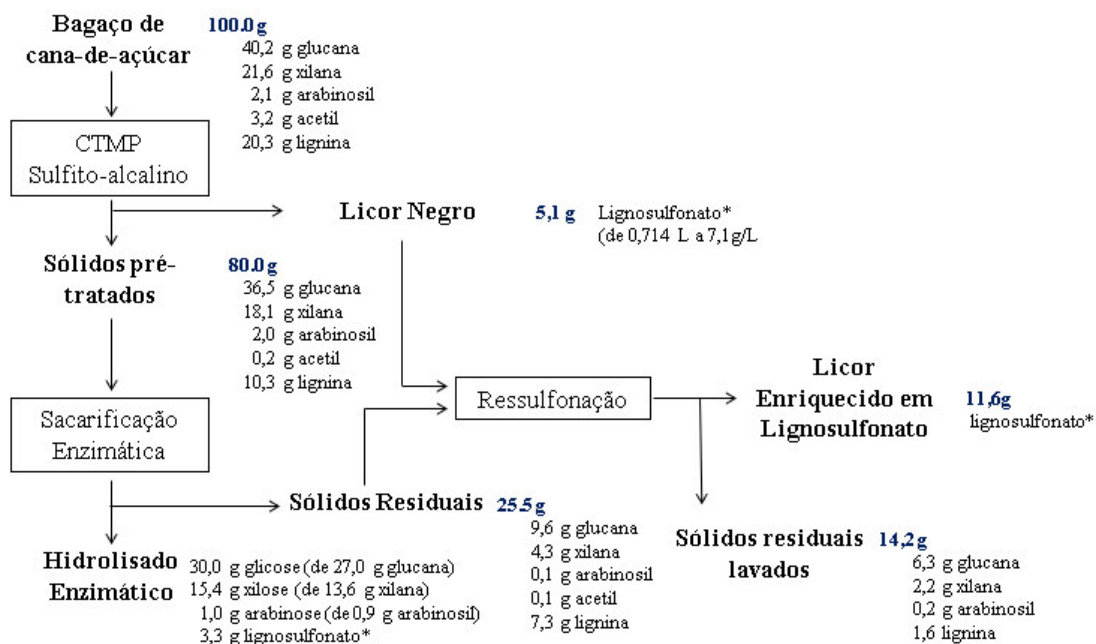
As condições de sulfonação nas proporções sólido:líquido de 1:10 e 1:28, a concentração de lignosulfonato aumentou de 7,3 g/L no licor de pré-tratamento para 33,5 e 16,3 g/L, respectivamente no licor de resulfonação (Tabela 13), significando a conversão quase completa da lignina originalmente contida no bagaço de cana em lignosulfonatos 58,1% na condição 1:10 e (Figura 20) e 57,3% na condição 1:28 respectivamente. Essas concentrações mais elevadas são obtidas às custas da redução da

conversão geral de lignina em lignosulfonatos devido à subutilização do licor negro na biorrefinaria proposta.

O uso de todo licor de pré-tratamento disponível no processo pode aumentar o rendimento de lignosulfonato e deve ser pensado juntamente com o uso de diferentes proporções sólido:líquido na etapa de ressulfonação porque as aplicações comerciais de lignosulfonato requerem concentrações da ordem de 300 g/L de lignosulfonatos, o que demandaria o emprego de processos de concentração em múltiplos estágios ou uso de secagem por *Spray Dryer* para produzir preparações de lignosulfonato em pó (ARO; FATEHI, 2017).

Em estudos similares aos desenvolvidos neste trabalho, Zhou *et al.* (2015, 2016) avaliaram a recuperação de lignosulfonato contido somente no licor de pré-tratamento de madeiras, sem uma etapa posterior de ressulfonação dos sólidos residuais da sacarificação. Os autores obtiveram a produção de 68 kg de lignosulfonato por tonelada de madeira processada através do processo SPORL (bisulfito em meio ácido). Os estudos foram conduzidos em escala piloto (40 kg de biomassa seca), empregando madeira dura (*Populus deltoides*) e madeira de conífera (*Pinus sp.*), com 3% e 8% de bissulfito de sódio, respectivamente, em temperatura de 160 °C por 40 min. Em comparação, o presente estudo demonstrou que seria possível produzir 73 kg de lignosulfonato por tonelada de bagaço de cana-de-açúcar diretamente no licor de pré-tratamento com sulfito-alcálico. A adição da reação de ressulfonação idealizada na presente tese e desenvolvida em condição otimizada (159°C e 13% (m/m) de álcali na relação sólido:líquido de 1:28) permitiria incrementar a produção de lignosulfonato para 116 kg por tonelada de bagaço de cana-de-açúcar.

Figura 19 – Balanço de massa para o bagaço de cana-de-açúcar durante pré-tratamento quimiotermodinâmico, seguido da hidrólise enzimática e reação de resulfonação no ponto ótimo com relação sólido:líquido 1:28.



* As massas de lignosulfonato marcadas podem estar levemente superestimadas devido a interferência na determinação espectrofotométrica deste componente.

Fonte: Autoria Própria.

5.6 Purificação do lignosulfonato obtido

Para a etapa de purificação dos lignosulfonatos foram estudadas duas amostras: o licor negro e o licor de resulfonação do ponto ótimo (1:10). A ultrafiltração foi utilizada como técnica para remover moléculas de menor massa molar e sais contidos nos licores de reação, proporcionando uma fração enriquecida em lignosulfonatos de maior massa molar e praticamente livre de ácidos hidroxicinâmicos, produtos de degradação de açúcares, monossacarídeos, fragmentos de lignina de baixa massa molar e sais residuais do processo.

Durante a ultrafiltração, a condutividade dos licores foi acompanhada até que atingisse um valor estável. A condutividade inicial do licor negro (18,36 mS) e do licor de resulfonação do ponto ótimo (1:10) (17,10 mS) diminuiu até os valores de 6,58 mS e 4,1 mS para os mesmos licores, respectivamente. Para isso, foi necessário o emprego de adições sucessivas de água a pH 2 ao sistema, correspondendo a cerca de 17,5 mL de água/mL de licor originalmente concentrado por ultrafiltrado.

5.6.1 Análise de CHNS e massa molar dos lignosulfonatos

A análise de CHNS foi realizada nos licores antes e pós-ultrafiltração (Tabela 13). Os dados mostram que o teor de carbono aumentou após a ultrafiltração, o que parece estar associado com a remoção expressiva de compostos inorgânicos do licor. O teor de carbono estimado para os lignosulfonatos purificados foi de 45% para ambas as amostras, sendo condizente ao teor encontrado na literatura para lignosulfonatos (GUTIERREZ *et al.*, 2020; VIDAL *et al.*, 2021).

Tabela 13 – Análise elementar de CHNS, % de OH fenólico e Mw, Mn e dispersibilidade do licor negro e licor negro purificado, licor de resulfonação no ponto ótimo e licor de resulfonação no ponto ótimo purificado.

