
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA APLICADA

**FRACIONAMENTO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR EM XILANA, LIGNINA
E AÇÚCAR FERMENTÁVEL VIA PROCESSO ORGANOSOLV EM MEIO
ALCALINO**

FILIPPI DE OLIVEIRA CARDOSO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Michel Brienzo

Rio Claro 2020

FILIPI DE OLIVEIRA CARDOSO

**FRACIONAMENTO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR EM XILANA, LIGNINA
E AÇÚCAR FERMENTÁVEL VIA PROCESSO ORGANOSOLV EM MEIO
ALCALINO**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Michel Brienzo

Rio Claro 2020

C268f Cardoso, Filipi de Oliveira
Fracionamento do bagaço de cana-de-açúcar em xilana, lignina e
açúcar fermentável via processo organosolv em meio alcalino / Filipi
de Oliveira Cardoso. -- Rio Claro, 2020
66 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientador: Michel Brienzo

1. Organosolv. 2. Hemicelulose. 3. Lignina. 4. Pré-Tratamento. 5.
Bagaço de Cana-de-açúcar. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de
Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: FRACIONAMENTO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR EM XILANA, LIGNINA E AÇÚCAR FERMENTÁVEL VIA PROCESSO ORGANOSOLV

AUTOR: FILIPI DE OLIVEIRA CARDOSO

ORIENTADOR: MICHEL BRIENZO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), área: Microbiologia Aplicada pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. MICHEL BRIENZO (Participação Virtual)
Laboratório de Caracterização de Biomassa / IPBEN - Rio Claro



Profa. Dra. FERNANDA PERPETUA CASCIATORI (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia Química / Universidade Federal de São Carlos



Prof. Dr. PAULO RENATO MATOS LOPES (Participação Virtual)
x / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena - UNESP



Rio Claro, 27 de outubro de 2020

*Esse trabalho é dedicado à minha
família e amigos por todo apoio e
alegrias compartilhadas.
E a um amigo especial, Paulo
Varuzza (in memoriam), que sempre
me apoiou nesse sonho.*

AGRADECIMENTOS

Nesses anos de mestrado, de muito estudo, esforço e dedicação, gostaria de agradecer a algumas pessoas que me acompanharam e foram fundamentais para a realização de mais este sonho.

Ao meu orientador: Professor Dr. Michel Brienzo, pela oportunidade, confiança, dedicação, paciência e todos os ensinamentos.

Aos meus pais: Alice e Josuel, por me apoiarem em todos os momentos e por tudo que eles sempre fizeram e fazem por mim.

Aos meus irmãos: João Paulo e Luiz Henrique por toda ajuda e companheirismo.

Para todos os meus amigos que são tão importantes para mim e me deram total apoio nos momentos de dificuldade.

Aos colegas de laboratório pelos ensinamentos e a toda a equipe do IPBEN pelo suporte oferecido e conhecimentos compartilhados.

Para o Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Aplicada e o Instituto de Pesquisa em Bioenergia pela oportunidade.

E a todos os que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste estudo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

ABSTRACT

From the lignocellulosic biomass, value-added products can be selected, which can be used in the industrial and biofuels sector. Its main composition is made of cellulose, hemicellulose and lignin. However, this biomass requires a pre-treatment step for the fractionation of its components to occur. To carry out this fractionation and promote the recovery of these components, the strategy defined was the pre-treatment with organic solvent and an alkaline reagent, characterizing the organosolv process. The objective was to promote the separation of xylan, in addition to obtaining lignin, which is the main product of the organosolv process and fermentable sugars. Pretreatments were carried out in an alkaline medium following an experimental design (sodium hydroxide of 3% to 8% mass of base per mass of material, from 120 °C to 180 ° C, solvent from 30% to 70%, and 25 65 min of reaction). The separation of xylan and lignin was carried out through changes in the traditional process: after heat treatment, xylan was precipitated by the addition of 100 ml of ethanol and the lignin was subsequently precipitated with acidification of the medium. The test that shows the best result for excluding xylan was exposed to 180 °C, 65 min, 30% solvent and 8% sodium hydroxide. This condition resulted in an 88% recovery of xylan. The test that presents the best result for the separation of lignin (97%) had the following conditions as parameters: 150 °C, 45 min, 50% solvent and 5.5% sodium hydroxide. In this condition, 73% xylan was established, which was indicated as the most suitable for joint recovery of xylan and lignin. For the recovery of fermentable sugars, the best recovery occurred under the following conditions: 120 °C, 65 min, 3% sodium hydroxide and 30% solvent. The concentration of sodium hydroxide was the variable of greatest influence in the recovery of the three components, ethanol stood out as a relevant parameter in the selectivity of the components, since the greater the amount of ethanol, the greater the recovery of lignin, high ethanol is determined impairs the recovery of hemicellulose. A condition that proved to be ideal for the recovery of the three components was that of the central point: 150 °C, 45 min, 50% solvent and 5.5% sodium hydroxide. Under these conditions, the recovery of lignin 97%, xylan 73% and fermentable sugars 87%.

Keywords: Biomass, sugar cane, alkaline pretreatment, organosolv, lignin extraction, hemicellulose extraction.

RESUMO

A partir da biomassa lignocelulósica podem ser obtidos produtos de valor agregado, que podem ser empregados no setor industrial e de biocombustíveis. Sua composição majoritária se dá por celulose, hemicelulose e lignina. Entretanto, essa biomassa necessita de uma etapa de pré-tratamento para que ocorra o fracionamento dos seus componentes. Para realizar esse fracionamento e promover a recuperação desses componentes a estratégia definida foi o pré-tratamento com solvente orgânico e um reagente alcalino, caracterizando o processo organosolv. O objetivo foi promover a separação da xilana, além de obter lignina, a qual é o principal produto do processo organosolv e açúcares fermentáveis. Os pré-tratamentos foram realizados em meio alcalino seguindo um planejamento experimental (hidróxido de sódio de 3 % a 8 % massa de base por massa de material, de 120 °C a 180 °C, solvente de 30 % a 70 %, e de 25 a 65 min de reação). A separação da xilana e lignina foi efetuada através de mudanças no processo tradicional: após o tratamento térmico a xilana foi precipitada através da adição de 100 mL de etanol e a lignina foi posteriormente precipitada com a acidificação do meio. O ensaio que apresentou o melhor resultado para precipitação da xilana foi exposto a 180 °C, 65 min, 30 % de solvente e 8 % de hidróxido de sódio. Esta condição resultou em uma recuperação de 88 % de xilana. O ensaio que apresentou o melhor resultado para precipitação da lignina (97 %) teve como parâmetros as seguintes condições: 150 °C, 45 min, 50 % solvente e 5,5 % de hidróxido de sódio. Nesta condição foi obtido 73 % de xilana, o que foi indicado como mais adequado para recuperação em conjunto de xilana e lignina. Para a recuperação de açúcares fermentáveis a melhor recuperação ocorreu nas seguintes condições: 120 °C, 65 min, 3% de hidróxido de sódio e 30% de solvente. A concentração de hidróxido de sódio foi a variável de maior influência na recuperação dos três componentes, o etanol se mostrou um parâmetro relevante na seletividade dos componentes, uma vez que quanto maior a quantidade de etanol, maior a recuperação da lignina, entretanto concentrações de etanol elevadas prejudica a recuperação de hemicelulose. Uma condição que se mostrou ideal para a recuperação dos três componentes foram as do ponto central: 150 °C, 45 min, 50% de solvente e 5,5 % de hidróxido de sódio. Nessas condições a recuperação da lignina 97 %, da xilana 73 % e de açúcares fermentáveis 87 %.

Palavras-chave: Biomassa, cana-de-açúcar, pré-tratamento alcalino, organosolv, extração de lignina, extração de hemicelulose.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação da estrutura de uma parede celular de biomassa lignocelulósica. A) Parede celular contendo microfibrilas de celulose, hemicelulose, pectina, lignina e proteínas solúveis. B) As enzimas celulose sintase estão na forma de complexos de roseta, que flutuam na membrana plasmática. C) A lignificação ocorre nas camadas S1, S2 e S3 da parede celular.

Figura 2: Representação da macromolécula de celulose e interações entre cadeias.

Figura 3: Diferentes visões do modo de distribuição da celulose cristalina e amorfa.

Figura 4 – Principais componentes da hemicelulose: (1) D-glucose, (2) D-galactose, (3) L-arabinose, (4) D-xilose, (5) D-manose, (6) 4-O-metil-D-glucurônico.

Figura 5: Álcoois que formam a lignina - a) álcool cumarílico; b) álcool sinaléptico; e c) álcool coniferílico

Figura 6: Ação do pré-tratamento na biomassa lignocelulósica.

Figura 7 – Fluxograma que descreve as etapas do processo organosolv.

Figura 8: Bagaço de cana de açúcar.

Figura 9: Fluxograma com o processo de pré-tratamento organosolv

Figura 10: Superfície de resposta do planejamento composto central rotacional (estrela) para avaliação do processo organosolv na produção de xilana, na interação entre hidróxido de sódio e temperatura (A). Gráfico de contorno contendo o mesmo centro rotacional da superfície de resposta (B).

Figura 11: Superfície de resposta do planejamento composto central rotacional (estrela) para avaliação do processo organosolv na produção de xilana com as variáveis temperatura e tempo (A). Gráfico de contorno contendo o mesmo centro rotacional da superfície de resposta (B).

Figura 12: Superfície de resposta do planejamento composto central rotacional (estrela) para avaliação do processo organosolv na produção de xilana, com as variáveis tempo e hidróxido de sódio (A). Superfície de contorno contendo o mesmo centro rotacional da superfície de resposta (B).

Figura 13: Superfície de resposta na interação entre hidróxido de sódio e solvente no Planejamento composto central rotacional (estrela) para avaliação do processo organosolv na produção de lignina (A). Superfície de contorno contendo o mesmo centro rotacional da superfície de resposta (B).

Figura 14: Superfície de resposta de temperatura e solvente no planejamento composto central rotacional (estrela) para avaliação do processo organosolv na produção de lignina (A). Superfície de contorno contendo o mesmo centro rotacional da superfície de resposta (B).

Figura 15: Superfície de resposta entre temperatura e hidróxido de sódio no Planejamento composto central rotacional (estrela) para avaliação do processo organosolv na produção de lignina (A). Superfície de contorno contendo o mesmo centro rotacional da superfície de resposta (B).

Figura 16: Espectro do infravermelho aplicada para identificação de lignina.

Figura 17: Espectro do infravermelho aplicada para identificação da hemicelulose.

Figura 18: Gráfico de Pareto para a seletividade de extração de xilana.

Figura 19: Superfície de resposta entre tempo e solvente no planejamento composto central rotacional (estrela) para avaliação da seletividade de extração de xilana (A). Gráfico de contorno contendo o mesmo centro rotacional da superfície de resposta (B).

Figura 20: Superfície de resposta na interação entre hidróxido de sódio e solvente no Planejamento composto central rotacional (estrela) para avaliação do processo organosolv no rendimento de glicose(A). Gráfico de contorno contendo o mesmo centro rotacional da superfície de resposta (B).

Figura 21: Superfície de resposta na interação entre temperatura e solvente no Planejamento composto central rotacional (estrela) para avaliação do processo organosolv no rendimento de glicose (A). Superfície de contorno contendo o mesmo centro rotacional da superfície de resposta (B)

Figura 22: Superfície de resposta na interação entre tempo e solvente no Planejamento composto central rotacional (estrela) para avaliação do processo organosolv no rendimento de glicose (A). Superfície de contorno contendo o mesmo centro rotacional da superfície de resposta (B).

Figura 23: Superfície de resposta na interação entre temperatura e reagente no Planejamento composto central rotacional (estrela) para avaliação do processo organosolv no rendimento de glicose (A). Superfície de contorno contendo o mesmo centro rotacional da superfície de resposta (B)

Figura 24: Superfície de resposta na interação entre tempo e reagente no Planejamento composto central rotacional (estrela) para avaliação do processo organosolv no rendimento de glicose (A). Superfície de contorno contendo o mesmo centro rotacional da superfície de resposta (B).

Figura 25: Superfície de resposta na interação entre tempo e temperatura no Planejamento composto central rotacional (estrela) para avaliação do processo organosolv no rendimento de glicose. B: Superfície de contorno contendo o mesmo centro rotacional da superfície de resposta.

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Planejamento e otimização dos experimentos em processo organosolv.

Tabela 02: Recuperação de massa, xilana e lignina no processo organosolv.

Tabela 03: ANOVA para o rendimento de extração de xilana no planejamento composto central rotacional (estrela) do processo organosolv.

Tabela 04: ANOVA para o rendimento de extração de lignina no planejamento composto central rotacional (estrela) do processo organosolv.

Tabela 05 – Composição química do bagaço in natura e material após o pré-tratamento organosolv para produção de xilana e lignina.

Tabela 06: Rendimento de extração de xilana e lignina obtido em comparação ao rendimento teórico.

Tabela 07 – Concentração e rendimento em glicose gerada após a hidrólise enzimática do material pré-tratado.

Tabela 08: Tabela ANOVA para o rendimento de glicose no planejamento composto central rotacional (estrela) do processo organosolv.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	9
2.	OBJETIVOS.....	10
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
3.1	CANA DE AÇÚCAR.....	11
3.2	MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS.....	12
3.3	CELULOSE.....	13
3.4	HEMICELULOSE.....	15
3.5	LIGNINA.....	16
3.6	PRÉ-TRATAMENTO ORGANOSOLV.....	17
4	METODOLOGIA.....	21
4.1	PREPARO DA BIOMASSA.....	21
4.2	PRÉ TRATAMENTO ORGANOSOLV.....	22
4.3	ETAPAS DO PRÉ TRATAMENTO.....	23
4.4	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA.....	25
4.5	DETERMINAÇÃO DE LIGNINA SOLÚVEL.....	26
4.6	DETERMINAÇÃO DA LIGNINA INSOLÚVEL.....	26
4.7	DETERMINAÇÃO DA PORCENTAGEM DE AÇÚCARES.....	27
4.8	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.....	27
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
4.10	ANÁLISE INFRAVERMELHO (FT-IR).....	27
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
5.1	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS MATERIAIS PRÉ-TRATADOS, LIGNINA E XILANA.....	39
5.2	VALIDAÇÃO DO MODELO.....	42
5.3	RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO DE XILANA EM RELAÇÃO A LIGNINA (SELETIVIDADE).....	42
5.4	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.....	45
6	CONCLUSÃO.....	54
7	REFERÊNCIAS.....	55

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.

Em função da elevada dependência dos combustíveis fósseis, qualquer redução na disponibilidade atual de petróleo e seus derivados pode levar a uma crise mundial de energia. Além disso, a cada ano o planeta apresenta novos problemas relacionados ao aquecimento global, que está diretamente ligado à emissão de gases de efeito estufa provenientes da queima de combustíveis fósseis (ALVES, 2014). Portanto, são necessárias alternativas para que se possa reduzir tal dependência e os impactos ambientais relacionado ao uso do petróleo. Isso representa uma oportunidade para reorganizar o sistema energético e reduzir a dependência do mercado de petróleo, otimizando e aumentando a participação de fontes renováveis. Da mesma forma, existe a necessidade de substituir matéria prima para derivados de petróleo. Neste cenário, a biomassa é apresentada como fonte de açúcares fermentáveis, polissacarídeos e lignina.

O combustível renovável mais utilizado atualmente é o etanol proveniente da biomassa, sua produção é feita utilizando o amido, proveniente do milho e a sacarose, derivada da cana de açúcar. Logo, a conversão da biomassa em biocombustíveis, tais como etanol e biodiesel, tem sido considerada um caminho atraente para o fornecimento atual e futuro de combustíveis. Já os componentes macromoleculares da biomassa, xilana e lignina, são de interesse industrial, por serem matéria prima para diversos produtos.

No Brasil, o cultivo de cana-de-açúcar ocupa o terceiro lugar em área plantada, estima-se que para a safra 2020/2021 a área de plantio será de aproximadamente 8 milhões de hectares o equivalente a 74.217 kg/ha (CONAB, 2019). O processo de extração de açúcar na usina gera como principais resíduos o bagaço e a palha, os quais são materiais lignocelulósicos. As principais características dos materiais lignocelulósicos são a sua abundância e a renovabilidade, através dele é possível fabricar combustíveis e produtos químicos semelhantes aos derivados de petróleo.

Após o processamento, aproximadamente 140 kg de bagaço (massa seca) são gerados por tonelada de cana-de-açúcar (CARRASCO et al., 2010). O bagaço resultante desse processamento tem sido utilizado na cogeração de energia dentro das próprias usinas. Entretanto, há aplicações biotecnológicas que utiliza esse resíduo agroindustrial com o objetivo de produzir moléculas de maior valor agregado que podem ser utilizadas na produção de biocombustíveis como o etanol de segunda geração (MELATI et al., 2017)

Tanto a lignina quanto a hemicelulose, presentes no bagaço e na palha, são macromoléculas de interesse industrial, sendo considerados matéria prima para diversos

produtos. Logo, faz-se necessário determinar as condições técnicas que levem a extração/separação tanto da hemicelulose, quanto da lignina, pois são produtos com aplicabilidade industrial. Neste estudo, a hemicelulose tem uma maior atenção, pois será empregado um método eficiente para extração de lignina e serão apresentadas algumas modificações para promover a extração de hemicelulose.

As fibras do bagaço da cana contêm teor de: celulose que varia de 32-48 %, hemicelulose que varia de 19-24 % e a de lignina com uma variação de 20-32 % (ROVIERO, 2016). Portanto, uma excelente fonte para extração de hemicelulose e lignina, sendo desejável o aproveitamento de todas as macromoléculas em um conceito de biorrefinaria.

Para que se tenha um melhor aproveitamento do material lignocelulósico faz-se necessário a aplicação de pré-tratamentos para que seja possível a separação destes componentes (celulose, hemicelulose e lignina) (MELATI et al., 2017). Portanto, os processos de deslignificação são necessários para romper o complexo celulose-hemicelulose-lignina e promover o fracionamento da biomassa lignocelulósica. O processo organosolv fundamenta-se no fracionamento da biomassa empregando solventes de origem orgânica em temperaturas elevadas, geralmente são usados como solvente o etanol, metanol, acetona e ácidos orgânicos, como o ácido acético e ácido fórmico (WILD et al, 2015). Para a extração em material como o bagaço de cana, os processos alcalinos apresentam vantagens, pois a extração alcalina solubiliza a lignina contribuindo para a sacarificação enzimática da biomassa promovendo assim um alto rendimento de hexoses (NASCIMENTO et al, 2013). No presente estudo, será solubilizado também a xilana com o processo organosolv.