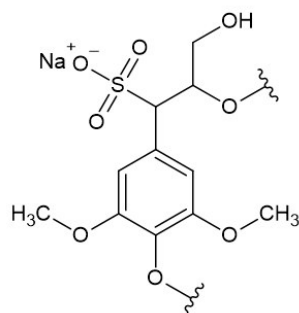
AMOSTRA	C (%)	H (%)	O (%)	S (%)	% OH fenólico	Mw	Mn	D
Licor Negro	33,84	4,07	55,91	5,72	2,38±0,1	2641	498	5,3
Licor Negro Purificado	45,82	5,63	45,4	2,05	2,15±0,1	5154	679	7,6
Licor de Resulfonação ponto ótimo	29,12	3,64	66,71	ND	2,10±0,1	3646	487	7,5
Licor de Resulfonação ponto ótimo purificado	45,68	6,17	45,87	1,57	1,40±0,1	5354	752	7,1

ND- Não determinado.

Fonte: Autoria Própria.

O teor de enxofre na amostra de lignosulfonato purificado do licor negro foi de 2,05% (m/m) o que significa aproximadamente 21 grupos sulfônicos por 100 unidades do modelo de lignosulfonato proposto na Figura 20. Para a amostra de lignosulfonato purificado do licor de resulfonação do ponto ótimo o teor de enxofre foi de 1,57% (m/m) o que significa aproximadamente 16 grupos sulfônicos por 100 unidades do modelo de lignosulfonato proposto.

Figura 20 – Modelo proposto de lignosulfonato (tipo siringil) usado para estimar o grau de substituição de de grupos sulfônicos e OH fenólicos.

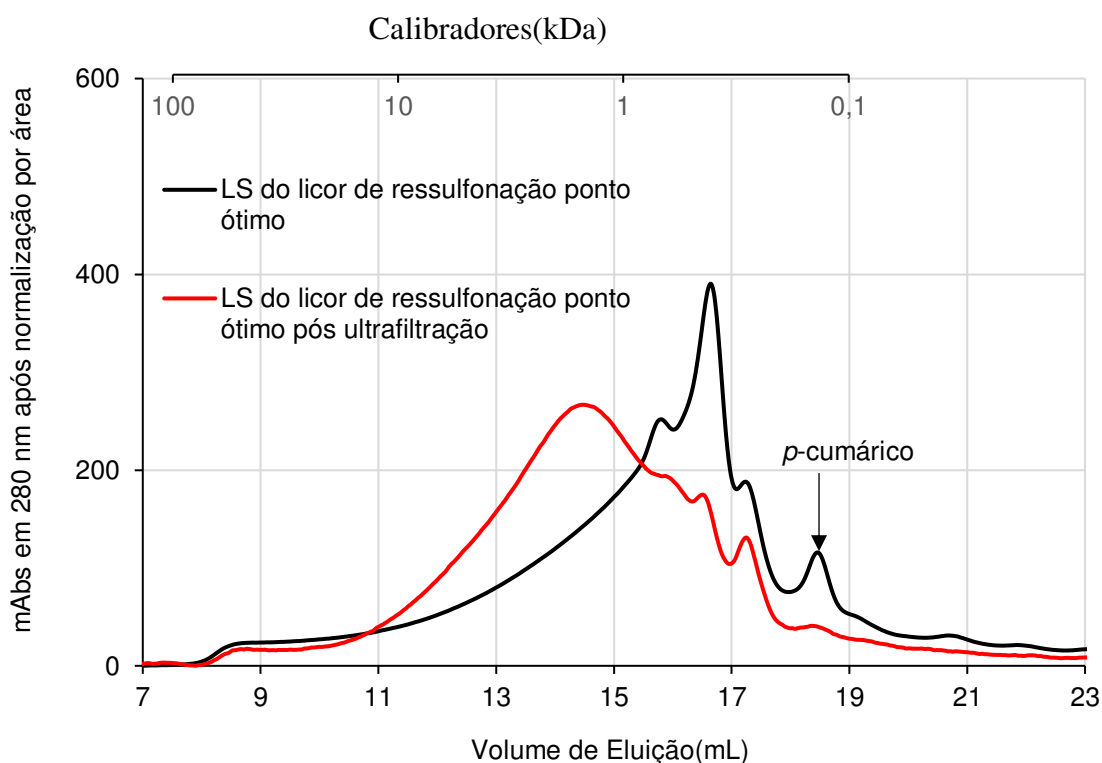


Fonte: Autoria Própria.

A etapa de purificação do licor causou a redução no teor de OH fenólico dos lignosulfonatos, sugerindo que frações de baixa molar dos lignosulfonatos (menor que 1,0 kDa) são mais ricas em hidroxilas fenólicas. A quantidade de grupos fenólicos remanescentes no lignosulfonato do licor negro purificado $2,15 \pm 0,1\%$ (33 hidroxilas por 100 unidades do modelo proposto - Figura 21) e $1,4 \pm 0,1\%$ (27 hidroxilas por 100 unidades do modelo proposto - Figura 21) para o lignosulfonato purificado do licor de resulfonação do ponto ótimo permite estimar que estes materiais apresentam potencial uso como substituto do fenol, conforme já relatado para várias aplicações de lignina (TORRES *et al.*, 2020).

A etapa de ultrafiltração claramente eliminou moléculas de menor massa molar ocasionando o aumento na massa molar ponderal (Mw) dos lignosulfonatos purificados, conforme ilustrado na Tabelas 13. A Figura 21 ilustra o cromatograma de permeação em gel do lignosulfonato do licor de resulfonação do ponto ótimo (159°C e 13% (m/m) NaOH) e lignosulfonato do licor de resulfonação do ponto ótimo após ultrafiltração.

Figura 21 – Cromatogramas de permeação em gel do lignosulfonato (LS) recuperado do licor de resulfonação do ponto ótimo (159°C e 13% (m/m) NaOH) e licor de resulfonação do ponto ótimo após ultrafiltração. Os calibradores referem-se ao poliestireno sulfonato e ácido vanílico.



Fonte: Autoria Própria.

5.6.2 Espectro de infravermelho (FTIR) dos lignosulfonatos

Os Lignosulfonatos são macromoléculas complexas que contém diferentes grupos funcionais tais como grupos sulfônicos, metílicos, fenólicos, carboxílicos, entre outros, de forma que as propriedades dependem fortemente da natureza dos grupos funcionais que formam seu esqueleto (ARO, FATEHI, 2017). A caracterização dos lignosulfonatos purificados com a técnica de FTIR permitiu identificar bandas características indicadas na Tabela 14 e Figura 22.

A banda próxima a 1700 cm^{-1} foi atribuída às vibrações de alongamento C=O dos grupos carboxila e outros tipos eventuais de carbonila (FAIX *et al.*, 1991). As bandas em 1600 e 1515 cm^{-1} são atribuídas ao alongamento C=C do anel aromático do lignosulfonato, ficando evidenciado que com a etapa de purificação, a banda em 1515 cm^{-1} aumenta em intensidade (Figura 22).

As bandas na região de 1455 e 1380 cm^{-1} são atribuídas a deformações da ligação C-H de grupos cujo carbono é saturado (LI *et al.*, 2018). A banda em 1217 cm^{-1} é característica das vibrações de alongamento da ligação éter (C–O–C) (LI *et al.*, 2018).

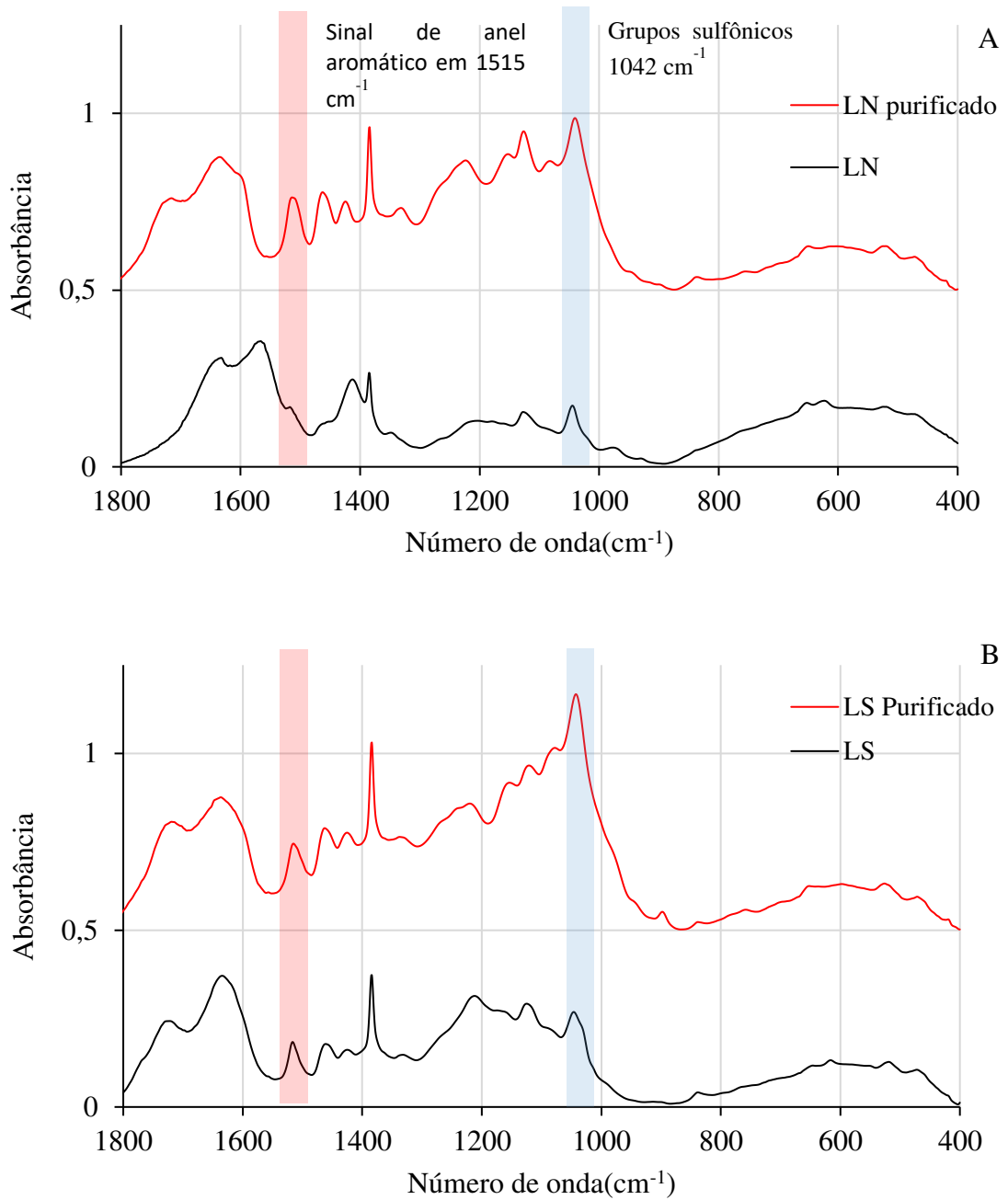
Tabela 14 – Atribuição das principais bandas de infravermelho (FTIR) para o lignosulfonato.

Número de onda (cm^{-1})	Atribuições de banda
3400	Estiramento da ligação O-H de álcool e fenóis
2900	Alongamento da ligação C-H
1700	Alongamento da ligação C=O
1515	Alongamento de C=C do anel aromático
1455	Deformações da ligação C-H dos grupos metila
1380	Deformações da ligação C-H dos grupos metila
1042	Atribuído a alongamento da ligação S=O

Fonte: Autoria Própria.

Outra banda característica de lignosulfonatos é encontrada em 1042 cm^{-1} , sendo atribuída a vibração de alongamento das ligações S=O, indicando que o grupamento sulfônico está presente na molécula e a banda em 1042 cm^{-1} se intensifica quando o licor é purificado (LI *et al.*, 2018; DEMUNER *et al.*, 2021). Outras bandas de baixa intensidade de 800 cm^{-1} a 400 cm^{-1} são atribuídas a ligações SO e CS de grupos sulfônicos ligados a lignina (LI *et al.*, 2018; VIDAL *et al.*, 2021).

Figura 22 – Espectros de infravermelho (FTIR) do licor negro (LN) e licor negro purificado (A); bem como do licor de resulfonação ponto ótimo (LS) antes e após purificação (B).

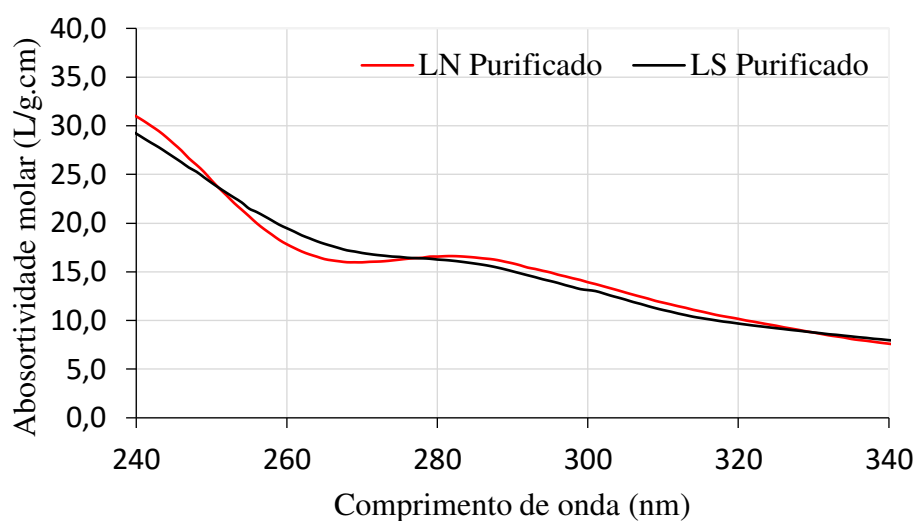


Fonte: Autoria Própria.