2. OBJETIVOS

O objetivo desse estudo consistiu no fracionamento da biomassa em lignina e xilana utilizando o pré-tratamento organosolv em meio alcalino. Complementarmente, foi realizado estudo da produção de açúcar fermentável.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar as condições para maximizar extração de lignina no processo organosolv em meio alcalino;
- Avaliar as condições para maximizar a extração e o isolamento da xilana no processo organosolv em meio alcalino;

- Avaliar as condições para maximizar a produção de açúcar fermentável via hidrólise enzimática;
- Obter um pré-tratamento que seja adaptável para qualquer macromolécula que se deseja obter.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CANA DE AÇÚCAR

A cana-de-açúcar é a matéria-prima para dois produtos essenciais da economia mundial: o etanol, utilizado na produção de bebidas alcoólicas e combustíveis; e o açúcar, ingrediente relevante na alimentação humana. A cana-de-açúcar é conhecida por suas características próprias: uma planta de diâmetro fino e de formato cilíndrico, folhas grandes, podendo chegar até 6 metros de altura (NOVA CANA, 2020).

A planta surgiu no sudeste asiático, e se espalhou para o mundo gradualmente, acompanhando a migração do homem. No Brasil a cana-de-açúcar só chegou em 1520, logo após a chegada dos portugueses (1500). O clima tropical e o seu potencial produtivo tornaram o Brasil o maior produtor e consumidor de cana-de-açúcar no mundo, sendo responsável por aproximadamente 40 % de toda produção mundial. Desde que chegou em território brasileiro, seu cultivo se tornou um dos mais importantes desenvolvidos no Brasil. Atualmente, o país ocupa o primeiro lugar no ranking de produção de açúcar e é o maior exportador de etanol do planeta.

A cana-de-açúcar é composta pela epiderme, “capa” fina que reveste o colmo, atuando como impermeabilizante (BRIENZO et al., 2016), bastante lignificada que protege o colmo dos efeitos mecânicos externos, dando sustentação à planta; e na parte interior do colmo se encontra o tecido parenquimatoso, cuja função é armazenar a sacarose (OLIVEIRA, 2010). Imersos dentro desse tecido aparecem vasos que possuem a função de conduzir os nutrientes e produtos produzidos pela planta.

A produção e acúmulo de sacarose tem sua eficiência diretamente ligada ao desempenho fotossintético da planta. A cana-de-açúcar apresenta metabolismo fotossintético C4, que é referido como o mais eficiente para a produção de biomassa, quando comparado à via de fotossíntese C3. Assim, comumente, designa-se a importância econômica da cana-de-açúcar ao seu colmo, por ser a região de armazenamento da sacarose. No entanto, é essencial ressaltar que a celulose presente na parede celular do bagaço resultante da extração do suco, bem como da palha, também apresenta potencial energético (SILVA et al., 2005).

3.2 MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

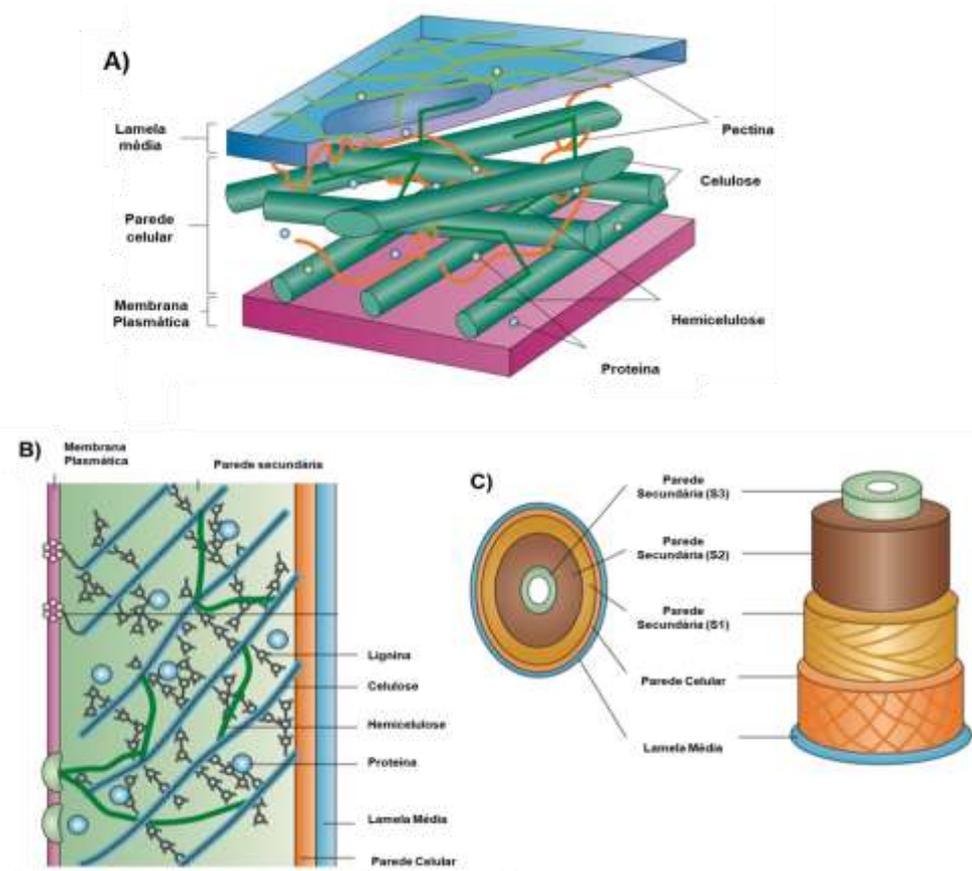
Os materiais lignocelulósicos são estruturas fibrosas e compactas, composto por celulose, hemicelulose e lignina. É o material mais abundantes na natureza, representando aproximadamente 60% da biomassa vegetal. É a principal matéria-prima para a fabricação de biocombustíveis, como por exemplo, o etanol de segunda-geração (2G) ou etanol celulósico (SANTOS 2012).

Os materiais lignocelulósicos podem ser divididos em seis categoria: resíduos agropastoril (bagaço de cana, palha de milho etc.), madeira de lei (álamo alpino e álamo), madeira de conífera (pinheiro e abeto), resíduos celulósicos (papel reciclado, jornais etc.), biomassas herbáceas (feno de alfafa, caniço-malhado etc.) e resíduos sólidos municipais (BARCELOS, 2012).

Esses materiais são constituídos por três principais macromoléculas, celulose, hemicelulose e lignina (SOUSA, 2014). Estas frações garantem a biomassa uma resistência contra ataques de microrganismos e rigidez. A combinação desses elementos forma a microfibrila celulósica e estão unidos por ligações covalentes (FERREIRA, 2010).

São encontrados cerca de 40-60% de celulose, que é o principal componente dos materiais lignocelulósicos. A celulose é polissacarídeo mais abundante na natureza, apresenta função estrutural, proporcionando resistência física às plantas (JEDVERT, 2017). Ainda, 20-40% de hemicelulose e 15-25% de lignina (PEREIRA Jr. et al., 2008), contudo, alguns fatores influenciam na proporção destes componentes, são eles: espécie da planta, tempo de colheita, e condição ou estágio de crescimento (BARCELOS, 2012). Por este motivo se faz necessário conhecer a estrutura e as características da biomassa. Como ilustrado na Figura 01, a estrutura das células vegetais é dividida em: membrana plasmática, lamela média e parede celular. Na parede celular, região externa da célula, é onde está a maior parte do material lignocelulósico, ela é constituída por uma rede de microfibrilas de celulose, que se encontram dispostas como espirais, de forma a proporcionar força e flexibilidade ao material, trançado por cadeias de hemicelulose, que atua como uma rede entre a celulose e a lignina formando assim a estrutura fibrosa. Já a lignina é encontrada nos espaços entre os polissacarídeos, e na lamela média, promovendo a resistência da estrutura a ataques químicos e enzimáticos (CASTRO e PEREIRA, 2010).

Figura 01: Representação da estrutura de uma parede celular de biomassa lignocelulósica. A) Parede celular contendo microfibrilas de celulose, hemicelulose, pectina, lignina e proteínas solúveis. B) As enzimas celulose sintase estão na forma de complexos de roseta, que flutuam na membrana plasmática. C) A lignificação ocorre nas camadas S1, S2 e S3 da parede celular.



Fonte: Sticklen (2008).

Cada biomassa possui uma composição química diferente, com isso o pré-tratamento escolhido deve ser o que promove uma maior recuperação desses componentes, uma vez que a produção de biocombustíveis pelo processo de fermentação age diretamente na porção de açúcares fermentáveis obtidos da celulose e hemicelulose, a lignina acaba por dificultar o acesso das enzimas (SILVA 2010).

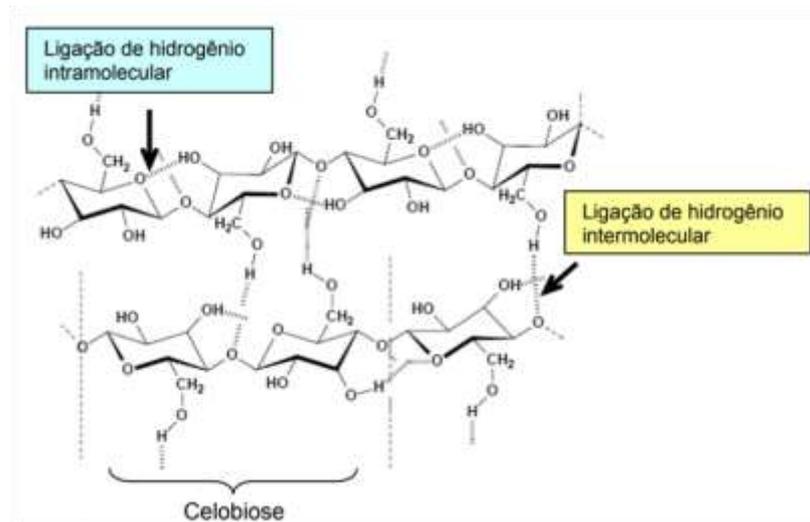
3.3 CELULOSE

A celulose $(C_6H_{10}O_5)_n$ é um polissacarídeo de cadeia longa, formada por moléculas de glicose unidas através de ligações β -1,4-glicosídicas. É constituída por unidades de anidroglicopirranose, organizada em dímeros de celobiose e ordenada linearmente, resultando

em um polissacarídeo de alta massa molecular. Esta macromolécula orgânica apresenta alta importância econômica, e é o componente mais abundante nas células vegetais. Atualmente, possui diversas aplicações industriais, como na fabricação de papel, tecidos, componentes farmacêuticos, produção de biocombustíveis, como o etanol de segunda geração, entre outras (JEDVERT, 2017).

Cadeias de celulose são estabilizadas e ligadas entre si por pontes de hidrogênio intramoleculares, intermoleculares e forças de Van de Waals, que formam regiões cristalinas, , também ocorrem em sua estrutura regiões amorfas menos organizadas promovendo a absorção de água, tornando a celulose macia e flexível (GOLDSTEIN, 1981; FENGEL; WEGENER, 1984; FERREIRA et al., 2009). A Figura 02 ilustra a estrutura de uma cadeia de celulose.

Figura 02: Representação da macromolécula de celulose e interações entre cadeias.



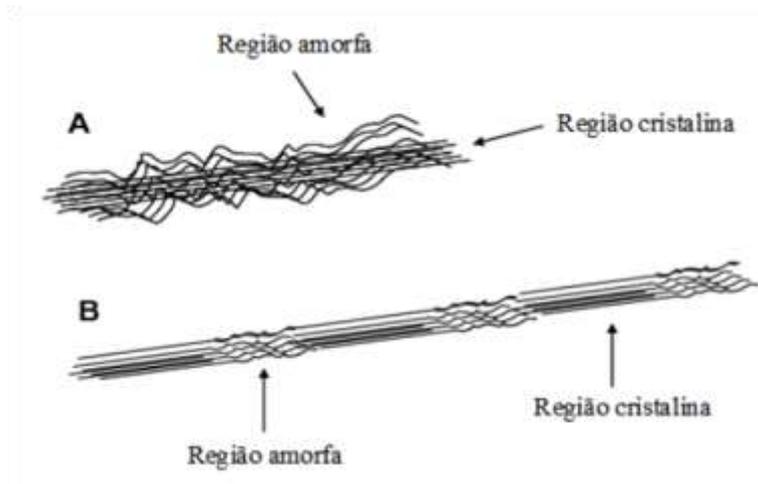
Fonte: Morais, 2005

A cristalinidade e regiões amorfas da celulose ocorrem em diferentes proporções de acordo com a origem da biomassa e tal característica tem influência no ataque enzimático no processo de hidrólise (O'SULLIVAN, 1997). A figura 03 ilustra a interação com as estruturas amorfas e a cristalinidade na celulose. A maioria das regiões amorfas corresponde às cadeias situadas na superfície, enquanto os componentes cristalinos ocupam o seu núcleo (LARSSON et al., 1997). As regiões amorfas e cristalinas não possuem fronteiras bem definidas, mas parece existir uma modificação de um arranjo ordenado das cadeias para um estado desordenado ou amorfo (Ribeiro, 2014).

Assim como o índice de cristalinidade, o grau de polimerização também é uma propriedade relevante para sua classificação. O grau de polimerização informa a frequência

relativa de ligações glicosídicas internas e terminais, disponíveis para atuação de celulases, e pode ser definido com base no número médio de monômeros e na massa molecular média do polissacarídeo, assim como deduzido através da viscosidade (SILVA, 2010).

Figura 03: Diferentes visões do modo de distribuição da celulose cristalina e amorfa.



Fonte: Rabelo, 2010

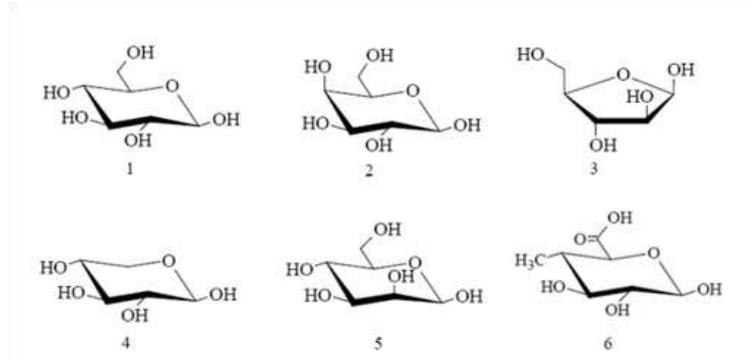
Assim, o índice de cristalinidade e o grau de polimerização, associados ao envoltório de lignina, conferem à macromolécula de celulose grande resistência à hidrólise, representando um grande desafio para a utilização dos materiais lignocelulósicos em aplicações biotecnológicas, como a produção de etanol de segunda geração (ARANTES; SADDLER, 2010).

As fibrilas de celulose, como ilustrado na figura 01, são unidas umas às outras através da hemicelulose, o segundo componente mais abundante nos materiais lignocelulósicos.

3.4 HEMICELULOSE

A hemicelulose é uma classe heterogênea de polissacarídeos, como ilustra a figura 04, representando uma média de 15 a 35 % da biomassa vegetal e que podem conter: pentoses (B-D-xilose, a-L-arabinose); hexoses (β D-manose, β -D-glicose, α -D-galactose); ácidos urônicos (a-D-glucurônico, ácidos a-D-4-O-metilgalacturônico e a-D-galacturônico) (GIRIO, 2010). Ainda, outros açúcares como a-L-ramnose e a-L-fucose também podem estar presentes em pequenas quantidades e os grupos hidroxila de açúcares que podem ser parcialmente substituídos por grupos acetil. As hemiceluloses mais relevantes são xilanas e glucomanas, sendo as xilanas as mais abundantes (GIRIO, 2010).

Figura 04 – Principais componentes da hemicelulose: (1) D-glucose, (2) D-galactose, (3) L-arabinose, (4) D-xilose, (5) D-manose, (6) 4-O-metil-D-glucurônico.



Fonte: Pitarelo, 2007

As hemiceluloses possuem estrutura amorfa, e suas funções não são completamente compreendidas, é possível que elas exerçam um papel fundamental na arquitetura celular, provavelmente na interface entre a celulose e a lignina (GIRIO, 2010). As hemiceluloses possuem algumas aplicações industriais como na produção de biofilmes, antialérgico, antioxidantes, anti-inflamatório, cosméticos e também pode ser aplicada na produção de etanol de segunda geração.

As hemiceluloses não são, portanto, um composto químico definido, mas sim uma classe de compostos macromoleculares (MARABEZI, 2009). Sua estrutura apresenta ramificações que interagem facilmente com a celulose, proporcionando estabilidade e flexibilidade (SANTOS, 2012), compondo a fibra lignocelulósica, na qual também é possível encontrar a lignina.

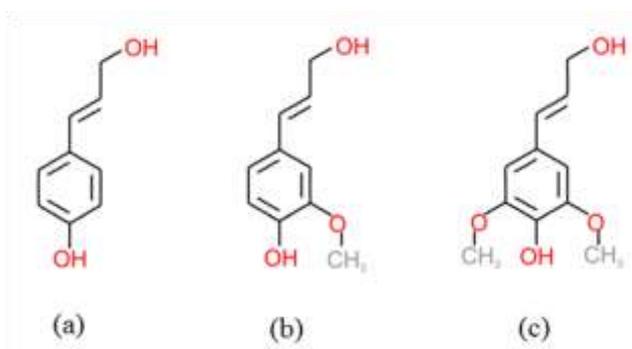
3.5 LIGNINA

A lignina é o principal componente não polissacarídeo da biomassa lignocelulósica, uma macromolécula aromática formada por três estruturas básicas fenólicas, o álcool p-cumarílico, álcool coniferílico e o álcool sinapílico e seus derivados. A lignina serve como uma espécie de cimento, que une os componentes da parede celular, preenchendo espaços vazios entre as fibras de celulose e hemiceluloses (GELLERSTEDT, G.; EK, M.; HENRIKSSON, G., 2009).