5.6.3 Espectro UV dos lignosulfonatos purificados

Os espectros de UV (Figura 23) dos lignosulfonatos purificados a partir do licor negro e do licor de resulfonação do ponto ótimo apresentaram banda típica em 280 nm atribuída a anéis aromáticos substituídos por grupos hidroxila (-OH) e metoxila (-OCH₃) de estruturas de lignina. Note-se ainda que a banda em 315 nm, tipicamente observada em ligninas de bagaço de cana-de-açúcar, que é atribuída a presença de α - β insaturações dos p-cumaratos esterificados nas cadeias laterais de lignina (HE; TERASHIMA, 1991; LEITE *et al.*, 2016; LIN *et al.*, 2021) não está presente nos espectros de UV dos lignosulfonatos purificados.

Figura 23 – Comportamento da absorptividade molar em função do comprimento de onda para o licor negro (LN) purificado e lignosulfonato (LS) purificado a partir do licor de resulfonação gerado no ponto ótimo.



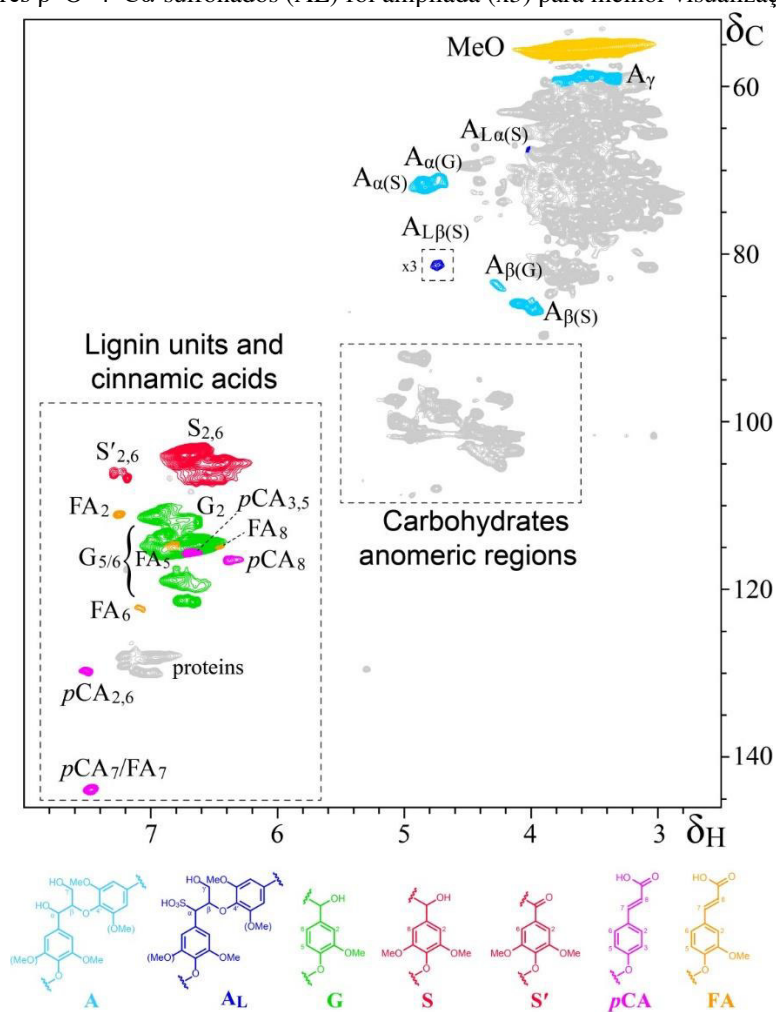
Fonte: Autoria Própria.

5.6.4 Ressonância Magnética Nuclear Bidimensional (RMN-2D)

O espectro de RMN-2D-HSQC da amostra de lignosulfonato dessalinizado é mostrado na Figura 24. Sinais de lignina, bem como sinais de carboidratos, principalmente de xilanas, foram observados. A região aromática do espectro mostra sinais típicos das unidades guaiacil (G) e siringil (S), sinais de unidades Hidroxifenila(H) não puderam ser determinados porque eles se sobrepuseram com sinais de resíduos de proteínas contaminantes, provavelmente decorrentes da etapa de sacarificação enzimática. A amostra de lignossulfonato apresentou relação S/G de 2,0, indicando que a

lignina foi levemente enriquecida em unidades tipo siringil em comparação com a lignina comumente encontrada em bagaço de cana que apresenta relação S/G de 1,6 (DEL RÍO et al, 2015). Sinais menores de ácidos p-hidroxicinâmicos (p-cumárico, pCA e ácidos ferúlicos, FA) também foram observados. Os deslocamentos químicos dos sinais de correlação $C\alpha/H\alpha$ e $C\beta/H\beta$ de pCA e FA indicam que os ácidos p-hidroxicinâmicos não foram esterificados à porção lignina, mas estão presentes como grupos carboxílicos livres, como também observado em outras ligninas alcalinas (REINOSO *et al.*, 2018).

Figura 24- Espectros de RMN-2D-HSQC ($\delta C/\delta H$ 52–146/2,5–8,0) do lignossulfonato purificado recuperado após ultrafiltração do licor de resulfonação. As principais estruturas detectadas estão representadas na parte inferior e incluem éteres β -O-4' (A), éteres β -O-4' com C α -sulfonados (AL), unidades guaiacil (G), siringil unidades (S), unidades de siringil C α -oxidado (S'), unidades de ácido p-cumárico (pCA) e unidades de ácido ferúlico (FA). Observe que a região que mostra o sinal de correlação $C\beta/H\beta$ de éteres β -O-4' C α -sulfonados (AL) foi ampliada (x3) para melhor visualização.



Fonte: autoria própria.

A região alifática oxigenada do espectro mostra sinais típicos das diferentes ligações entre unidades de lignina. Nesta região do espectro, os sinais das correlações

$C\alpha/H\alpha$ e $C\beta/H\beta$ de $\beta-O-4'$ (A) foram claramente vistos, corroborando que a lignina macromolecular ocorre na amostra de lignossulfonato recuperada do licor de resulfonação. Além disso, também foram observados sinais de $\beta-O-4'$ com um grupo sulfônico na posição C_α (AL); o sinal para a correlação $C\beta/H\beta$ foi claramente distinguido em $\delta C/\delta H$ 81,3/4,74 enquanto que o sinal para a correlação $C\alpha/H\alpha$ que aparece em $\delta C/\delta H$ 67,2/4,02 foi parcialmente sobreposto com sinais de fragmentos de xilana contaminantes. A integração dos sinais de volume das correlações $C\beta/H\beta$ de $\beta-O-4'$ normais ($A\beta$) e α -sulfonados (AL_β) permitiu estimar o grau de sulfonação de lignina para aproximadamente 9-10% de todas as estruturas $\beta-O-4'$.

6 CONCLUSÃO

A biorrefinaria de bagaço de cana-de-açúcar proposta no presente trabalho baseada no pré-tratamento quimiotermomecânico gerou um licor de pré-tratamento que contém lignosulfonatos em baixa concentração (7,3 g/L) e baixa concentração de polissacarídeos (2,7 g/L), porém apresentava quantidades significativas de íons sulfito residuais (7,1 g/L). A etapa de sacarificação do material pré-tratado desenvolvida em maior escala se mostrou eficiente, convertendo 74% da glucana em glicose e 75% da xilana em xilose.