A lignina é um dos principais componentes dos tecidos vegetais, sendo importante no transporte de substâncias, além de conferir resistência mecânica e proteger contra o ataque de microrganismos (FENGEL; WEGENER, 1989).

A lignina não possui estrutura cristalina e por este motivo é caracterizado como um polímero amorfo apresentando uma estrutura principal derivada da polimerização de três monômeros que se diferenciam pela substituição no anel aromático, são eles: o álcool cumárilico (a), o álcool sinapílico (b) e o álcool coniferílico (c) (figura 05) (RABELO; SILVA, 2010).

Figura 05: Álcoois que formam a lignina - a) álcool cumárilico; b) álcool sinapílico; e c) álcool coniferílico.



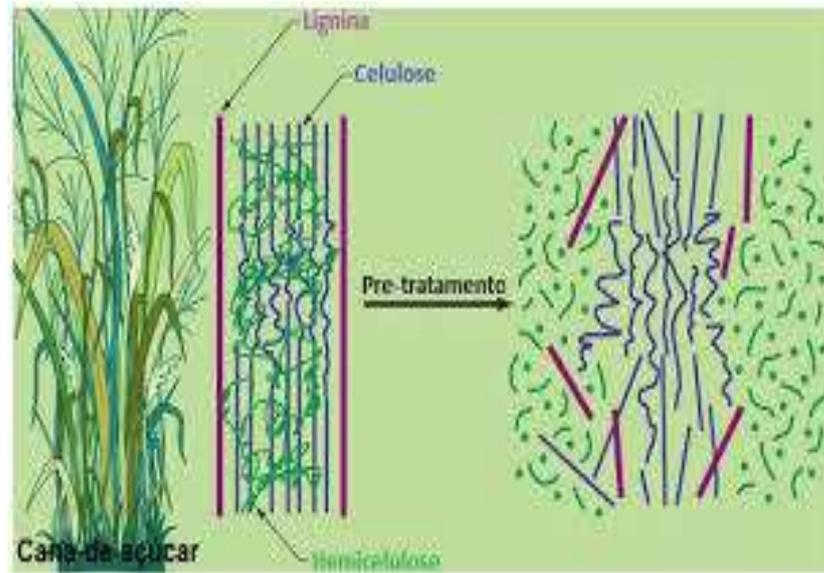
Fonte: Zakzeski et al., 2010.

A lignina está geralmente associada à celulose e às hemiceluloses por meio de ligações éter e carbono-carbono. Além disso, o pleno entendimento de suas estruturas e comportamento é fundamental para o sucesso da produção de etanol, já que a remoção/alteração da lignina é essencial para a realização da hidrólise enzimática na produção de biocombustíveis a partir de materiais lignocelulósicos. Tal remoção gera a oportunidade de utilizar a lignina em aplicações específicas, como produção de quelantes, de adesivos para madeira, vanilina e ácido gálico.

3.6 PRÉ-TRATAMENTO ORGANOSOLV

Devido a sua natureza recalcitrante, a biomassa lignocelulósica requer uma ou mais etapas de pré-tratamento para garantir um ótimo aproveitamento do seu fracionamento, tornando assim a celulose susceptível a hidrólise enzimática. Logo o acesso as macromoléculas só são possíveis mediante a aplicação de pré-tratamentos (figura 06). As técnicas de pré-tratamento podem ser mecânicas, físicas, químicas e biológica ou uma combinação dessas técnicas (BRIENZO et al, 2018).

Figura 6: Ação do pré-tratamento na biomassa lignocelulósica.



Fonte: Mosier et al., 2005

Os pré-tratamentos atuais têm se concentrado no aproveitamento da celulose para fabricação de biocombustíveis, pois, em sua grande maioria, suas aplicações não levam ao fracionamento total da biomassa. Desta forma, a lignina permanece misturada com outros compostos no resíduo do processo.

O processo organosolv está sendo considerado promissor para o conceito de biorrefinaria lignocelulósica devido a sua capacidade de produzir celulose com bons rendimentos, bem como de lignina e hemicelulose de elevada pureza (FERREIRA, et al 2020). Sua aplicação tem como objetivo desconstruir a estrutura da biomassa através da clivagem das ligações químicas reduzindo cristalinidade estrutural e o grau de polimerização da celulose, aumentando assim, o acesso enzimático à celulose e hemicelulose para conversão em açúcares monoméricos que podem ser processados gerando biocombustíveis.

O processo organosolv é comumente utilizado para obtenção da lignina e pré-tratamento da biomassa. É baseado no uso de solventes orgânicos que promove a dissolução e reduz a condensação das reações de lignina (WILD, 2015). O método possibilita a aplicação de diferentes tipos de solventes orgânicos e reagentes que dispõe de condições adequadas para promover o fracionamento total da biomassa.

O pré-tratamento com organosolv emprega diferentes tipos de solventes orgânicos que atua no fracionamento da biomassa, extraindo em primeiro plano a hemicelulose e a lignina na fração líquida, deixando a celulose na fração sólida. No presente estudo, a fração líquida passou

por uma diluição para promover a decantação da hemicelulose, separando da lignina, gerando duas porções, cada uma com seu respectivo componente.

Além de proporcionar a recuperação dos componentes da biomassa com elevado grau de pureza, o uso de processo organosolv possibilita a recuperação e reuso do solvente, aumentando a sustentabilidade do sistema (EMBRAPA, 2017).

Os solventes orgânicos que já foram utilizados na aplicação desse processo e ganharam destaque foram: metanol, etanol, cloroetanol, butanol, propanol, etilenoglicol, trietilenoglicol, ácido fórmico, ácido acético, ácido cloroacético, ácido tioglicólico, ácido propiônico, fenol, cresol, acetato de etila, aminas, óxidos de amina, éster, formaldeído, cetonas, dioxano e dimetilsulfóxido (MUURINEN, 2000; ZHANG et al., 2016^a; KAUTTO et al., 2013; ZHANG et al., 2016^b). A aplicação de etanol, ácido acético e glicerol apresentam a vantagem de serem produzidos a partir de fontes renováveis, favorecendo a sustentabilidade dos processos em que são aplicados (ZHANG et al., 2016^b). As características a serem consideradas na escolha do solvente são: custo, toxicidade, miscibilidade, facilidade no transporte de massa e que não promova reações indesejadas e favoreça as reações de interesse por reduzir a energia de ativação (ZHANG et al., 2016^b; ZHAO et al., 2009). O etanol é o solvente orgânico mais aplicado em trabalhos científicos, certamente por apresentar baixa toxicidade, menor custo, facilidade de recuperação e maior miscibilidade em água (ZHANG et al., 2016^a; YAWALATA et al., 2001). Entre as opções de álcoois, o metanol e o etanol são as melhores opções, seu processo é descrito da seguinte forma: a biomassa é tratada a baixa temperatura (180°C) com adição de catalisador e a alta temperatura (185°C – 210°C) sem a adição de catalisador. Produtos como nitrato de magnésio, metais alcalinos, sulfato de magnésio e hidróxido de sódio podem ser utilizados como catalisador para promover a deslignificação do material pré-tratado (ZHAO 2009). Após a deslignificação o sólido pré-tratado é lavado, a fração orgânica é drenada do reator, e o solvente é reciclado. A solução restante sofre uma diluição para precipitar a lignina. Os produtos obtidos são: fibras celulósicas que contém celulose e quantidades variáveis de hemicelulose e lignina residual; lignina sólida, obtida após a separação do licor negro com o produto decantado e uma solução aquosa de açúcares de hemicelulose, principalmente xilose.

O número de etapas do processo para a obtenção dos componentes da biomassa pode variar em função do tipo de biomassa, solvente e se o processo é em batelada ou contínuo. A figura 07 ilustra as etapas adotadas durante o processo.

Figura 7 – Fluxograma que descreve as etapas do processo organosolv.



Fonte: O autor.

A fração celulósica obtida por processo organosolv é facilmente hidrolisada por celulases, atingindo conversão quase completa da celulose em glicose em curtos intervalos de tempo. Essa característica da celulose obtida por processo organosolv permite a redução na quantidade e complexidade do coquetel enzimático utilizado para a hidrólise, reduzindo, consequentemente, o custo final dos produtos (ELANDER; HSU, 1994; PAN et al., 2005; TERAMOTO et al. 2008; ZHAO et al., 2009). A partir da glicose, inúmeros produtos podem ser obtidos por rotas química, enzimática ou microbiana.

A lignina obtida por processo organosolv, utilizando etanol como solvente, apresenta baixa massa molecular, pureza relativamente alta (70 %) e elevada reatividade, o que a torna uma matéria-prima adequada à síntese de produtos de alto valor agregado (ZHANG et al., 2016a).

As variáveis de processo que exercem forte influência sobre os resultados do processo organosolv destacam-se: tamanho de partícula de biomassa, temperatura, tempo de reação e tipo de concentração do solvente orgânico (PAN et al., 2006).

O gasto energético depende do tamanho de partícula adotada durante o processo de organosolv, dependendo da biomassa pode ser em lascas, cavacos ou pó. Quanto menor a partícula, mais fácil ocorre a absorção da solução e mais rápido ocorre o fracionamento da biomassa (ZHU et al., 2010). No decorrer do pré-tratamento a lignina e a hemicelulose, após serem desintegradas, são dissolvidas enquanto a celulose permanece em estado sólido. Em condições extremas de temperatura, acima de 200°C esses processos podem causar a degradação química da celulose provocando a contaminação nas frações de hemicelulose e lignina (KLAMRASSAMEE et al., 2013), podendo ocorrer também a degradação da lignina (EMBRAPA, 2008). Entretanto, a temperatura aplicada deve ser elevada para garantir a redução

na cristalinidade da celulose, para garantir o máximo desempenho das enzimas durante a hidrólise enzimática (ZHANG et al., 2016a; ZHAO et al., 2009).

A severidade em que a biomassa é exposta durante o processo é um ponto chave na recuperação dos componentes da biomassa. Tanto em condições muito suaves quanto muito severas, o processo subsequente de hidrólise enzimático é dificultado, devido à falta de acesso de enzimas aos polissacarídeos em condições suaves ou excesso de inibidores formados em condições muito severas.

As principais reações que ocorrem durante o processo organosolv em meio ácido são a quebra de ligações éster e éter nas cadeias de lignina e hemicelulose, desidratação dos carboidratos (ZHANG et al., 2016a; KIM et al., 2010) e reações de condensação (ZHAO et al., 2009; CHUM et al., 1985). Em determinadas condições do processo, o solvente também pode reagir com a biomassa, gerando produtos indesejáveis (ZHANG et al., 2016a; ZHAO et al., 2009). Já em meio alcalino, não ocorre formação de inibidores por desidratação de açúcares. Entretanto, através das reações de fracionamento pode ocorrer redução do grau de polimerização dos polissacarídeos, diminuindo o rendimento final.

O processo Lignol, tecnologia de bio-refinação de madeira em etanol, desenvolvida em 2001, é uma tecnologia que combina o processo de organosolv, a base de etanol, promovendo a recuperação de subprodutos presentes na biomassa, com o processo de hidrólise enzimática, que converte a celulose recuperada em etanol. Uma biorrefinaria baseada na tecnologia Lignol pode converter uma variedade de biomassas em subprodutos com alto valor agregado que podem ser convertidos em produtos químicos e combustíveis líquidos (ARATO et al. 2005).

O processo por via ácida já está bem estabelecido, portanto, faz-se necessário estudar os caminhos através do processo alcalino, uma vez que o processo alcalino se mostra bastante eficaz para extração de lignina de material não madeireiro, como bagaço, palha de trigo, cânhamo, kenaf e sisal. O processo organosolv em meio alcalino permite que a hemicelulose também seja solubilizada. Desta forma, no presente estudo, será solubilizada em conjunto a hemicelulose e lignina. Podendo posteriormente ser separada e promovendo a recuperação de ambos os compostos.

4 METODOLOGIA

4.1 PREPARO DA BIOMASSA

A biomassa escolhida para a execução do projeto foi o bagaço da cana-de-açúcar, o qual foi cedido pela Usina São João, localizada no município de Araras – SP.

O material foi seco ao ar por aproximadamente 5 dias. Após esse processo o bagaço foi exposto ao sol por 24 horas. Posteriormente, a biomassa foi moída em moinho de facas tipo Wiley, diminuindo os fragmentos do bagaço da cana-de-açúcar até passar por uma peneira de 20 mesh. A redução no tamanho das partículas teve como objetivo aumentar a superfície de contato, que permite uma maior eficiência no processo de pré-tratamento. Durante todo o trabalho experimental foi utilizado o mesmo lote de matéria-prima.

Figura 08: Bagaço de cana de açúcar.



Fonte: própria.

4.2 PRÉ TRATAMENTO ORGANOSOLV

O pré-tratamento organsolv foi realizado em duplicata, utilizando um reator aço inox com volume operacional de 50 mL, em meio orgânico/alcalino com 5 g de biomassa seca e moída, variando o tempo de reação (25 a 65 minutos), temperatura (120 a 180 °C), concentração de base (3 a 8 %, m/m massa de base por massa de material) e concentração do solvente (30 a 70 %);

Foram determinados 27 experimentos de forma que as condições fossem mescladas para que se pudesse determinar as melhores combinações de rendimento. A tabela 01 traz as condições de variação e otimização que foi empregado nos ensaios.

Foi realizado previamente três experimentos para determinar a quantidade de etanol a ser adicionado para promover a precipitação da xilana. Foram adicionados 50 mL, 80 mL e 100 mL. Após observar os resultados ficou determinado que a quantidade ideal seria de 100 mL, pois nessas condições a massa de xilana precipitada foi maior.

Tabela 01 - Planejamento e otimização dos experimentos em processo organosolv.

Ensaio	Solvente (%)	NaOH (% m/m)	Temperatura (°C)	Tempo (min)
1	30	3	120	25
2	70	3	120	25
3	30	8	120	25
4	70	8	120	25
5	30	3	180	25
6	70	3	180	25
7	30	8	180	25
8	70	8	180	25
9	30	3	120	65
10	70	3	120	65
11	30	8	120	65
12	70	8	120	65
13	30	3	180	65
14	70	3	180	65
15	30	8	180	65
16	70	8	180	65
17	10	5,5	150	45
18	90	5,5	150	45
19	50	0,5	150	45
20	50	10,5	150	45
21	50	5,5	90	45
22	50	5,5	210	45
23	50	5,5	150	5
24	50	5,5	150	85
25	50	5,5	150	45
26	50	5,5	150	45
27	50	5,5	150	45

Fonte: O autor.

4.3 ETAPAS DO PRÉ TRATAMENTO

O pré-tratamento organosolv, descrito na figura 09, que apresenta o fluxograma do processo, foi iniciado então com o preparo da biomassa. Foi pesado em uma balança semi-analítica 5 g de bagaço, posteriormente foi preparada uma solução com o volume de etanol determinado no projeto e preenchido com água até atingir o volume de 50 mL. Em seguida foi pesado e adicionado a massa determinada do reagente básico. A base utilizada na execução dos experimentos foi o hidróxido de sódio. O reagente foi diluído na solução através de agitação, após obter uma solução homogênea, em seguida essa solução foi misturada com a biomassa e transferida para um reator de aço inoxidável com volume operacional de 50 mL.

O reator foi aquecido em banho de óleo termostaticado, seguindo o determinado no planejamento e otimização dos experimentos para temperatura e tempo de reação (Tabela 01).

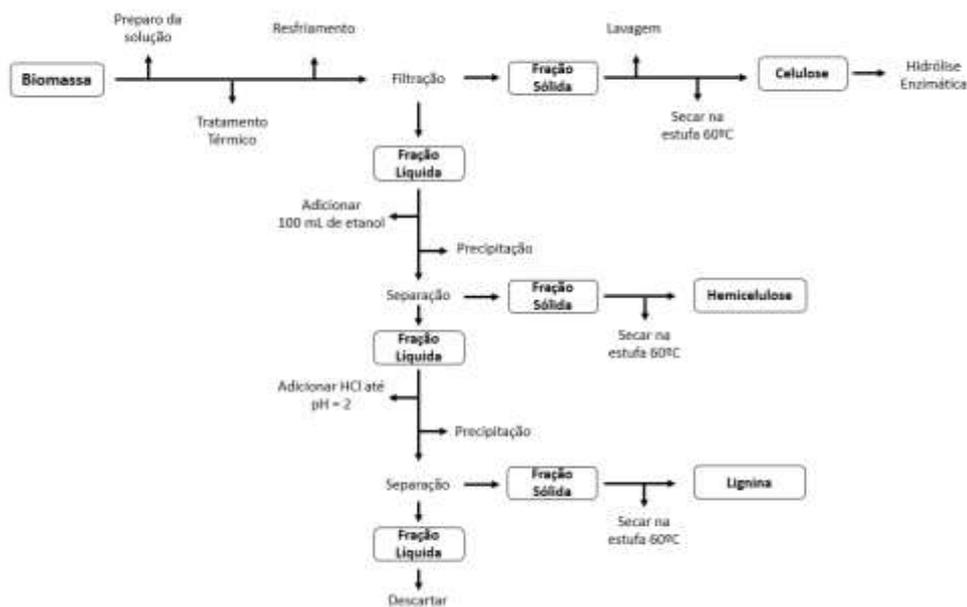
Após concluir esta etapa, o material passou pelo processo de filtração para que ocorresse a separação da fração sólida e líquida.

A filtração ocorreu utilizando uma bomba a vácuo e papel filtro. A fração sólida, rica em celulose, foi lavada com cerca de 500 mL de água filtrada para a remoção de impurezas e em seguida foi levada à estufa (60°C) por pelo menos 72 horas e depois de seca foi pesada e quantificada.

A fração líquida, rica em hemicelulose e lignina, foi depositada em um frasco Scott onde sofreu adição de 100 mL de etanol, para que provocasse a separação da hemicelulose e da lignina, após esta etapa a nova solução foi colocada para decantar por no mínimo 8 horas. Quando a solução apresentou o substrato decantado a separação da fração líquida e sólida foi feita, de forma manual, transferindo o líquido para outro frasco.

A nova fração sólida foi levada à estufa a 60 °C onde permaneceu por no mínimo 72 horas, essa fração seca, foi quantificada e representou a massa de hemicelulose. Já a fração líquida resultante da separação, sofreu uma acidificação, com HCl 5 mol/L, até atingir o pH igual a 2 e foi colocada para decantar por cerca de 8 horas. Após o período de decantação, a fração líquida foi descartada e o material precipitado foi lavado à estufa a 60°C por no mínimo 72 horas, finalizado essa etapa, a fração seca representou a massa de lignina.

Figura 9: Fluxograma com o processo de pré-tratamento organosolv



Fonte: O autor.

4.4 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

A biomassa *in natura* e as pré-tratadas, foram caracterizadas conforme norma ABNT para caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar.

Foi determinado o teor de celulose, hemicelulose e lignina com influência das condições do pré-tratamento.

A hemicelulose foi caracterizada hidrolisando aproximadamente 300 mg de hemicelulose, adicionando 1,5 mL de H₂SO₄ 72 % (m/m), a reação ocorreu a 45 °C por 7 minutos. A reação foi interrompida com adição de 50 mL de água destilada. Essa mistura foi autoclavada a 121 °C por 30 minutos (GOLVEIA et al., 2009). O conteúdo foi filtrado em filtro de placa porosa nº 4, previamente tarado. O resíduo sólido foi lavado com água destilada, seco em estufa a 105°C até massa constante para a determinação da lignina insolúvel. A fração solúvel foi usada para determinar os teores de açúcares e ácido acético por cromatografia líquida. O teor de lignina solúvel em ácido foi determinado por medida de absorbância em 215 nm e 280 nm (GOLVEIA et al., 2009).

4.5 DETERMINAÇÃO DE LIGNINA SOLÚVEL

A fração líquida resultante do processo anterior, obtida por meio da filtração em cadinho, denominada hidrolisada, foi empregada na determinação de carboidratos, ácidos orgânicos, produtos de degradação dos carboidratos (quando for o caso) e lignina solúvel com efeitos dos pré-tratamentos, através do espectrofotômetro. Para tal, a fração líquida foi diluída seis vezes e então foi analisada em espectrofotômetro de UV-Vis, em 215 nm e 280 nm.

A concentração de lignina solúvel foi calculada, conforme a equação 1:

$$(1) C_{LS} = \left[\frac{(4,53 \times A_{215}) - A_{280}}{300} \right] \times fd_{LS}$$

Onde

CLS é a concentração de lignina solúvel no hidrolisado, expressa em gramas por litro (g/L);

A215 é o valor de absorbância da amostra a 215 nm;

A280 é o valor de absorbância da amostra a 280 nm;

fd_{LS} é o fator de diluição da alíquota do hidrolisado.

Para, então, calcular o teor de lignina solúvel conforme a equação 2:

$$(2) LS = \left(\frac{C_{LS} \times V}{MBle_s} \right) \times \left[1 - \left(\frac{Et}{100} \right) \right] \times 100$$

Onde:

LS é o teor de lignina solúvel no bagaço de cana-de-açúcar, em base seca, expresso em porcentagem massa por massa (% m/m);

CLS é a concentração de lignina solúvel na alíquota de hidrolisado diluída, expressa em gramas por litro (g/L);

V é o volume de hidrolisado, expresso em litros (L) e igual a 0,08673 L;

MBle_s é a massa do bagaço, em base seca, livre de extrativos em 5.6.3.3, expressa em gramas (g);

Et é o teor de extrativos totais, expresso em porcentagem massa por massa (% m/m).

4.6 DETERMINAÇÃO DA LIGNINA INSOLÚVEL

A fração sólida resultante do processo anterior foi utilizada na determinação de lignina insolúvel. O cadinho com o resíduo insolúvel foi colocado em estufa a 105 °C, por 24 h e, então, foi transferido para o dessecador pelo tempo necessário para atingir a temperatura ambiente e

pesado em balança analítica, até massa constante. Em seguida, foi subtraída desse resultado a massa inicial do cadinho, determinando-se a massa de lignina insolúvel (ABNT NBR 16550, 2016).

4.7 DETERMINAÇÃO DA PORCENTAGEM DE AÇÚCARES

A fração líquida obtida na caracterização química foi utilizada para determinar as porcentagens de celulose e hemicelulose, por meio da análise em CLAE, utilizando coluna Bio-Rad Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm) mantida a 65°C, detector de índice de refração WATERS 2414, fase móvel de H₂SO₄ 0,005 M, fluxo de 0,6 mL/min, volume de amostra injetada de 20 µL.

4.8 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

As amostras pré-tratadas foram submetidas à hidrólise enzimática para avaliar o rendimento em glicose liberada. Foram feitas duplicatas, para as quais se pesou 0,1 g de amostra, em tubos falcon de 50 mL, e submetidas à hidrólise enzimática utilizando a enzima Cellic Ctec 2, que apresenta uma alta concentração de enzimas glicosídeos, em 5 mL de tampão de acetato de sódio 50 mmol/L, pH 4,8. A atividade enzimática utilizada foi 15 FPU/g, em reação a 50°C e agitação constante a 150 RPM em incubadora shaker, por 24 h.

Após a reação, as amostras foram centrifugadas a 3.500 rpm por 10 min, em seguida foram diluídas 5 vezes e pipetado 0,1 mL da amostra e misturado com a 1,5 mL de solução de DNS e 0,9 mL de água destilada. Essa mistura foi fervida em banho-maria a 105 °C durante 5 minutos, após fervido as amostras foram lidas no espectrofotômetro a 540 nm.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após quantificar as frações recuperadas foi realizada a análise da influência das variáveis do pré-tratamento por meio do software Statistica, onde, foi considerado um fator de significância de $p = 0,05$.

4.10 ANÁLISE INFRAVERMELHO (FT-IR)

Foi realizada com as amostras a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR). A refletância total atenuada por infravermelho das amostras extraídas de pseudo-lignina foi examinada entre 4000 e 400 cm^{-1} a 25 ° C com 2 cm^{-1} de resolução, 32

varreduras por espectro. Método ATR utilizado em espectrofotômetro FTIR-VERTEX 70 / BRUKER com fonte: laser HeNe (emite radiação na região do infravermelho médio); Detector: DLaTGS.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esse estudo teve como objetivo o fracionamento da biomassa lignocelulósica, bagaço de cana de açúcar, para obtenção de celulose, lignina e xilana utilizando o pré-tratamento organosolv. A tabela 02 apresenta a recuperação da biomassa em porcentagem, considerando a quantidade de lignina e xilana, de 23,07 % e 27,02 %, respectivamente, conforme relatado na caracterização química do material.

Após o processo organosolv foi feita a separação da fração sólida pré-tratada (rica em celulose – recuperação de massa) e da fração líquida. Na fração líquida foi adicionado 100 mL de etanol para provocar a precipitação da xilana, e após precipitada foi feita a separação das frações, a fração sólida foi seca em estufa e quantificada em seguida. Para que houvesse a precipitação e recuperação da lignina, a fração líquida com teor alcalino ($\text{pH} > 12$), em meio com etanol (o qual foi adicionado para promover a precipitação da xilana) foi acidificado com solução de ácido clorídrico até atingir a condição ideal de precipitação/separação (pH próximo de 2). A tabela 02 apresenta a recuperação da xilana e da lignina para os 27 ensaios realizados.

Para gerar os valores de recuperação das frações de xilana e lignina, foram aplicadas as equações 3 e 4 respectivamente, onde foram considerados os valores obtidos na caracterização química do bagaço in natura.

$$(3) \text{ Xilana (\%)} = (\text{Massa recuperada de Xilana} / 27,02\% \times 10) \times 100$$

$$(4) \text{ Lignina (\%)} = (\text{Massa recuperada de Lignina} / 23,07\% \times 10) \times 100$$

Tabela 02: Recuperação de massa, xilana e lignina no processo organsolv.

Ensaio	Etanol (%)	NaOH (%)	Temperatura (°C)	Tempo (Min)	Xilana (%)	Lignina (%)
1	30	3	120	25	30,35	5,26
2	70	3	120	25	22,95	45,05
3	30	8	120	25	65,14	15,77
4	70	8	120	25	53,66	82,58
5	30	3	180	25	45,15	24,02
6	70	3	180	25	32,94	39,41
7	30	8	180	25	78,09	46,55
8	70	8	180	25	45,15	79,20
9	30	3	120	65	22,21	4,88
10	70	3	120	65	26,28	60,81
11	30	8	120	65	88,45	7,13
12	70	8	120	65	72,17	57,81
13	30	3	180	65	47,74	57,06
14	70	3	180	65	69,95	54,43
15	30	8	180	65	87,71	42,04
16	70	8	180	65	78,09	87,09
17	10	5,5	150	45	52,55	34,16
18	90	5,5	150	45	52,18	68,69
19	50	0,5	150	45	35,16	3,38
20	50	10,5	150	45	57,36	74,70
21	50	5,5	90	45	46,26	51,05
22	50	5,5	210	45	69,58	73,20
23	50	5,5	150	5	35,53	70,20
24	50	5,5	150	85	35,90	100
25	50	5,5	150	45	69,21	100
26	50	5,5	150	45	72,91	97,97
27	50	5,5	150	45	65,14	96,47

Fonte: o autor

A porcentagem de xilana recuperada variou de 22 % a 88 % (Tabela 02), o equivalente a 0,06 e 2,39 g. Os menores valores de massa recuperada aconteceram nas condições de 30 % de concentração de solvente, 3 % na concentração de hidróxido de sódio agindo em um tempo de 65 minutos e temperatura de 120 °C. Nessas condições o rendimento foi de aproximadamente 23 %. Já as condições que apresentaram os maiores valores de massa de xilana recuperada foram: 30 % de solvente, 8 % de reagente (hidróxido de sódio), reagindo a uma temperatura de 180 °C e 65 minutos. Nessas condições o rendimento foi de aproximadamente 89 %. Com estes

resultados, os parâmetros de maior influência na recuperação da xilana foram o hidróxido de sódio e a temperatura.

A tabela ANOVA para os resultados de xilana demonstrou que os principais parâmetros de influência foram: porcentagem de reagente - hidróxido de sódio, tempo e temperatura.

Tabela 03: ANOVA para o rendimento de extração de xilana no planejamento composto central rotacional (estrela) do processo organosolv.

Fator	SS	df	MS	F	p
(1) Etanol (%) (L)	0,017279	1	0,017279	1,24277	0,286767
Etanol (%) (Q)	0,021423	1	0,021423	1,54086	0,238207
(2) NaOH (%) (L)	0,414283	1	0,414283	29,79698	0,000146
NaOH (%) (Q)	0,047037	1	0,047037	3,38310	0,090727
(3) Temperatura (°C) (L)	0,094074	1	0,094074	6,76620	0,023175
Temperatura (°C) (Q)	0,006768	1	0,006768	0,48675	0,498677
(3) Tempo (min) (L)	0,059911	1	0,059911	4,30906	0,060065
Tempo (min) (Q)	0,114701	1	0,114701	8,24976	0,014031
1L x 2L	0,037037	1	0,037037	2,66386	0,128598
1L x 3L	0,000014	1	0,000014	0,00099	0,975477
1L x 4L	0,025918	1	0,025918	1,86416	0,197194
2L x 3L	0,044502	1	0,044502	3,20077	0,098854
2L x 4L	0,015372	1	0,015372	1,10559	0,313757
3L x 4L	0,012742	1	0,012742	0,91644	0,357302
Error	0,166842	12	0,013904		
Total SS	1,019130	26			

Fonte: o autor

Legenda: SS: soma de quadrados; DF: grau de liberdade; MS: quadrados médios; L: valor linear; Q: valor quadrático. Os números representados em negrito indicam os termos significativos.

Foi obtido o modelo matemático de recuperação da lignina considerando os termos significativos, equação 5:

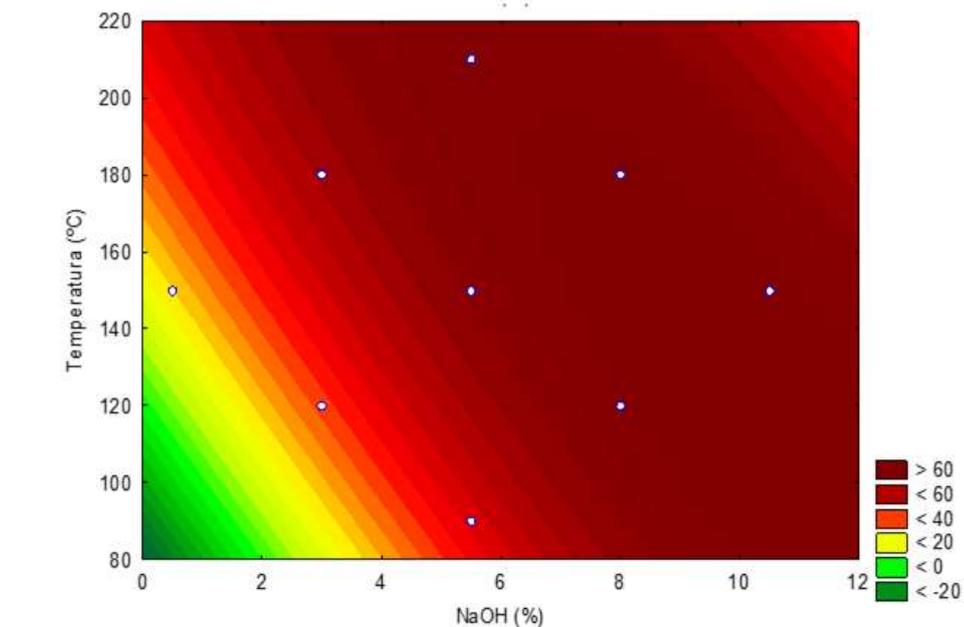
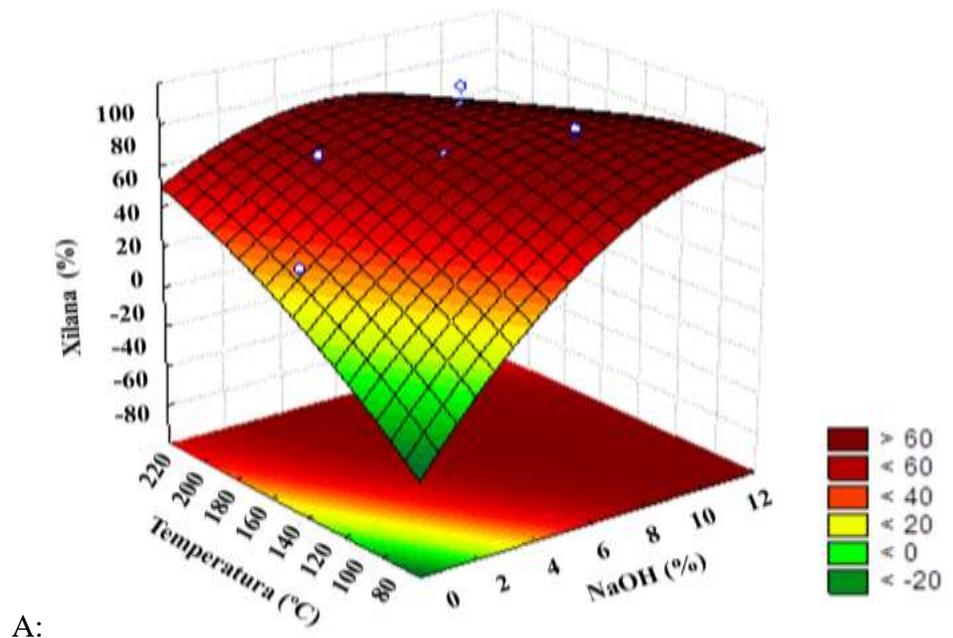
$$(5) X (\%) = 26,27 r + 12,52 T - 14,66 t^2$$

Onde: X representa a porcentagem de xilana, r reagente, T temperatura e t tempo.

Para gerar o primeiro gráfico de superfície de resposta foram utilizados os parâmetros de temperatura e hidróxido de sódio. A superfície de resposta (Figura 10-A) de interação entre os parâmetros mostrou que a máxima recuperação de xilana ocorreu na faixa de variação de 6 % a 12 % de reagente hidróxido de sódio e na variação de 120 °C a 200 °C. O gráfico de

contorno (Figura 10-B) mostra que o aumento da concentração de hidróxido de sódio possui maior influência que a temperatura administrada.

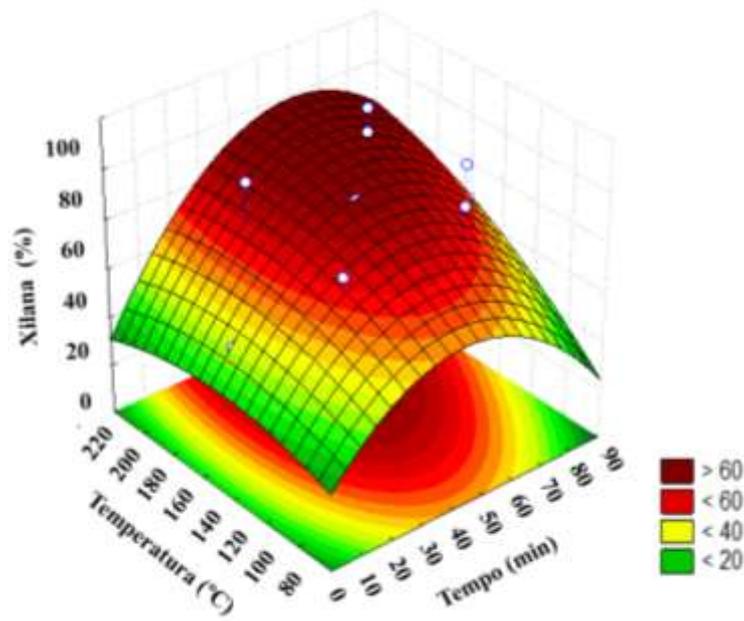
Figura 10: Superfície de resposta do planejamento composto central rotacional (estrela) para avaliação do processo organosolv na produção de xilana, na interação entre hidróxido de sódio e temperatura (A). Gráfico de contorno contendo o mesmo centro rotacional da superfície de resposta (B).