O processo de resulfonação desenvolvido para otimizar a recuperação da lignina residual, utilizando o licor negro de pré-tratamento como agente de sulfonação e o reagindo com os sólidos residuais da etapa de sacarificação enzimática, fração está que estava enriquecida em lignina, se mostraram uma alternativa interessante podendo ser observado que as concentrações de lignosulfonato no licor após reação de resulfonação apresentaram em até 4,8 vezes. O rendimento de lignosulfonatos no licor dependeu da adição de NaOH adicional ao meio de resulfonação e da temperatura desta reação cujas condições otimizadas indicam a carga de 13% de NaOH e 159 °C. O lignossulfonato preparado em condições otimizadas de reação representou 57,3% da lignina original contida no bagaço de cana-de-açúcar.

A caracterização química da fração de lignossulfonato purificado indicou que os éteres β -O-4', α -sulfonados representaram aproximadamente 9-10% de todos os éteres β -O-4' presentes em sua estrutura. A etapa de purificação dos licores demonstrou que as características dos lignosulfonatos produzidos a partir do bagaço de cana-de-açúcar são similares aos comerciais, sugerindo sua adequação para uso em diversas aplicações.

REFERÊNCIAS

- ALCÁNTARA, M. Á. B. *et al.* Recalcitrant carbohydrates after enzymatic hydrolysis of pretreated lignocellulosic biomass. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2016.
- AOUF, C. *et al.* Tara tannins as phenolic precursors of thermosetting epoxy resins. **European Polymer Journal**, v. 55, p. 186–198, 2014.
- AGUSTIN, M. B. *et al.* Laccase as a Tool in Building Advanced Lignin-Based Materials. **ChemSusChem**, v. 1, p. 4615–4635, 2021.
- ARO, T.; FATEHI, P. Production and Application of Lignosulfonates and Sulfonated Lignin. **ChemSusChem**, v. 10, n. 9, p. 1861–1877, 2017.
- AYUSO-FERNÁNDEZ, I. *et al.* Peroxidase evolution in white-rot fungi follows wood lignin evolution in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 116, n. 36, p. 17900–17905, 2019.
- BAJWA, D. S. *et al.* A concise review of current lignin production, applications, products and their environment impact. **Industrial Crops and Products**, v. 139, p. 111526, Feb. 2019.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2.ed. Campinas, SP: Editora da Unicamp. 2002.
- BHATTACHARYAA, P. K. *et al.* Studies on ultrafiltration of spent sulfite liquor using various membranes for the recovery of lignosulfonates. **Desalination**, v. 174, n. 5, p. 287–297, 2005.
- BOX, G. E. P.; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S. **Statistics for experimenters. An introduction design, data analysis and model building**. New York: Wiley, 1978.
- CARPIO, L. G. T.; SOUZA, F. Optimal allocation of sugarcane bagasse for producing bioelectricity and second generation ethanol in Brazil: Scenarios of cost reductions. **Renewable Energy**, v. 111, p. 771–780, 2017.
- CAVALCANTI, E. J. C.; CARVALHO, M.; DA SILVA, D. R. S. Energy, exergy and exergoenvironmental analyses of a sugarcane bagasse power cogeneration system. **Energy Conversion and Management**, v. 222, p. 113232, June 2020.
- CAVKA, A. *et al.* Techno-economic evaluation of conditioning with sodium sulfite for bioethanol production from softwood. **Bioresource Technology**, v. 196, p. 129–135, 2015.
- CHANDEL, A. K, *et al.* Brazilian biorefineries from second generation biomass:critical insights. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 100, p. 1–19, April 2021.
- COLOMBO, A. *et al.* On the effect of calcium lignosulfonate on the rheology and setting time of cement paste. **Cement and Concrete Research**, v. 100, p. 435–444, December 2017.

CONAB – CONSELHO NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**. v. 8 - Safra 2019/20 n.3 - Terceiro levantamento. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar>. Acesso em: 01 dez. 2021.

COSTA, T. H. F. *et al.* Tissue-specific distribution of hemicelluloses in six different sugarcane hybrids as related to cell wall recalcitrance. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2016.

CULABA, A. B. *et al.* Smart Sustainable Biorefineries for Lignocellulosic Biomass. **Bioresource Technology**, p. 126215, 2021.

DE, D. *et al.* Strategic biorefinery platform for green valorization of agro-industrial residues: A sustainable approach towards biodegradable plastics. **Journal of Cleaner Production**, v. 290, p. 125184, 2021.

DEL RÍO, J. C. *et al.* Differences in the chemical structure of the lignins from sugarcane bagasse and straw. **Biomass and Bioenergy**, v. 81, p. 322–338, 2015.

DEL RÍO, J. C. *et al.* Lignin Monomers from beyond the Canonical Monolignol Biosynthetic Pathway: Another Brick in the Wall. **ACS Sustainable Chem. Eng.**, v. 8, p. 4997-5012, 2020.

DEMUNER, I. *et al.* Improving kraft pulp mill sustainability by lignosulfonates production from processes residues. **Journal of Cleaner Production**, v. 317, July, 2021.

DESSBESELL, L. *et al.* Global lignin supply overview and kraft lignin potential as an alternative for petroleum-based polymers. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 123, n. February, p. 109768, 2020.

DONG, X. Q. *et al.* Sugarcane bagasse degradation and characterization of three white-rot fungi. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 443–451, 2013.

DING, N. *et al.* Lignin degradation in cooking with active oxygen and solid Alkali process: A mechanism study. **Journal of Cleaner Production**, v. 278, p. 123984, 2021.

DU, L. *et al.* A co-production of sugars, lignosulfonates, cellulose, and cellulose nanocrystals from ball-milled woods. **Bioresource Technology**, v. 238, p. 254–262, 2017.

EKEBERG, D. *et al.* Characterisation of lignosulfonates and kraft lignin by hydrophobic interaction chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 565, n. 1, p. 121–128, 2006.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, CORPORATE STATISTICAL DATABASE (FAOSTAT). Sugarcane production in 2018, Crops/Regions/World list/Production Quantity (pick lists). 2019. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>. Acesso em: 10 nov. 2021.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: Chemistry, Ultrastructure reactions**. New York: W. De Gruyter, 1989. p. 613.

- FERRAZ, A. *et al.* Estimating the chemical composition of biodegraded pine and eucalyptus wood by DRIFT spectroscopy and multivariate analysis. **Bioresource Technology**, v.74, p.201-212, 2000.
- FREITAS, J. V *et al.* Industrial Crops & Products Sugarcane biorefineries: potential opportunities towards shifting from wastes to products. **Industrial Crops & Products**, v. 172, p. 114057, September 2021.
- GALL, D. L. *et al.* ScienceDirect Biochemical transformation of lignin for deriving valued commodities from lignocellulose. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 45, p. 120–126, 2017.
- GAO, W.; FATEHI, P. Lignin for polymer and nanoparticle production: Current status and challenges. **Canadian Society for Chemical Engineering**, v.1, p. 2827–2842, February 2019.
- GAO, S. *et al.* Unexpected role of amphiphilic lignosulfonate to improve the storage stability of urea formaldehyde resin and its application as adhesives. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 161, p. 755–762, 2020.
- GIRALDO, P.; TORO, J.; ALZATE, C. The potential use of lignin as a platform product in biorefineries: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 138, p. 110688, November 2021.
- GELLERSTEDT, G. Mechanical Pulping chemistry. In: EK, M.; GELLERSTEDT, G.; HENRIKSSON, G. **Pulp and Paper chemistry and technology**, Vol. 1. Berlin: de Gruyter, 2009.
- GELLERSTEDT, G. Chemistry of Chemical Pulp. In: EK, M.; GELLERSTEDT, G.; HENRIKSSON, G. **Pulping Chemistry and Technology**, Vol.2. Berlin:de Gruyter, 2009.
- GUERRA, A. *et al.* Polymerization of lignin fragments contained in a model effluent by polyphenoloxidases and horseradish peroxidase/hydrogen peroxide system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 5–6, p. 315–323, 2000.
- GUTIERREZ, L. *et al.* Assessment of the use of lignosulfonates to separate chalcopyrite and molybdenite by flotation. **Powder Technology**, v. 359, p. 216–225, 2020.
- HATFIELD, R. D.; MARITA, J. M. Enzymatic processes involved in the incorporation of hydroxycinnamates into grass cell walls, **Phytochemistry Reviews**, v.1, n. 1, p.35-45 March 2010.
- HATFIELD, R. D., RANCOUR, D. M., MARITA, J. M. Grass Cell Walls: A Story of Cross-Linking. **Front. Plant Sci**, v.7, p. 2056, 2017.
- HE, W.; FATEHI, P. Preparation of sulfomethylated softwood kraft lignin as a dispersant for cement admixture. **RSC Adv.**, v. 5, n. 58, p. 47031–47039, 2015.
- HE, L.; TERASHIMA, N. Formation and Structure of Lignin in Monocotyledons. **Holzforschung**, v. 45, n. 3, p. 191–198, 1991.

HE, W.; ZHANG, Y.; FATEHI, P. C Sulfomethylated kraft lignin as a flocculant for cationic dye. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 503, p. 19–27, 2016.

HENRIKSSON, G. Lignin. In: EK, M.; GELLERSTEDT, G.; HENRIKSSON, G. **Wood chemistry and biotechnology**. Berlin: de Gruyter, 2009.

HIJOSA-VALSERO, M.; GARITA-CAMBRONERO, J.; PANIAGUA-GARCÍA, A. I. A global approach to obtain biobutanol from corn stover. **Renewable Energy**, v. 148, p. 223–233, 2020.

HIMMEL, M. E. *et al.* Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. **Science**. New York, N.Y., v. 315, n. 5813, p. 804–807, 2007.

HODÁSOVÁ, E. *et al.* Lignin, potential products and their market value. **Wood research**, v. 60, n. 2003, p. 973–986, 2015.

HU, L. *et al.* Synthesis of foaming resol resin modified with oxidatively degraded lignosulfonate. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 364–366, 2013.

HUANG, C. *et al.* Novel process for the coproduction of xylo-oligosaccharides, fermentable sugars, and lignosulfonates from hardwood. **Bioresource Technology**, v. 219, p. 600–607, 2016.

HUMPERT, D.; EBRAHIMI, M.; CZERMAK, P. Membrane Technology for the Recovery of Lignin: A Review. **Membranes**, v. 6, p. 1–13, 2016.

INTERNATIONAL ENERGY AGENCY - BIOENERGY TASK 42. Bio-based Chemicals: Value Added Products from Biorefineries Bioenergy. Disponível em: https://www.nachhaltigwirtschaften.at/resources/pdf/IEA-Task42-Biorefinery_Brochure.pdf. 2009. Acesso em: 20 nov. 2021.

INTERNATIONAL ENERGY AGENCY - BIOENERGY TASK 42. **Sustainable Lignin Valorisation**. Disponível em: <https://task42.ieabioenergy.com/ieaevent/webinar-sustainable-lignin-valorisation/>. 2021. Acesso em: 01 nov. 2021.

JÖNSSON, L.; ALRIKSSON, B.; NILVEBRANT, N. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. **Biotechnology for Biofuels**, v. 21, n. 12, p. 10, 2013.

KALAMI, S. *et al.* Replacing 100 % of phenol in phenolic adhesive formulations with lignin. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 45124, p. 1–9, 2017.

KAUFMAN, T. S. The Multiple Faces of Eugenol. A Versatile Starting Material and Building Block for Organic and Bio-Organic Synthesis and a Convenient Precursor Toward Bio-Based Fine Chemicals. **J. Braz. Chem. Soc**, v. 26, n. 6, p. 1055–1086, 2015.

KAUR, N. *et al.* Review on neoteric biorefinery systems from detritus lignocellulosic biomass: A profitable approach. **Journal of Cleaner Production**, v. 256, p. 120607, 2020.

KAZZAZ, A. E.; FEIZI, Z. H.; FATEHI, P. Grafting strategies for hydroxy groups of lignin for producing materials. **Green Chemistry**, v. 21, p. 5714–5752, 2019.

KLEIN, B. C. *et al.* Beyond ethanol, sugar, and electricity: a critical review of product diversification in Brazilian sugarcane mills. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 13, p. 809–821, 2019.

KONDURI, M. K. R.; FATEHI, P. Production of water-soluble hardwood kraft lignin via sulfomethylation using formaldehyde and sodium sulfite. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 3, n. 6, p. 1172–1182, 2015.

KUN, D.; PUKÁNSZKY, B. Polymer/lignin blends: Interactions, properties, applications. **European Polymer Journal**, v. 93, p. 618–641, April 2017.

LAURITO-FRIEND, D. F. *et al.* Sugarcane hybrids with original low lignin contents and high field productivity are useful to reach high glucose yields from bagasse. **Biomass and Bioenergy**, v. 75, p. 65–74, 2015.

LEBO, S. E. *et al.* Recent Advances in the Characterization of Lignosulfonates. In: HU, T. (Ed.). **Characterization of Lignocellulosic Materials**. 1st ed. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2008. p. 189–203.

LEITÃO, R. C. *et al.* Produção de Lignosulfonatos a partir da Lignina Extraída do Bagaço da Cana-de-açúcar. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2017. 3 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico, 228).

LEITE, R. *et al.* Solvent-fractionated sugar cane bagasse lignin: structural characteristics and electro-spinnability. **e-Polymers**, v. 16, n. 2, p. 137–144, 2016.

LI, Q. *et al.* Comparison of different alkali-based pretreatments of corn stover for improving enzymatic saccharification. **Bioresource Technology**, v. 125, p. 193–199, 2012.

LIN, S.; DENCE, C. (EDS.). **Methods in Lignin Chemistry**. 1st ed. Berlin: Springer-Verlag, 1992.

LIN, M. *et al.* Industrial Crops & Products Revealing the structure-activity relationship between lignin and anti-UV radiation. **Industrial Crops & Products**, v. 174, p. 114212, July 2021.