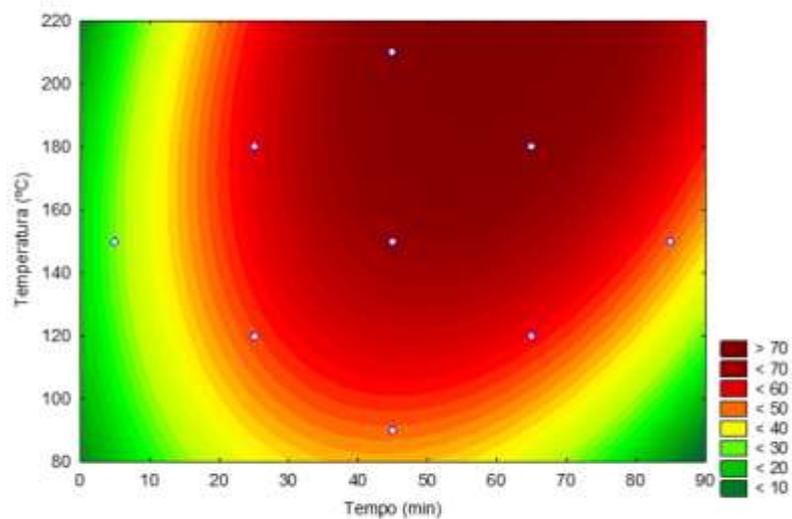
Fonte: o autor

As variáveis temperatura e tempo (Figura 11) foram essenciais para a recuperação de xilana, principalmente pela interação destas variáveis. A faixa de tempo de melhor recuperação ocorreu entre 40 min e 80 min, em temperatura acima de 160 °C.

Figura 11: Superfície de resposta do planejamento composto central rotacional (estrela) para avaliação do processo organosolv na produção de xilana com as variáveis temperatura e tempo (A). Gráfico de contorno contendo o mesmo centro rotacional da superfície de resposta (B).



A:

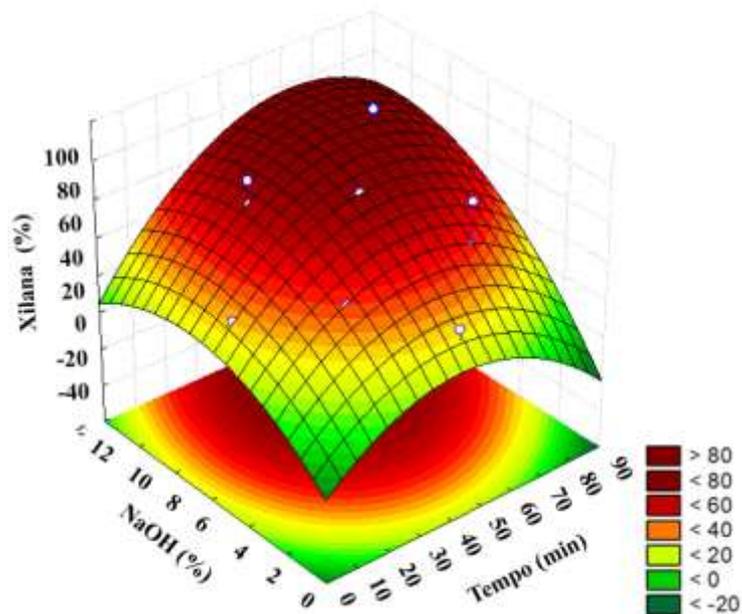


B:

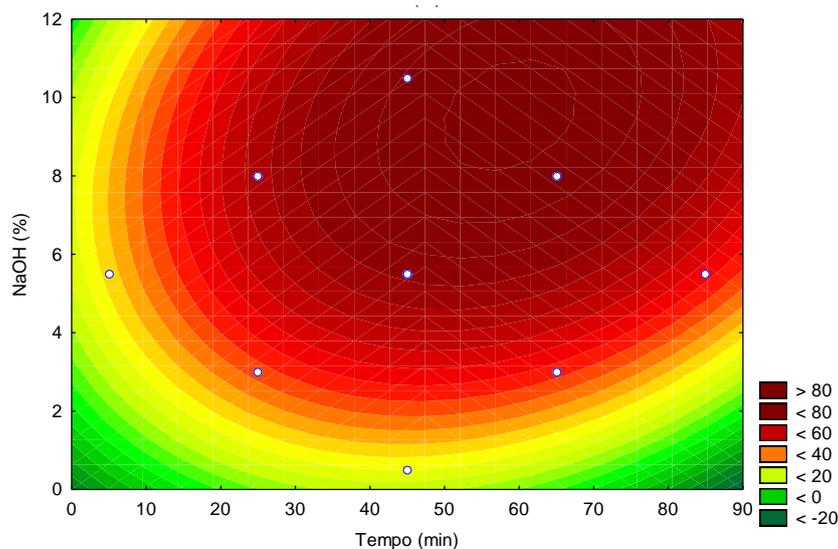
Fonte: o autor

No gráfico de contorno dos parâmetros tempo de reação e hidróxido de sódio os melhores resultados na recuperação da xilana ocorreram a partir dos 45 min de reação e com concentração de 5,5 % de hidróxido de sódio, o que pode ser comprovado observando o resultado do ensaio 25, onde a biomassa inicial foi submetida às condições de pré-tratamento iguais a citada acima e foi possível recuperar 70 % de xilana. O aumento da concentração de hidróxido de sódio e do tempo de reação de forma linear não significaram melhores resultados (Figura 12). Em condições extremas de pré-tratamento a massa recuperada passou a diminuir. Comparativamente, a menor concentração do reagente hidróxido de sódio (0,5 %) rendeu uma porcentagem de 35 %, enquanto a maior concentração do reagente (10,5 %) rendeu aproximadamente 58 %. Este resultado vai de encontro à literatura, já que a principal função do hidróxido de sódio é a remoção da hemicelulose do material (CHANG et al., 1998).

Figura 12: Superfície de resposta do planejamento composto central rotacional (estrela) para avaliação do processo organosolv na produção de xilana, com as variáveis tempo e hidróxido de sódio (A). Superfície de contorno contendo o mesmo centro rotacional da superfície de resposta (B).



A:



B:

Fonte: O autor.

Alguns métodos de extração de hemicelulose já foram aplicados utilizando reagentes alcalinos, como tratamento com uso de peróxido de hidrogênio variando de 2 % a 6 % e sulfato de magnésio a 0,5 % de concentração (BRIENZO et al., 2009). Os resultados obtidos foram de 38,3 % a 94,5 %, onde constatou-se que, assim como no organosolv, os melhores resultados aconteceram nos pontos médios das variáveis – 40°C, 4 % de reagente por 10 horas de reação.

Em FIGUEIREDO et al (2017), também foi realizado o fracionamento da biomassa lignocelulósica utilizando reagente alcalinos, contudo, os melhores resultados foram obtidos com temperaturas mais elevadas, 121°C, por 30 min e concentração de 5 % de KOH, em que a recuperação foi de aproximadamente 76%. Foi possível fazer uma relação inversa entre temperatura e tempo, uma vez que tanto quanto no organosolv como nos estudos citados as melhores condições envolveram reagente nas faixas de 4 % a 6 % (ponto médio).

As condições do ponto central, experimentos 25, 26 e 27 mostraram as melhores condições para obtenção de lignina através do processo de organosolv em meio alcalino. Nos 27 experimentos descritos na metodologia (Tabela 01), a massa de lignina variou de 0,09 g a 2,95 g, um rendimento de 3 % a 98 % de extração de lignina (Tabela 02). Os menores rendimentos aconteceram sob 50 % de concentração de solvente, 0,5 % nas concentrações de hidróxido de sódio com uma variação no tempo de 45 min, a temperatura, por sua vez foi de 150 °C. Já as condições que apresentaram o maior rendimento na recuperação da lignina foram: 50 % de solvente, 5,5 % de reagente (hidróxido de sódio), reagindo a uma temperatura de 150 °C por 45 minutos. Observando o melhor e o pior rendimento é possível observar que o tempo, a temperatura e a quantidade de solvente não variaram mostrando menores influências na

recuperação, enquanto a concentração de hidróxido sódio foi o principal fator na recuperação de lignina. Baseado nesses resultados relatados, foi determinada uma tabela ANOVA para as variáveis e três gráficos de superfície de resposta para comparação dessas interações (Tabela 04).

Tabela 04: ANOVA para o rendimento de extração de lignina no planejamento composto central rotacional (estrela) do processo organosolv.

Fator	SS	df	MS	F	p
(1) Etanol (%) (L)	0,578920	1	0,578920	23,84942	0,000376
(1) Etanol (%) (Q)	0,430032	1	0,430032	17,71574	0,001212
(2) NaOH (%) (L)	0,303514	1	0,303514	12,50366	0,004101
(2) NaOH (%) (Q)	0,638090	1	0,638090	26,28698	0,000250
(3) Temperatura (°C)(L)	0,158145	1	0,158145	6,51499	0,025351
(3) Temperatura (°C)(Q)	0,283275	1	0,283275	11,66990	0,005115
(4) Tempo (min)(L)	0,036051	1	0,036051	1,48519	0,246381
(5) Tempo (min)(Q)	0,071271	1	0,071271	2,93612	0,112309
1L x 2L	0,046993	1	0,046993	1,93595	0,189365
1L x 3L	0,094169	1	0,094169	3,87941	0,072405
1L x 4L	0,000198	1	0,000198	0,00816	0,929500
2L x 3L	0,006666	1	0,006666	0,27461	0,609802
2L x 4L	0,054602	1	0,054602	2,24941	0,159508
3L x 4L	0,030141	1	0,030141	1,24169	0,286966
Pure Error	0,291288	12	0,024274		
Total SS	2,464812	26			

Fonte: O autor

Legenda: SS: soma de quadrados; DF: grau de liberdade; MS: quadrados médios; L: valor linear; Q: valor quadrático. Os números representados em negrito indicam os termos significativos.

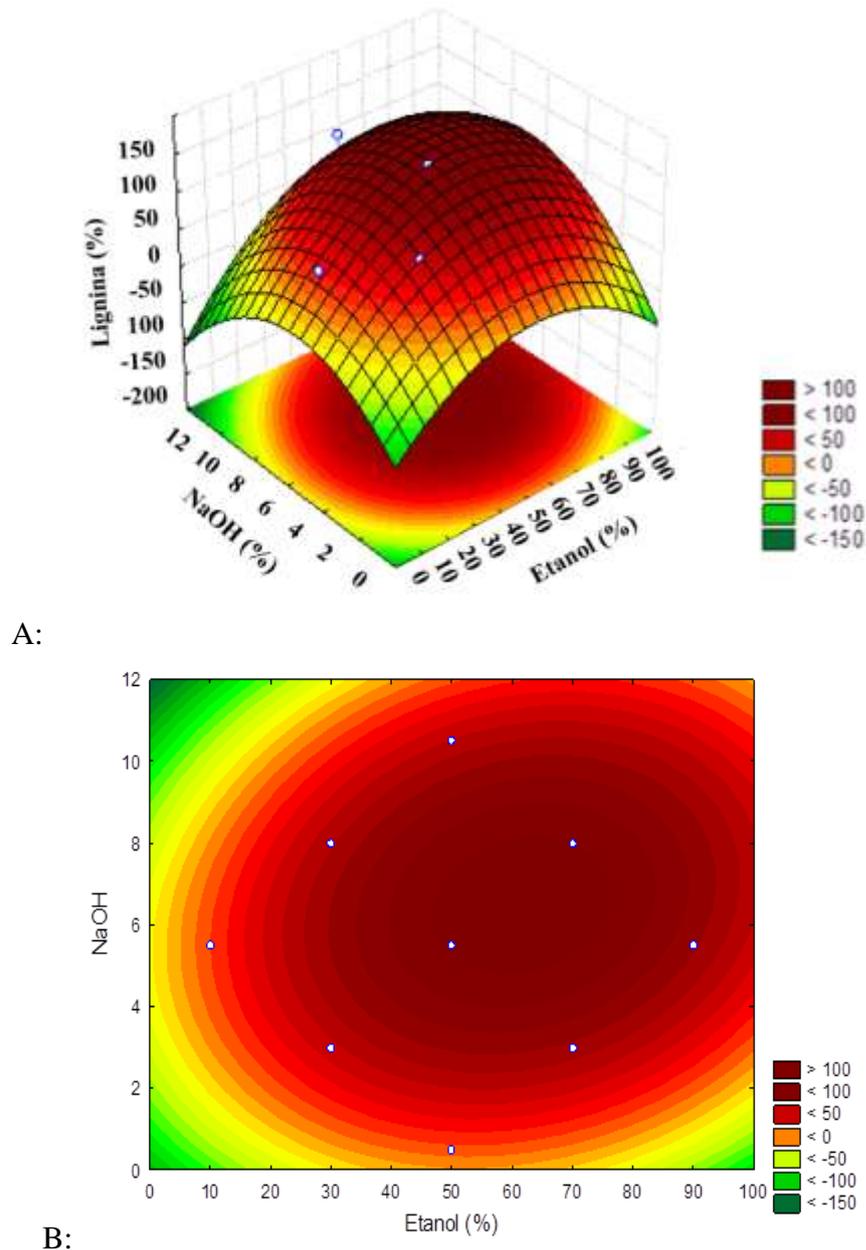
Foi obtido o modelo matemático de recuperação da lignina considerando os termos significativos, equação 6:

$$(6) L (\%) = 31,06 s - 28,39 s^2 + 22,49 r - 34,58 r^2 + 16,23 T - 23,04 T^2$$

Onde: L representa a porcentagem de lignina, s solvente, r reagente e T temperatura.

A superfície de resposta de interação entre o hidróxido de sódio e o solvente (Figura 13) mostrou que a máxima recuperação de lignina ocorreu na faixa de variação de 6 % a 9 % de reagente hidróxido de sódio e de 50 a 80 % de solvente.

Figura 13: Superfície de resposta na interação entre hidróxido de sódio e solvente no Planejamento composto central rotacional (estrela) para avaliação do processo organosolv na produção de lignina (A). Superfície de contorno contendo o mesmo centro rotacional da superfície de resposta (B).



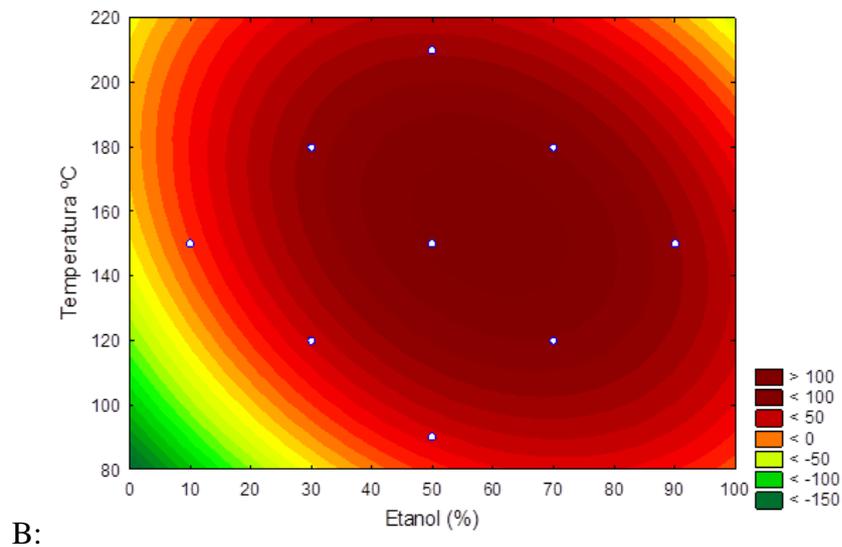
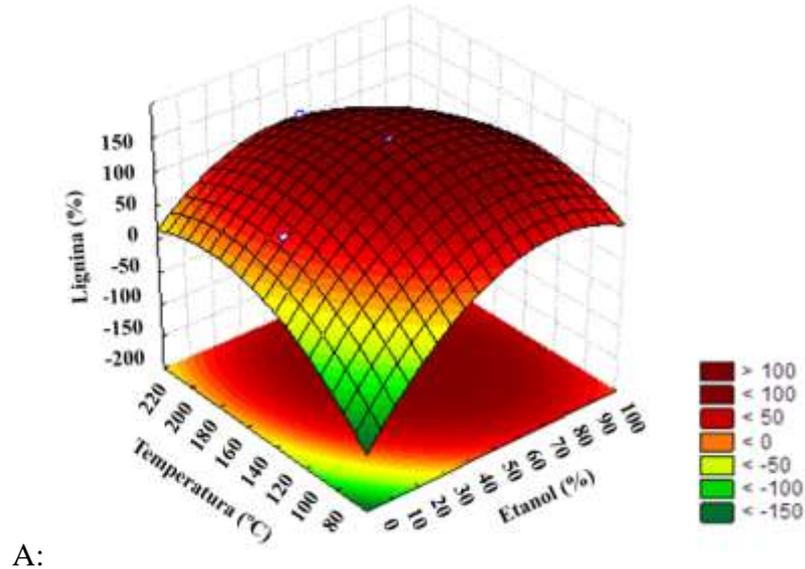
A:

B:

Fonte: o autor

Pela superfície de resposta (Figura 14) da variação da temperatura com o solvente foi possível observar que a quantidade de solvente provoca uma maior recuperação em temperaturas acima de 120 °C. Como é o caso do ensaio 8, que com 8% de hidróxido de sódio a 180 °C resultou uma recuperação de 79 % de lignina.

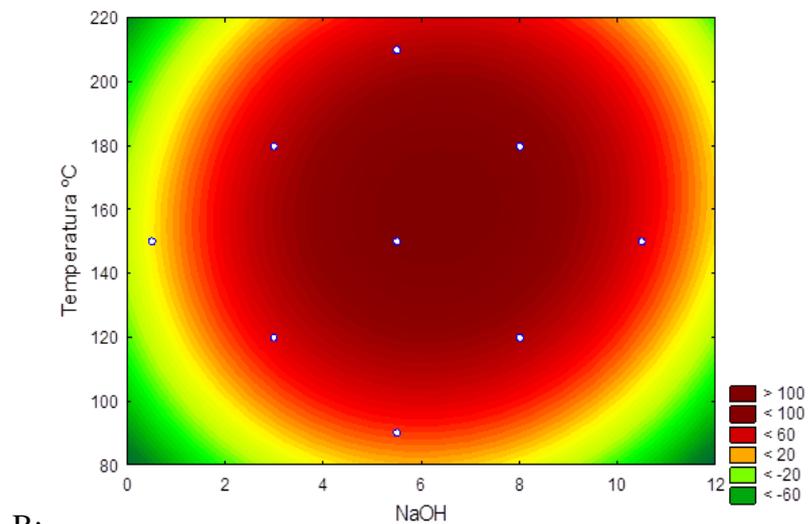
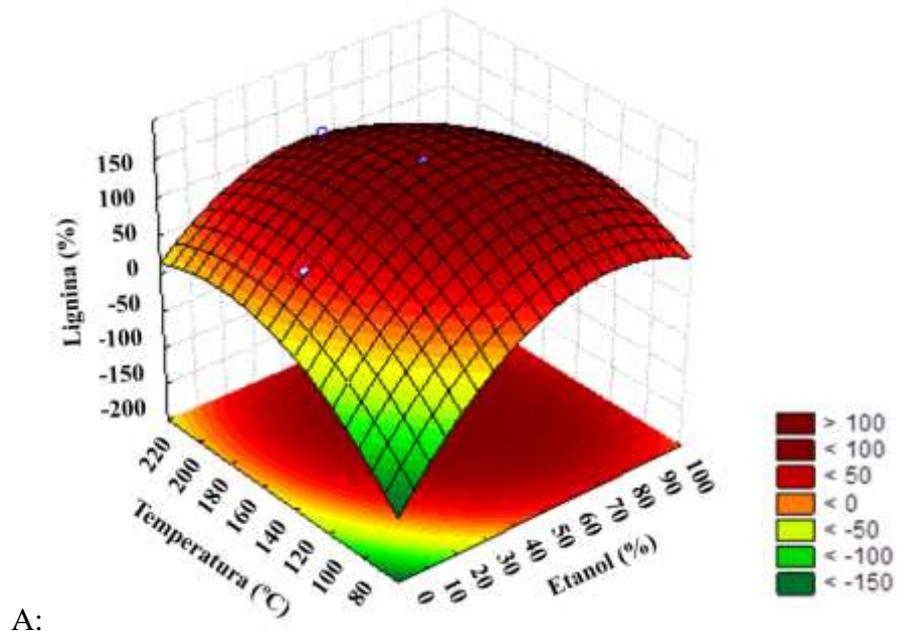
Figura 14: Superfície de resposta de temperatura e solvente no planejamento composto central rotacional (estrela) para avaliação do processo organosolv na produção de lignina (A). Superfície de contorno contendo o mesmo centro rotacional da superfície de resposta (B).



Fonte: o autor

O gráfico que representa a interação entre a temperatura e o solvente (Figura 15) mostrou que ambos os parâmetros interagiram de forma positiva, atingindo o pico de máxima recuperação de lignina. A concentração de 6 % de hidróxido de sódio interagindo a uma temperatura de 150 °C mostra a recuperação máxima de lignina nessa condição experimental.

Figura 15: Superfície de resposta entre temperatura e hidróxido de sódio no Planejamento composto central rotacional (estrela) para avaliação do processo organosolv na produção de lignina (A). Superfície de contorno contendo o mesmo centro rotacional da superfície de resposta (B).



Fonte: O autor.

Segundo CHEN et al 2009 o pré-tratamento alcalino favorece uma maior deslignificação, aumentando a remoção da hemicelulose e estimulando a digestão enzimática da celulose. Esse fato explica o motivo do reagente alcalino e o etanol serem os principais fatores de influência na recuperação da lignina.

Segundo ZHAO 2016, o uso do hidróxido de sódio como catalisador melhorou significativamente a capacidade deslignificante do etanol, resultando no aumento de digestibilidade enzimática. ZHOU, 2016, também relata que o carbonato e o sulfeto de sódio combinado com etanol foram capazes de remover até 95,3% de lignina quando submetido a uma temperatura de 160 °C. CHENG, 2009 relatou que o uso de ácido acético como reagente em solução com etanol promoveu 82% de remoção de xilana e 63% de deslignificação em condições semelhantes do organosolv.

5.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS MATERIAIS PRÉ-TRATADOS, LIGNINA E XILANA

As amostras pré-tratadas foram caracterizadas quanto a sua composição química, quantificando a presença de lignina (soma de lignina solúvel e insolúvel). Os resultados da caracterização química estão apresentados na Tabela 05.

Tabela 05 – Composição química do bagaço in natura e material após o pré-tratamento organosolv para produção de xilana e lignina.

Material	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina Solúvel (%)	Lignina Insolúvel (%)	Lignina Total (%)
Bagaço in natura	43,41±2,82	27,02 ± 1,12	1,48 ± 0,15	21,58 ± 1,09	23,07 ± 0,93
Amostra 1	-	-	0,537 ± 0,03	9,24 ± 0,95	9,77 ± 0,98
Amostra 27	-	-	0,407 ± 0,04	6,60 ± 0,81	7,01 ± 0,80
Amostra 16	-	-	0,227 ± 0,02	7,62 ± 1,55	7,85 ± 1,54

Amostras 1, 27 e 16: amostras provenientes do pré-tratamento organosolv considerando nível das variáveis: baixo, intermediário e alto. (-) não determinado.

Fonte: o autor

Para as amostras de bagaço in natura a composição foi de: 1,48 % de lignina solúvel, 21,58 % de lignina insolúvel e, portanto, 23,07 % de lignina total. Assim, observou-se que o pré-tratamento alcalino teve grande influência na recuperação da lignina. Foi realizado a caracterização química nos materiais pré-tratados gerados nos experimentos 1, 16 e 27, que representam respectivamente, o nível baixo, intermediário e alto das variáveis em estudo (Tabela 01).

A amostra 1 apresentou, no pré-tratamento, uma porcentagem de lignina de 7 % (Tabela 02), e a quantidade de lignina total presente no material pré-tratado determinado pela caracterização química foi de 9,77 % (Tabela 05).

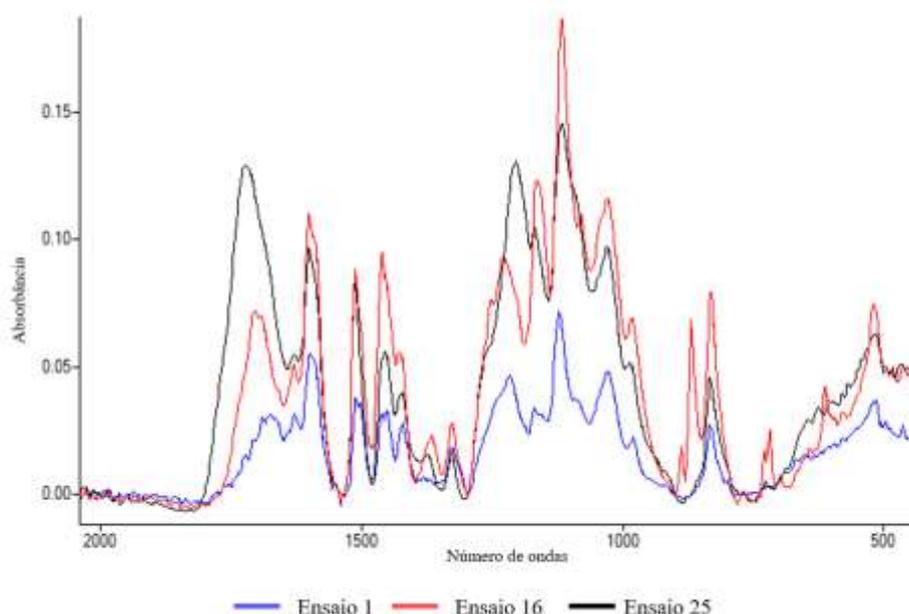
Já a amostra 27, que representa um ponto central teve uma recuperação de massa de lignina de 96 % mostrando ótimas condições para o rendimento, sendo a quantidade de lignina presente no material pré-tratado via caracterização química de 7,01 % (Tabela 5).

E as melhores condições para recuperação tanto de lignina (87 %), quanto de xilana (78 %), ensaio 16, a quantidade de lignina total apresentada foi 8,38 %.

Os espectros de lignina para os experimentos 1, 16 e 25, que representam respectivamente as condições mais amenas, severas e o ponto central, estão representados na figura 16. Os espectros da lignina revelaram a presença de sinais em 1326, 1265, 1214 e 1117 cm^{-1} , que indicam uma existência alta de siringil e guaiacil. As vibrações de deformação axial de C-O em álcoois e fenóis produz uma banda forte na região de 1000-1260 cm^{-1} . Porém o modo vibracional complica-se mais com a presença de ramificações e insaturações.

O aparecimento das bandas em 1326 e 1261 cm^{-1} é atribuída ao relaxamento do anel siringila com alongamento C-O e relaxamento do anel guaiacil com alongamento C=O, respectivamente. A banda em 1220 cm^{-1} também está relacionado ao relaxamento das ligações C – O alongamento das estruturas siringila e guaiacil.

Figura 16: Espectro do infravermelho aplicada para identificação de lignina.



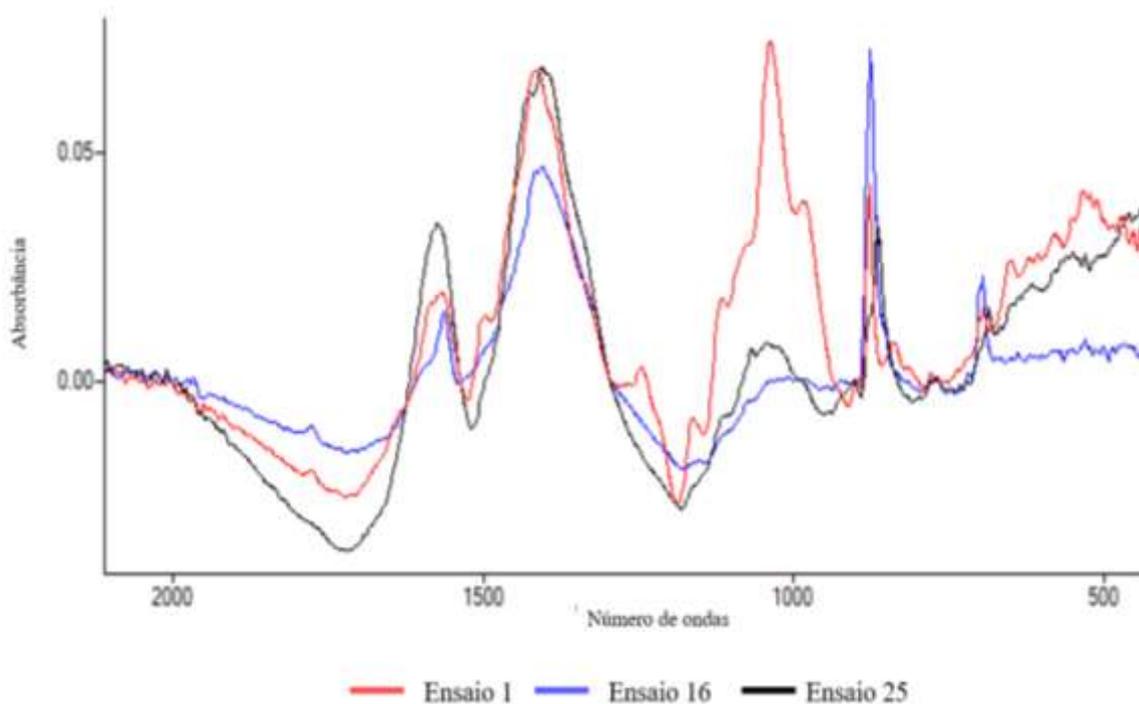
Fonte: O autor

Os espectros de hemicelulose para os experimentos 1, 16 e 25, que representam respectivamente as condições mais amenas, severas e o ponto central, estão representados na figura 17. A região de impressão digital da hemicelulose foi indicada entre 800 e 1700 cm^{-1} . Os dois primeiros picos, analisando da direita para esquerda, acontecem nas faixas de 906 cm^{-1} representando um indicativo da configuração β do 1 \rightarrow 4 ligações xilopiranosil. A banda encontrada a 1047 cm^{-1} foi atribuída ao alongamento das ligações C–O e C– e à contribuição das ligações glicosídicas C–O–C da estrutura de xilana. As bandas entre 1152 e 995 cm^{-1} podem ser atribuídas a arabinoxilana (SUN et al. 2012).

A banda entre 1320 e 1247 cm^{-1} pode ser atribuída ao alongamento –CH, curvatura –H ou C–O na hemicelulose, como na vibração do ácido carboxílico devido a 4-O-metil- α - de grupos de ácidos glucurônicos. A banda na região de 1510 cm^{-1} , é uma característica da lignina (XUE et al. 2012).

A partir de uma consideração global, os perfis de espectro FT-IR de hemicelulose foram semelhantes e confirmaram sua estrutura de arabino-glucuronoxilana (AGX).

Figura 17: Espectro do infravermelho aplicada para identificação da hemicelulose.



Fonte: O autor.

5.2 VALIDAÇÃO DO MODELO

Foram selecionadas as melhores condições para obtenção de lignina e xilana, aplicando o processo de organosolv: 50 % de etanol, 5,5 % de hidróxido de sódio, temperatura de 150 °C (Tabela 02). Nesta condição, a lignina foi maximizada, uma vez que o objetivo central do processo organosolv é a extração de lignina. Nestas condições o rendimento de extração de xilana é considerado alto, atendendo desta forma ao objetivo de extrair xilana e lignina em um mesmo processo. Foi obtido 64,74 % de xilana e 100 % de lignina. O rendimento de extração de xilana é estatisticamente significativo, com base no desvio padrão do rendimento obtido em comparação ao rendimento predito pelo modelo (Tabela 06).

Tabela 06: Rendimento de extração de xilana e lignina obtido em comparação ao rendimento teórico.

Ensaio	Etanol (%)	Hidróxido de sódio (%)	Temp (°C)	Tempo (min)	Xilana (%)	Lignina (%)
Rendimento obtido	50	5,5	150	45	64,74 ± 2,57	100
Rendimento teórico	50	5,5	150	45	69,67 ± 3,51	100

Fonte: O autor

5.3 RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO DE XILANA EM RELAÇÃO A LIGNINA (SELETIVIDADE)

A relação entre o rendimento de extração de xilana e lignina evidencia a condição experimental que permite maior extração de xilana em relação ao rendimento de lignina. A seletividade para a xilana, desta forma, evidencia condições experimentais que beneficiam a extração de xilana em relação a extração de lignina.

A tabela 07 apresenta os resultados obtidos, a partir dos quais foi construído um gráfico de Pareto e um gráfico de contorno e superfície de resposta. A concentração de etanol foi a variável significativa na seletividade para extração de xilana. Esta variável sendo significativa e negativa, indica que menores concentrações de etanol beneficia a extração de xilana. Provavelmente, alta concentração de etanol provoca a precipitação na etapa do pré-tratamento, evitando assim sua recuperação do meio líquido após o processo. Considerando que a interação entre solvente e temperatura estão próximos da significância, a temperatura pode ser considerada uma variável com influência na seletividade para xilana. Uma vez que esta

interação tem significância positiva, aumento na temperatura foi benéfico para o rendimento de extração de xilana.

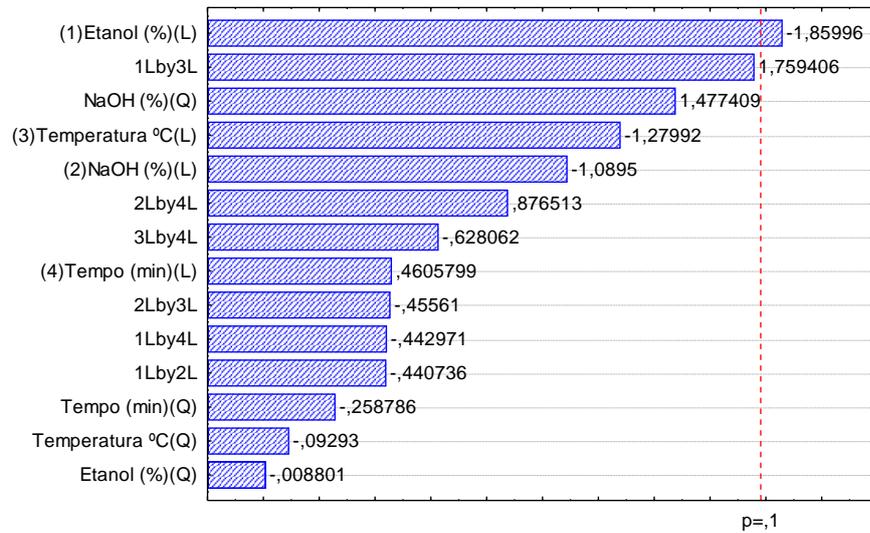
Tabela 07 – Rendimento de extração de xilana em relação a recuperação de lignina – seletividade.

Ensaio	Etanol (%)	NaOH (%)	°C	Tempo (Min)	Xilana/Lignina
1	30	3	120	25	5,77
2	70	3	120	25	0,51
3	30	8	120	25	4,13
4	70	8	120	25	0,65
5	30	3	180	25	1,88
6	70	3	180	25	0,84
7	30	8	180	25	1,68
8	70	8	180	25	0,57
9	30	3	120	65	4,55
10	70	3	120	65	0,43
11	30	8	120	65	12,40
12	70	8	120	65	1,25
13	30	3	180	65	0,84
14	70	3	180	65	1,29
15	30	8	180	65	2,09
16	70	8	180	65	0,90
17	10	5,5	150	45	1,54
18	90	5,5	150	45	0,76
19	50	0,5	150	45	10,41
20	50	10,5	150	45	0,77
21	50	5,5	90	45	0,91
22	50	5,5	210	45	0,95
23	50	5,5	150	5	0,51
24	50	5,5	150	85	0,36
25	50	5,5	150	45	0,69
26	50	5,5	150	45	0,74
27	50	5,5	150	45	0,68

Fonte: O autor

O ensaio 11 foi o que apresentou o melhor resultado de seletividade para xilana, suas condições foram: concentração de solvente: 30 %, hidróxido de sódio: 8 %, temperatura: 120 °C e tempo de 65 min. O gráfico de Pareto (Figura 18), apresenta a combinação dos parâmetros solvente e temperatura como sendo a de maior influência na seletividade para extração de xilana.