LIU, L. *et al.* Simultaneously separation of xylo-oligosaccharide and lignosulfonate from wheat straw magnesium bisulfite pretreatment spent liquor using ion exchange resin. **Bioresource Technology**, v. 249, p. 189–195, July 2018.

LIU, Q. *et al.* Potassium lignosulfonate as a washing agent for remediating lead and copper co-contaminated soils. **Science of the Total Environment**, v. 658, p. 836–842, 2019.

LIU, Y.; WANG, J.; WOLCOTT, M. P. Evaluating the effect of wood ultrastructural changes from mechanical treatment on kinetics of monomeric sugars and chemicals production in acid bisulfite treatment. **Bioresource Technology**, v. 226, p. 24–30, 2017.

LIU, Y. Y. *et al.* Reinforced alkali-pretreatment for enhancing enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. **Fuel Processing Technology**, v. 143, p. 1–6, 2016.

LORQUIN, F. *et al.* Lignosulfonate is an efficient SPF booster: Application to eco-friendly sunscreen formulations. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 24, p. 100539, 2021.

MACHADO, A. DA S.; FERRAZ, A. Biological pretreatment of sugarcane bagasse with basidiomycetes producing varied patterns of biodegradation. **Bioresource Technology**, v. 225, p. 17–22, 2017.

MACHADO, A. S. *et al.* The Secretome of *Phanerochaete chrysosporium* and *Trametes versicolor* Grown in Microcrystalline Cellulose and Use of the Enzymes for Hydrolysis of Lignocellulosic Materials. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 1–15, July 2020.

MANSOURI, N. El; FARRIOL, X.; SALVADO, J. Structural Modification and Characterization of Lignosulfonate by a Reaction in an Alkaline Medium for Its Incorporation into Phenolic Resins, **Journal of Applied Polymer Science**, v. 16, p. 8-16, 2006.

MARTÍNEZ, V.; MITJANS, M.; VINARDELL, M. Pharmacological Applications of Lignins and Lignins Related Compounds: An Overview. **Current Organic Chemistry**, v. 16, n. 16, p. 1863–1870, 2012.

MANDLEKAR, N. *et al.* An Overview on the Use of Lignin and Its Derivatives in Fire Retardant Polymer Systems. In: POLETTO, M. **Lignin: Trends and Applications**, Intechopen, 2018.

MASARIN, F. *et al.* Chemical composition and enzymatic digestibility of sugarcane clones selected for varied lignin content. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, p. 55, 2011.

MATSUSHITA, Y. Conversion of technical lignins to functional materials with retained polymeric properties. **Journal of Wood Science**, v. 61, n. 3, p. 230–250, 2015.

MENDES, F. M. *et al.* Enzymatic hydrolysis of chemithermomechanically pretreated sugarcane bagasse and samples with reduced initial lignin content. **Biotechnology Progress**, v. 27, n. 2, p. 395–401, 2011.

MENDES, F. M. *et al.* Enzymatic digestion of alkaline-sulfite pretreated sugar cane bagasse and its correlation with the chemical and structural changes occurring during the pretreatment step. **Biotechnology Progress**, v. 29, n. 4, p. 890–895, 2013.

MENDES, F. M. *et al.* Topochemical characterization of sugar cane pretreated with alkaline sulfite. **Industrial Crops and Products**, v. 69, p. 60–67, 2015.

MENDES, F. M. *et al.* Anatomic and Ultrastructural Characteristics of Different Regions of Sugar Cane Internodes Which Affect Their Response to Alkaline-Sulfite Pretreatment and Material Recalcitrance. **Energy and Fuels**, v. 30, n. 2, p. 1078–1084, 2016.

MENDES, F. M. *et al.* Techno-economic impacts of varied compositional profiles of sugarcane experimental hybrids on a biorefinery producing sugar, ethanol and electricity. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 125, p. 72–78, 2017.

MENDES, F. M. *et al.* Alkaline sulfite pretreatment for integrated first and second generation ethanol production: A techno-economic assessment of sugarcane hybrids. **Biomass and**

Bioenergy, v. 119, p. 314–321, September 2018.

MESQUITA, J. F.; FERRAZ, A.; AGUIAR, A. Alkaline-sulfite pretreatment and use of surfactants during enzymatic hydrolysis to enhance ethanol production from sugarcane bagasse. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 39, n. 3, p. 441–448, 2016.

MEGIATTO, J. D.; CERRUTTI, B. M.; FROLLINI, E. International Journal of Biological Macromolecules Sodium lignosulfonate as a renewable stabilizing agent for aqueous alumina suspensions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 927–932, 2016.

MYRVOLD, B. O. A new model for the structure of lignosulfonates. Part 1. Behaviour in dilute solutions. **Industrial Crops and Products**, v. 27, n. 2, p. 214–219, 2008.

NANDAL, P.; ARORA, A.; VIRMANI, S. Biomass and Bioenergy An appraisal on valorization of lignin: A byproduct from biorefineries and paper industries. **Biomass and Bioenergy**, v. 155, n. October, p. 106295, 2021.

OLIVEIRA, J. S. S. *et al.* Microwave-assisted ultraviolet digestion of petroleum coke for the simultaneous determination of nickel, vanadium and sulfur by ICP-OES. **Talanta**, v. 144, p. 1052–1058, 2015.

PENG, F. *et al.* Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 4, p. 879–903, 2012.

PUTRO, J. N. *et al.* Pretreatment and conversion of lignocellulose biomass into valuable chemicals. **RSC Adv.**, v. 6, n. 52, p. 46834–46852, 2016.

REINOSO, F. A. M. *et al.* Fate of p-hydroxycinnamates and structural characteristics of residual hemicelluloses and lignin during alkaline-sulfite chemithermomechanical pretreatment of sugarcane bagasse. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 1–12, 2018.

RESHMY, R. *et al.* Updates on high value products from cellulosic biorefinery. **Fuel**, v. 308, n. September 2021, p. 122056, 2021.

REZANIA, S. *et al.* Different pretreatment technologies of lignocellulosic biomass for bioethanol production: An overview. **Energy**, v. 199, p. 117457, 2020.

RUTTEN, C.; RAMÍREZ, A.; POSADA DUQUE, J. Hydrotreating and hydrothermal treatment of alkaline lignin as technological valorization options for future biorefinery concepts: a review. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 92, n. 2, p. 257–270, 2017.

SALVACHÚA, D. *et al.* Fungal pretreatment: An alternative in second-generation ethanol from wheat straw. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 16, p. 7500–7506, 2011.

SARTORI, G. P. *et al.* Industrial Crops & Products An innovative concept for industrial sugarcane processing enhances polysaccharide utilization in first- and second-generation integrated biorefineries. **Industrial Crops & Products**, v. 141, p. 111801, September 2019.

SHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, n.

1, p. 263–289, 2010.

SHAH, M. Y.; AHMAD, S. Progress in Organic Coatings Waterborne vegetable oil epoxy coatings : Preparation and characterization. **Progress in Organic Coatings**, v. 75, n. 3, p. 248–252, 2012.