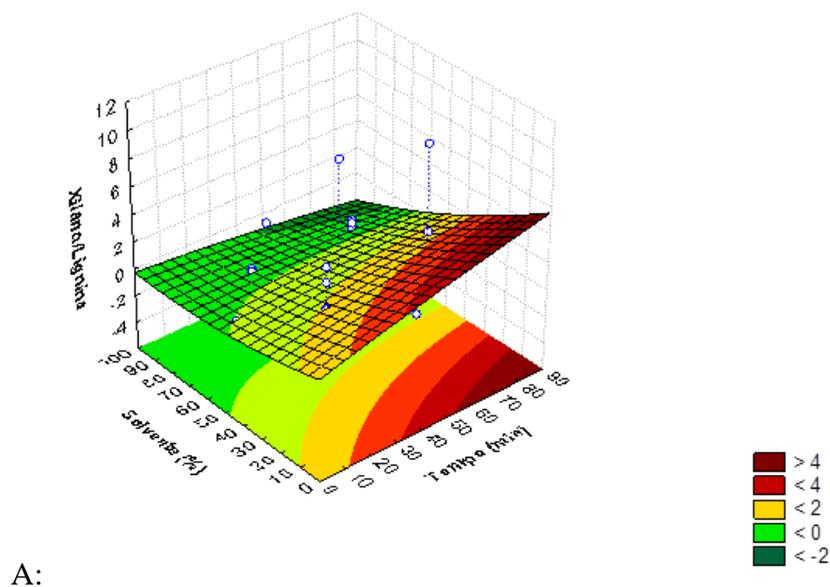
Figura 18: Gráfico de Pareto para a seletividade de extração de xilana.

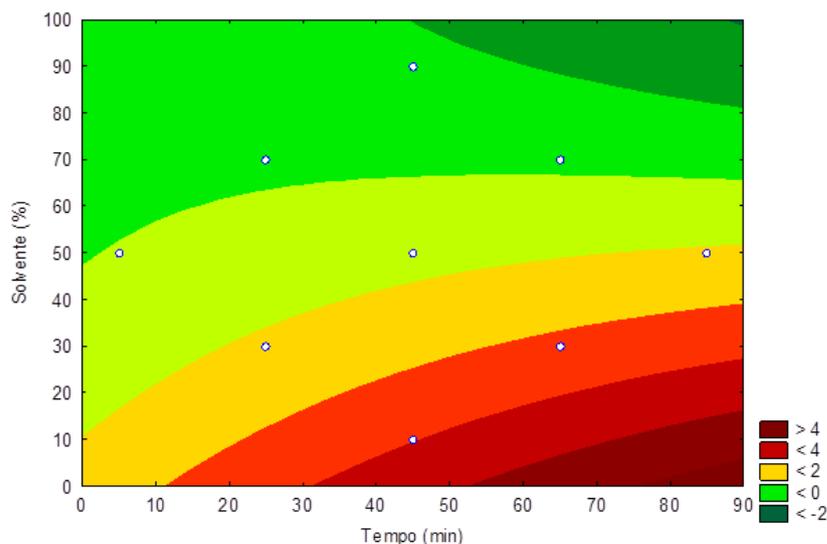


Fonte: O autor

A combinação das variáveis solvente e temperatura mostrou a variação na seletividade de extração de xilana (Figura 19). Os gráficos mostram que, por outro lado, a seletividade da extração de lignina ocorre em alta concentração de solvente, o que favorece a solubilização da lignina.

Figura 19: Superfície de resposta entre tempo e solvente no planejamento composto central rotacional (estrela) para avaliação da seletividade de extração de xilana (A). Gráfico de contorno contendo o mesmo centro rotacional da superfície de resposta (B).





B:

Fonte: o autor

5.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

A etapa de hidrólise enzimática da celulose, necessária para a obtenção de açúcares fermentáveis, ocorreu após a etapa de pré-tratamento. A hidrólise enzimática é catalisada por enzimas altamente específicas denominadas celulases, que, assim como as demais enzimas, é produzida principalmente por fungos filamentosos e bactérias (SALOMÃO, 2017). O papel de tais enzimas é clivar as ligações internas da região amorfa/cristalina da celulose, expondo as extremidades redutoras e não redutoras livres e liberando moléculas de glicose (VILELA, 2013).

Os resultados da análise em CLAE, após a realização da hidrólise enzimática, mostraram a concentração de glicose gerada pela hidrólise da celulose a partir da ação das enzimas em tal etapa. Tais resultados podem ser observados na Tabela 08. Os resultados variaram de 9,02 g/L a 18,09 g/L, resultados semelhantes aos obtidos por MESA et al (2011), que ao aplicar o processo de organosolv no fracionamento da biomassa obteve resultados variando entre 11,3 g/L e 18,1g/L em condições semelhantes ao presente estudo. As condições aplicadas por MESA et al (2011) no maior rendimento foram: 60 minutos, a 195°C com 30% de etanol, mostrando que as condições do experimento 9 (Tabela 8) 30 % de etanol, a 120 ° C durante 65 min resultou em concentrações semelhantes, próximo dos 18 g/L em ambos os estudos.

Tabela 08 – Concentração e rendimento em glicose gerada após a hidrólise enzimática do material pré-tratado.

Ensaio	Etanol (%)	NaOH (%)	Temp (°C)	Tempo (Min)	concentração (g/L)	Conversão (%)
1	30	3	120	25	16,29	80,64
2	70	3	120	25	13,62	67,10
3	30	8	120	25	12,85	63,26
4	70	8	120	25	14,36	71,14
5	30	3	180	25	16,99	83,33
6	70	3	180	25	14,76	72,72
7	30	8	180	25	17,12	83,91
8	70	8	180	25	14,21	70,67
9	30	3	120	65	18,09	88,56
10	70	3	120	65	17,03	83,47
11	30	8	120	65	15,24	75,45
12	70	8	120	65	15,09	73,61
13	30	3	180	65	17,15	84,87
14	70	3	180	65	16,85	82,62
15	30	8	180	65	10,32	50,98
16	70	8	180	65	12,12	44,44
17	10	5,5	150	45	14,58	71,84
18	90	5,5	150	45	14,95	74,01
19	50	0,5	150	45	11,99	59,36
20	50	10,5	150	45	15,92	77,69
21	50	5,5	90	45	12,27	60,58
22	50	5,5	210	45	9,02	44,41
23	50	5,5	150	5	11,72	58,02
24	50	5,5	150	85	12,25	59,82
25	50	5,5	150	45	18,24	89,85
26	50	5,5	150	45	17,63	87,23
27	50	5,5	150	45	17,61	87,20

Fonte: O autor

Segundo a tabela ANOVA (Tabela 09) todos os parâmetros apresentaram significância no teor de glicose.

Tabela 09: Tabela ANOVA para o rendimento de glicose no planejamento composto central rotacional (estrela) do processo organosolv.

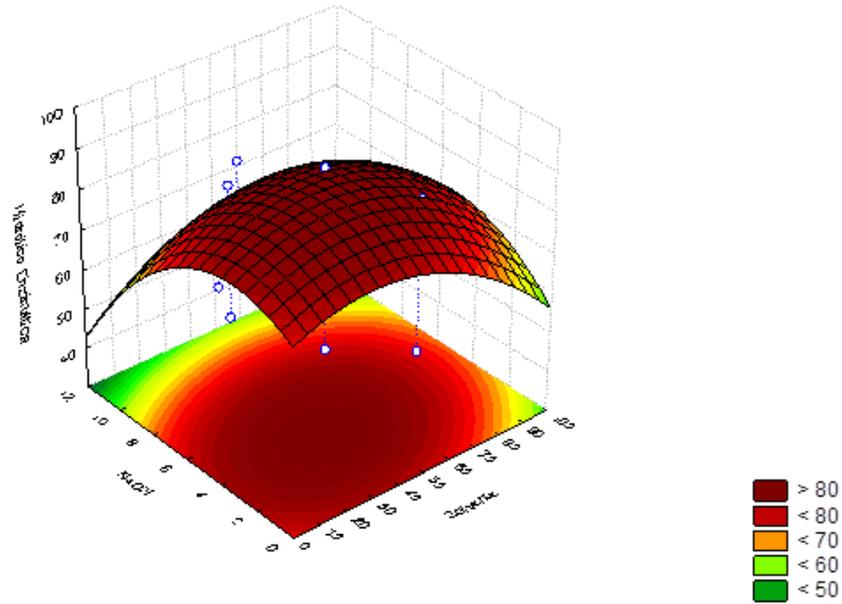
Fator	SS	df	MS	F	p
Etanol (%) (L)	69,695	1	69,695	30,1968	0,031557
Etanol (%) (Q)	91,408	1	91,408	39,6041	0,024332
NaOH (%) (L)	223,068	1	223,068	96,6485	0,010189
NaOH (%) (Q)	214,385	1	214,385	92,8862	0,010595
(3) Temperatura (°C)(L)	160,281	1	160,281	69,4447	0,014096
Temperatura (°C)(Q)	1099,030	1	1099,030	476,1760	0,002093
Tempo (min)(L)	1,112	1	1,112	0,4819	0,559367
Tempo (min)(Q)	661,953	1	661,953	286,8039	0,003469
1L x 2L	19,733	1	19,733	8,5498	0,099765
1L x 3L	25,068	1	25,068	10,8613	0,081036
1L x 4L	11,905	1	11,905	5,1580	0,151122
2L x 3L	86,664	1	86,664	37,5486	0,025613
2L x 4L	402,413	1	402,413	174,3530	0,005687
3L x 4L	469,536	1	469,536	203,4355	0,004880
Pure Error	4,616	2	2,308		
Total SS	4561,019	26			

Fonte: o autor

Legenda: SS: soma de quadrados; DF: grau de liberdade; MS: quadrados médios; L: valor linear; Q: valor quadrático. Os números representados em negrito indicam os termos significativos.

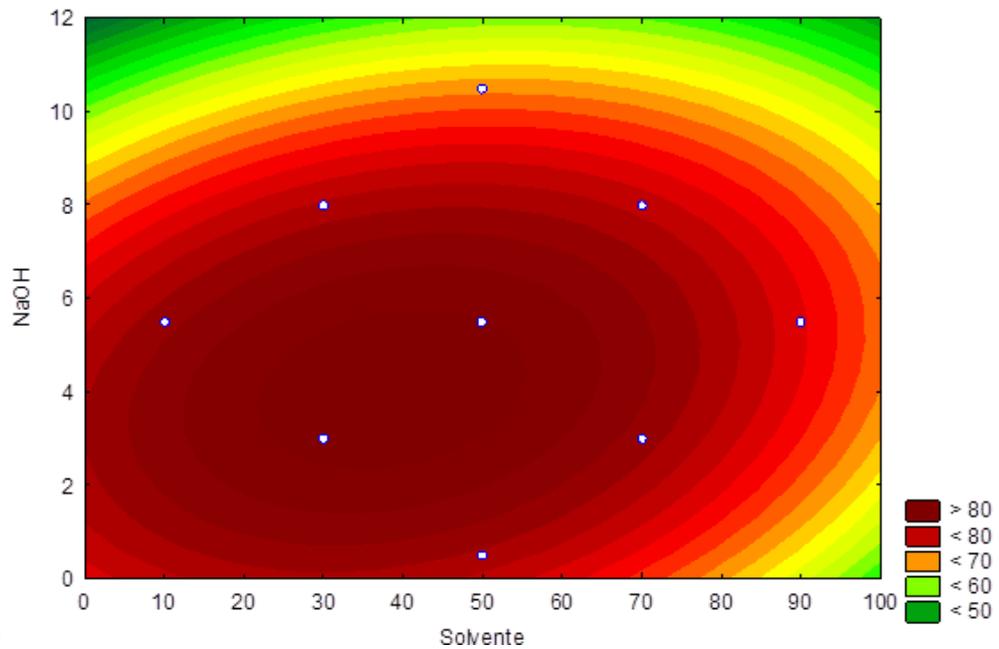
Assim, foi possível obter os gráficos de superfície de resposta que analisam o comportamento da geração de glicose de acordo com as variações dos parâmetros de reações do pré-tratamento. Deste modo, observam-se as condições de pré-tratamento que modificam a biomassa, provavelmente reduzindo sua recalcitrância, aumentando o rendimento em glicose na hidrólise enzimática.

Figura 20: Superfície de resposta na interação entre hidróxido de sódio e solvente no Planejamento composto central rotacional (estrela) para avaliação do processo organosolv no rendimento de glicose(A). Gráfico de contorno contendo o mesmo centro rotacional da superfície de resposta (B).



A

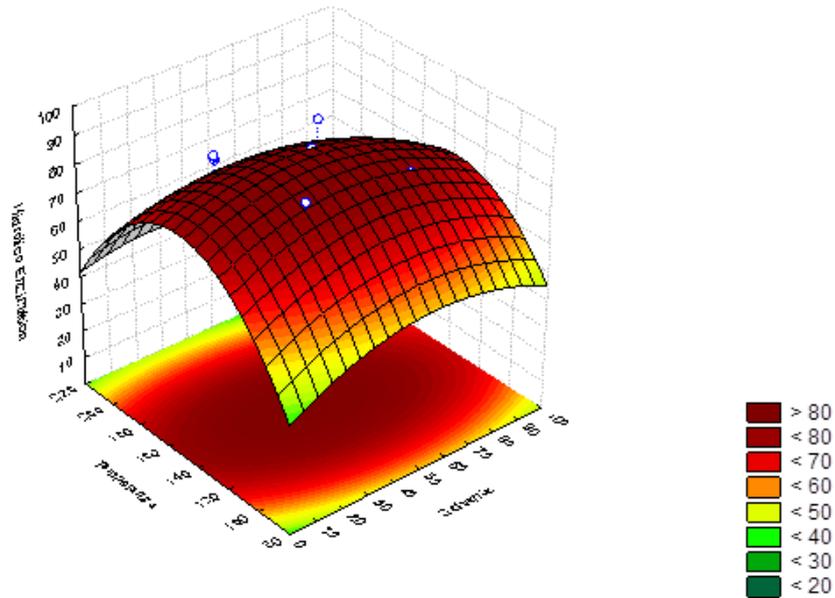
Fonte: O autor



B

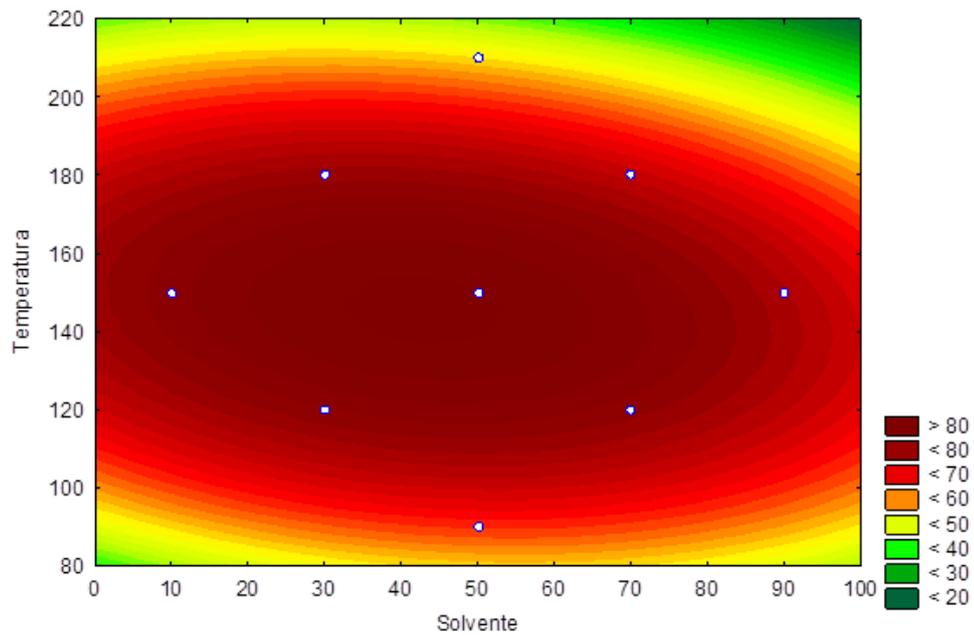
Fonte: O autor

Figura 21: Superfície de resposta na interação entre temperatura e solvente no Planejamento composto central rotacional (estrela) para avaliação do processo organosolv no rendimento de glicose (A). Superfície de contorno contendo o mesmo centro rotacional da superfície de resposta (B)



A

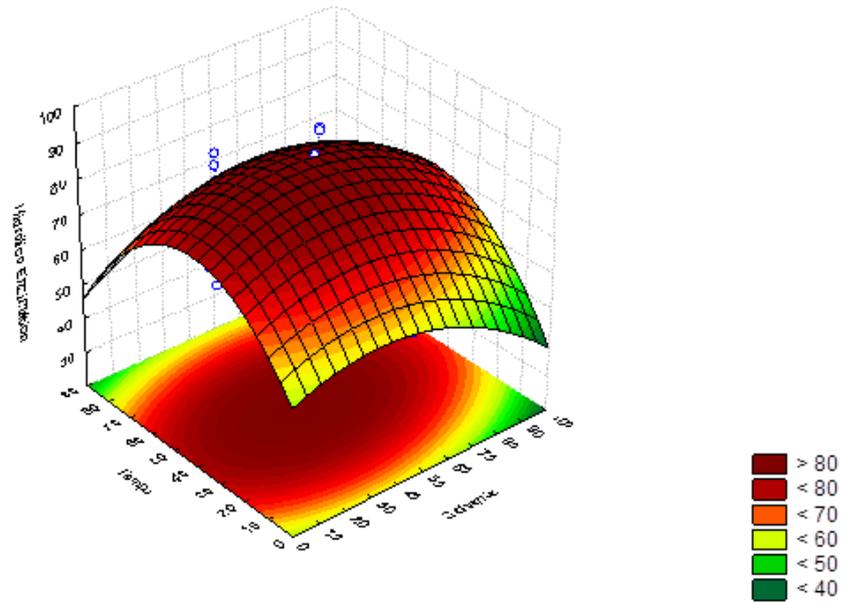
Fonte: O autor



B

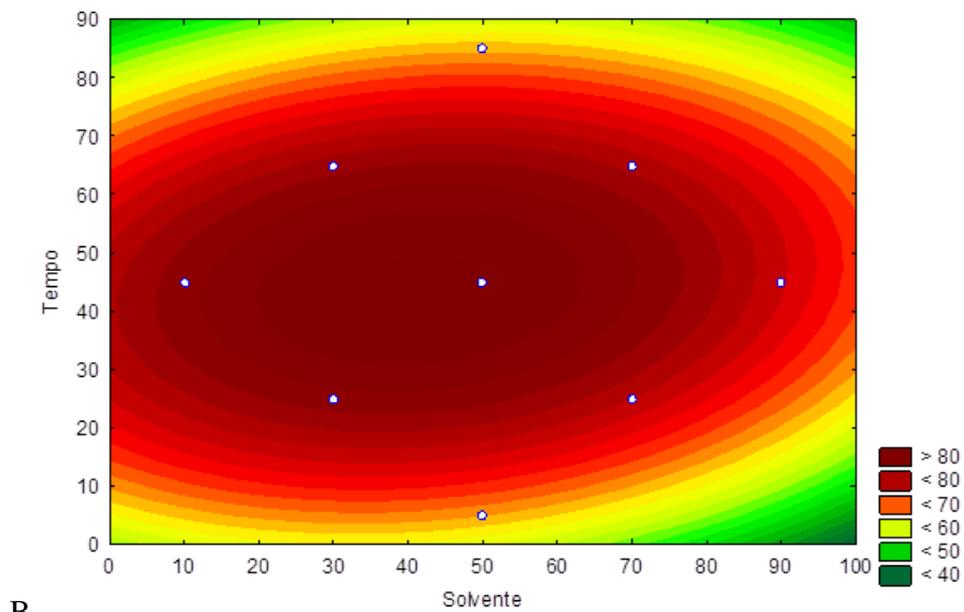
Fonte: O autor

Figura 22: Superfície de resposta na interação entre tempo e solvente no Planejamento composto central rotacional (estrela) para avaliação do processo organosolv no rendimento de glicose (A). Superfície de contorno contendo o mesmo centro rotacional da superfície de resposta (B).