SHIMIT et al. Determinação do poder aglutinante do lignosulfonato sobre a peletização. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2004. 3 p. (Embrapa Suínos e Aves. Comunicado Técnico, 368).

SINGH, A. K.; SAHOO, J. P. Undrained cyclic loading response of lignosulfonate treated high plastic clay. **Soil Dynamics and Earthquake Engineering**, v. 150, p. 106943, September 2021.

SIQUEIRA, G. et al. Limitation of cellulose accessibility and unproductive binding of cellulases by pretreated sugarcane bagasse lignin. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2017.

SIVAGURUNATHAN, P. *et al.* 2G waste lignin to fuel and high value-added chemicals: Approaches, challenges and future outlook for sustainable development. **Chemosphere**, v. 268, p. 129326, 2021.

SLUITER, A., HAMES, B., RUIZ, R., SCARLATA, C., SLUITER, J., TEMPLETON, D. **Determination of Ash in Biomass**. National Renewable Energy Laboratory (NREL), 2005. p. 1-8.

SJOSTROM, E. **Wood chemistry fundamentals and applications**. San Diego: academic press, 1993.

TAVARES, J. *et al.* Hydrothermal alkaline sulfite pretreatment in the delivery of fermentable sugars from sugarcane bagasse. **New Journal of Chemistry**, v. 42, n. 6, p. 4474–4484, 2018.

TA'NEGONBADI, B.; NOORZAD, R. Stabilization of clayey soil using lignosulfonate. **Transportation Geotechnics**, v. 12, p. 45–55, 2017.

TOLBERT, A *et al.* Characterization and analysis of the molecular weight of lignin for biorefining studies. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 6, n. 3, p. 246–256, 2014.

TOPÇU, İ. B.; ATEŞİN, Ö. Effect of high dosage lignosulfonate and naphthalene sulphonate based plasticizer usage on micro concrete properties. **Construction and Building Materials**, v. 120, p. 189–197, 2016.

TRIBOT, A. *et al.* Wood-lignin: Supply, extraction processes and use as bio-based material. **European Polymer Journal**, v. 112, 2018.

TORRES, L. A. *et al.* Lignin as a potential source of high-added value compounds: A review. **Journal of Cleaner Production**, v. 263, 2020.

VANHOLME, R. *et al.* ScienceDirect Lignin biosynthesis and its integration into metabolism. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 56, p. 230–239, 2019.

- VASCONCELOS, M. H. *et al.* Techno-economic assessment of bioenergy and biofuel production in integrated sugarcane biorefinery: Identification of technological bottlenecks and economic feasibility of dilute acid pretreatment. **Energy**, v. 199, 2020.
- VERGARA, P. *et al.* Wheat straw fractionation by ethanol-water mixture: Optimization of operating conditions and comparison with diluted sulfuric acid pre-treatment. **Bioresource Technology**, v. 256, p. 178–186, 2018.
- VIDAL, C. *et al.* Sulfomethylation of radiata pine kraft lignin and its use as a molybdenite depressant in selective chalcopyrite-molybdenite separation by flotation. **BioResources**, v. 16, p. 5646-5666, 2021.
- VINARDELL, M. P.; UGARTONDO, V.; MITJANS, M. Potential applications of antioxidant lignins from different sources. **Industrial Crops and Products**, v. 27, n. 2, p. 220–223, 2008.
- VISHTAL, A.; KRASLAWSKI, A. Challenges in industrial applications of technical lignins. **Bioresources**, v. 6, p. 3547–3568, 2011.
- WANG, J. *et al.* Impact of lignin content on alkaline-sulfite pretreatment of Hybrid Pennisetum. **Bioresource Technology**, v. 267, p. 793–796, July 2018.
- WEXLER, A. Characterization of liginosulfonates by Ultraviolet spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 36, p. 213-221. 1963.
- WOICIECHOWSKI, L. *et al.* Lignocellulosic biomass: Acid and alkaline pretreatments and their effects on biomass recalcitrance – Conventional processing and recent advances. **Bioresource Technology**, v. 304, p. 122848, October 2020.
- XU, H. *et al.* Effect and characterization of sodium liginosulfonate on alkali pretreatment for enhancing enzymatic saccharification of corn stover. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 638–646, 2015.
- YAMINI, G. *et al.* Cyclocarbonated liginosulfonate as a bio-resourced reactive reinforcing agent for epoxy biocomposite: From natural waste to value-added bio- additive. **Journal of CO₂ Utilization**, v. 24, p. 50–58, November 2018.
- YAMINI, G. *et al.* Cure kinetics of modified liginosulfonate/epoxy blends. **Thermochimica Acta**, v. 675, p. 18–28, November 2019.
- ZAKARIA, M. R.; HIRATA, S.; HASSAN, M. A. Combined pretreatment using alkaline hydrothermal and ball milling to enhance enzymatic hydrolysis of oil palm mesocarp fiber. **Bioresource Technology**, v. 169, p. 236–243, 2014.
- ZAKZESKI, J. *et al.* The Catalytic Valorization of Lignin for the Production of Renewable Chemicals, **Chem. Rev.**, v.110, p. 3552–3599, 2010.
- ZINOVYEV, G. *et al.* Getting Closer to Absolute Molar Masses of Technical Lignins. **ChemSusChem**, v. 11, n. 18, p. 3259–3268, 2018.

ZHANG, H. *et al.* Color reduction of sulfonated eucalyptus kraft lignin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 97, p. 201–208, 2017.

ZHANG, H. *et al.* Novel lignin-containing high-performance adhesive for extreme environment. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 1832–1839, 2020.

ZHANG, G. *et al.* Acid-catalyzed hydrolysis of conifer liginosulfonate in black liquor for the production of value-added chemicals. **Applied Catalysis A: General**, v. 542, p. 1–9, April 2017.

ZHAO, S.; ABU-OMAR, M. M. Catechol-Mediated Glycidylation toward Epoxy Vitrimers/Polymers with Tunable Properties. research-article. **Macromolecules**, v. 52, p. 3646–3654, 2019.

ZHANG, F. *et al.* Preparation of chitosan/lignosulfonate for effectively removing Pb(II) in water. **Polymer**, v. 228, p. 123878, May 2021.

ZHU, G. *et al.* Sodium Benzenesulfonate-Assisted Preparation of Lignosulfonate-Based Spherical Micelles: Insights from Mesoscopic Simulations. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 10, n. 6, p. 2262–2270, 2022.

ZHOU, H. *et al.* High Titer Ethanol and Lignosulfonate Production from SPORL Pretreated Poplar at Pilot Scale. **Frontiers in Energy Research**, v. 3, p. 1–9, April 2015.

ZHOU, H. *et al.* Pilot-scale demonstration of SPORL for bioconversion of lodgepole pine to bioethanol and lignosulfonate. **Holzforschung**, v. 70, n. 1, p. 21–30, 2016.

ZHU, J. Y. *et al.* Sulfite pretreatment (SPORL) for robust enzymatic saccharification of spruce and red pine. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 8, p. 2411–2418, 2009.