A

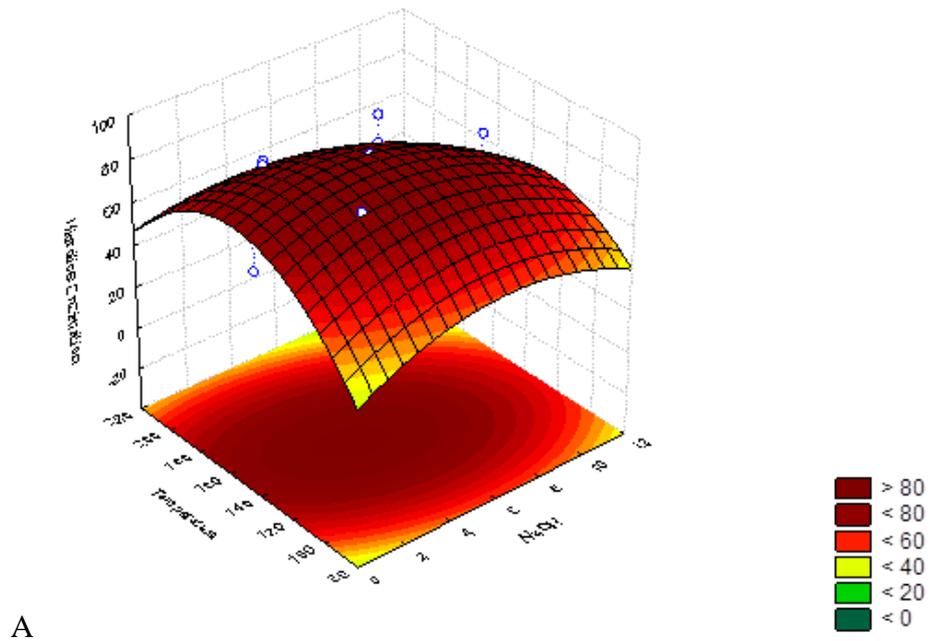
Fonte: O autor



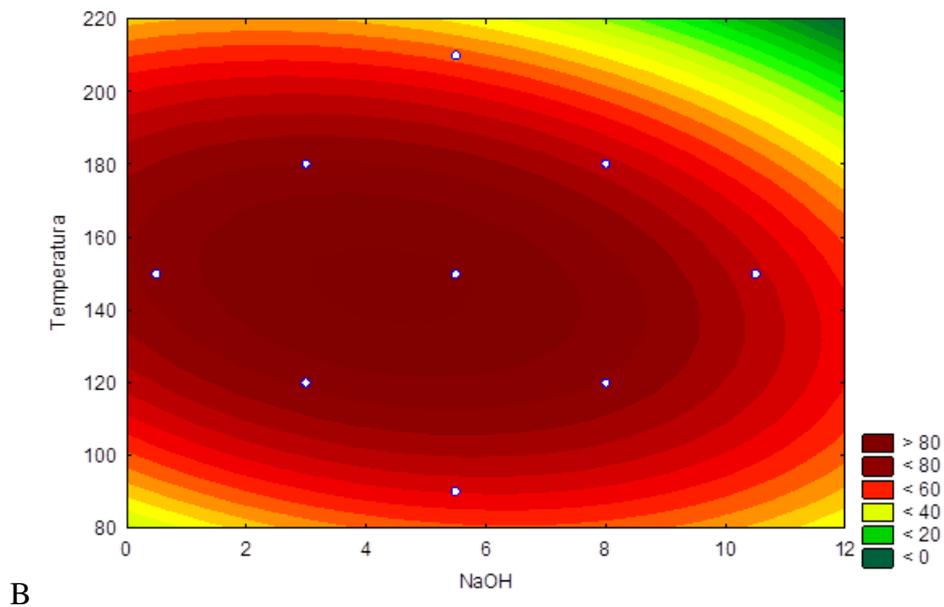
B

Fonte: O autor

Figura 23: Superfície de resposta na interação entre temperatura e reagente no Planejamento composto central rotacional (estrela) para avaliação do processo organosolv no rendimento de glicose (A). Superfície de contorno contendo o mesmo centro rotacional da superfície de resposta (B)

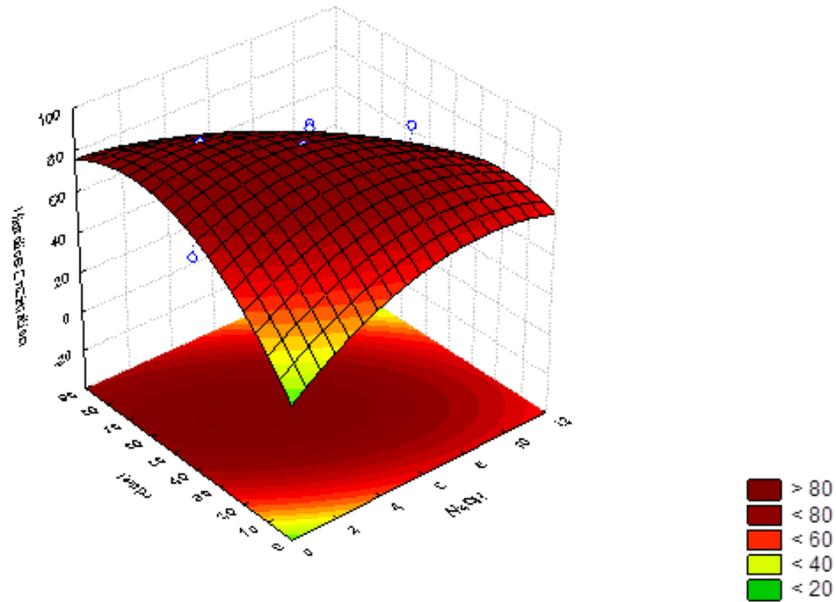


Fonte: O autor



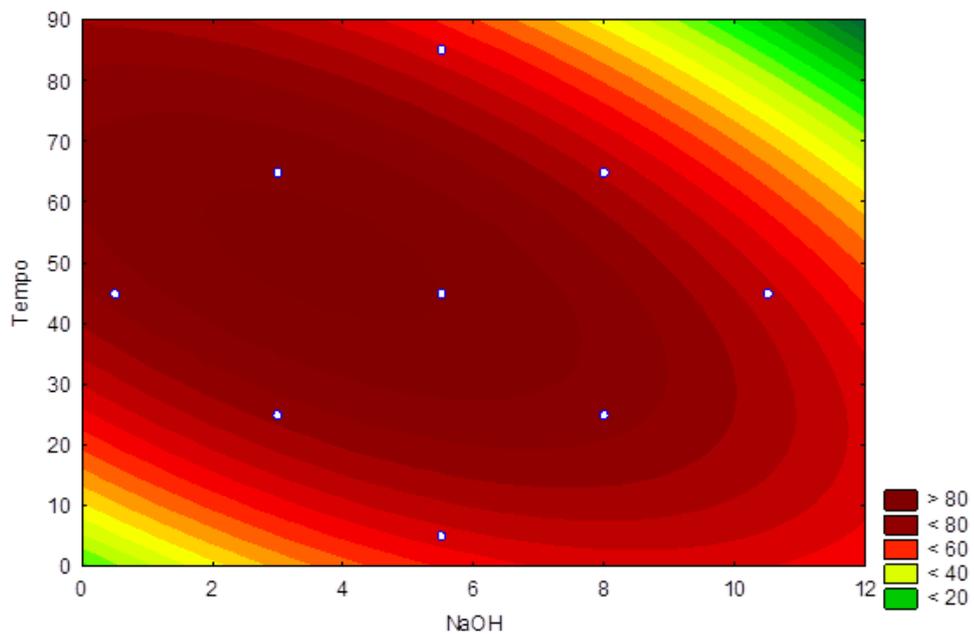
Fonte: O autor

Figura 24: Superfície de resposta na interação entre tempo e reagente no Planejamento composto central rotacional (estrela) para avaliação do processo organosolv no rendimento de glicose (A). Superfície de contorno contendo o mesmo centro rotacional da superfície de resposta (B).



A

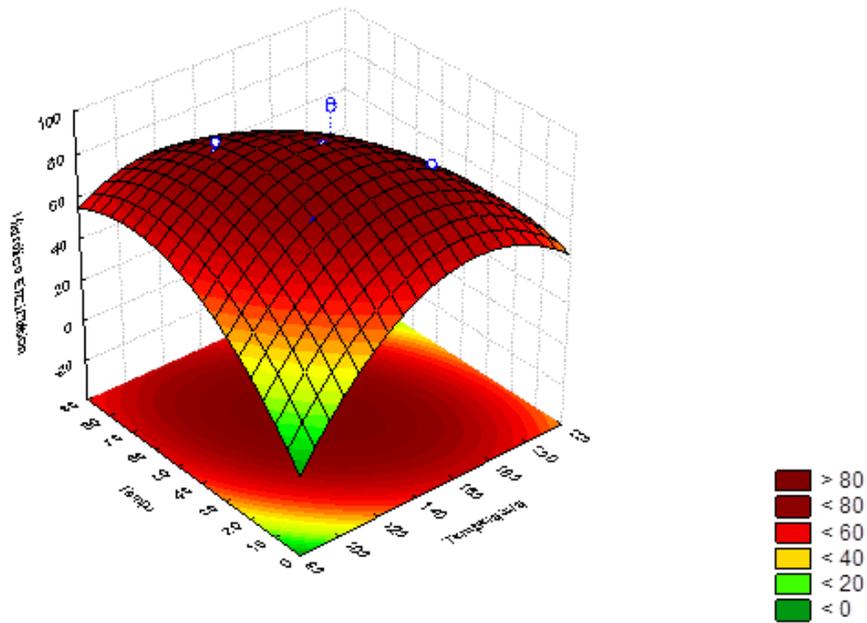
Fonte: O autor



B

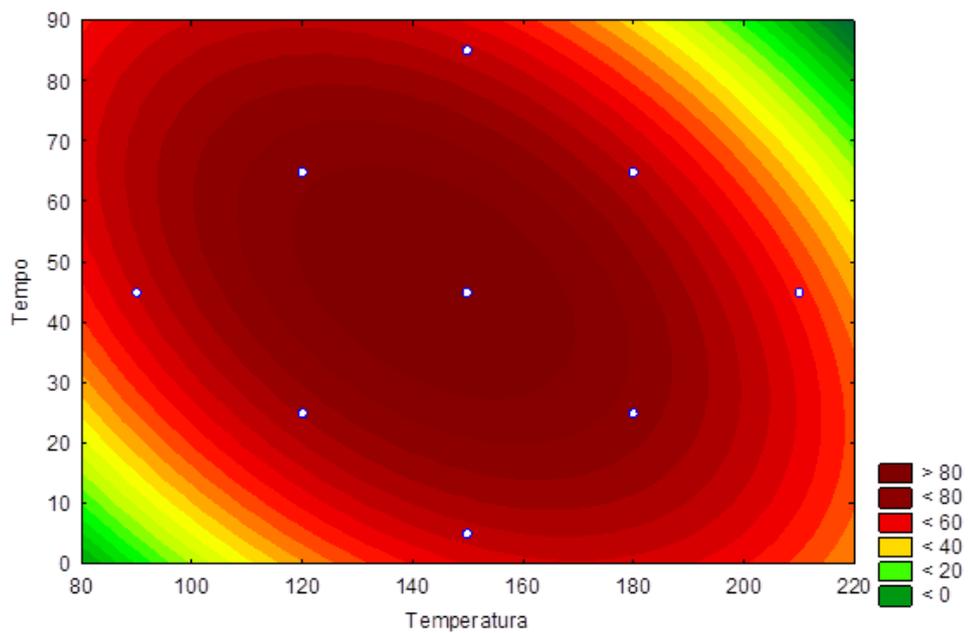
Fonte: O autor

Figura 25: Superfície de resposta na interação entre tempo e temperatura no Planejamento composto central rotacional (estrela) para avaliação do processo organosolv no rendimento de glicose. B: Superfície de contorno contendo o mesmo centro rotacional da superfície de resposta.



A

Fonte: O autor



B

Fonte: O autor

As duas amostras com menor rendimento de glicose foram as amostras 15 (65 minutos de pré-tratamento, a 120°C, com 8% de hidróxido de sódio e 30% de etanol) e 22 (45 minutos de pré-tratamento, a 210°C, com 5,5% de hidróxido de sódio e 50% de etanol). Tais amostras apresentaram rendimentos com altos teores de lignina e hemicelulose.

Já as amostras 9 (65 minutos de pré-tratamento, a 120°C, com 3% de hidróxido de sódio e 30% de etanol) e 25 (45 minutos de pré-tratamento, a 150°C, com 5,5% de hidróxido de sódio e 50% de etanol) apresentaram os maiores rendimentos de glicose, com 89% e 88% respectivamente.

Amostras com maior conteúdo de lignina provocam maior adsorção improdutivo de enzimas; quando não retirada, a lignina pode passar por redeposição em superfícies de celulose e ocupar poros antes acessíveis (WONG et al., 1988)

6 CONCLUSÃO

No que tange a escolha dos parâmetros e condições experimentais para o pré-tratamento organosolv em meio alcalino observou-se que os parâmetros de maior influência sobre a biomassa estudada (bagaço de cana-de-açúcar) foram: a concentração de reagente (hidróxido de sódio), a concentração de solvente (etanol) e a temperatura que a solução foi exposta. Uma faixa ótima, para maximizar a recuperação da xilana e lignina foi determinado em conjunto. A maximização da extração de xilana foi incompatível com a extração de lignina, nas condições de 30% de etanol, 8 % de hidróxido de sódio exposto a 120 °C por 65 minutos. Por outro lado, foi possível obter uma relação direta com a quantidade de reagente e solvente na recuperação da lignina sem que ocorresse uma diminuição significativa na recuperação da xilana, pois o reagente na concentração de 8 %, o solvente em 70% agindo a 180 °C por 65 minutos, gerou um rendimento de 87 % de lignina e 79 % de xilana. A hidrólise enzimática apresentou o melhor resultado nas condições de 65 minutos, a 120°C com 30% de etanol. A condição de maximização de extração de lignina e xilana são incompatíveis com rendimento de hidrólise enzimática. Porém, as condições do ponto central resultaram em altos rendimentos de extração de xilana, lignina e obtenção de glicose. Desta forma, foi possível identificar condições experimentais para extrair as duas macromoléculas no mesmo processo, com alta conversão da celulose em glicose via hidrólise enzimática.

o estudo também nos permitiu identificar e aplicar uma flexibilidade no processo, podendo adaptar as condições do pré-tratamento de acordo com a necessidade da fração a ser recuperada. e o principal parâmetro a ser variado é o etanol. altas concentrações de etanol

proporcionam uma maior recuperação de lignina, enquanto prejudica a recuperação da xilana, uma vez que, ela se solubiliza na primeira etapa do pré tratamento. Por outro lado, baixas concentrações de etanol aumentam a recuperação da xilana, mas diminuem a concentração de lignina. Portanto o pré-tratamento proporciona essa flexibilidade operacional permitindo que se maximize a fração desejada de acordo com a demanda.

7 REFERÊNCIAS

AGBOR, Valery B.; CICEK, Nazim; SPARLING, Richard; BERLIN, Alex; LEVIN, David B.. Biomass pretreatment: fundamentals toward application. **Biotechnology Advances**, [S.L.], v. 29, n. 6, p. 675-685, nov. 2011.

ALVIM, J. C.; ALVIM, F. A. L. S.; SALES, V. H. G.; SALES, P. V. G.; OLIVEIRA, E. M.; COSTA, A. C. R. Biorrefinarias: Conceitos, classificação, matérias primas e produtos. *Journal of Bioenergy and Food Science*. Macapá, v.1, n. 3, p. 61-77, out./dez. 2014.

ALVIRA, P., TOMÁS-PEJO, M., NEGRO, M.J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. *Bioresource Technology*, v.101, p.4851-4861, 2010.

Arantes, V., Saddler, J.N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnol Biofuels* 3, 4 (2010).

ARATO, et al. "The Lignol Approach to Biorefining of Woody Biomass to Produce Ethanol and Chemicals". Twenty-Sixth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, organizado por Brian H. Davison et al., Humana Press, 2005, p. 871–82.

ATLAS de energia elétrica do Brasil / Agência Nacional de Energia Elétrica. 3. ed. – Brasília : Aneel, 2008.

BALAT, M.; BALAT, H., O'ZB, C. Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science*, v. 34, p.551-573, 2008.

BARCELOS, C. Aproveitamento das Frações Sacarínea, Amilácea e Lignocelulósica do Sorgo Sacarino [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] para a Produção de Bioetanol. Tese (Doutorado em

Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

BOWES, B.G., MAUSETH, J.D. *Plant Structure – a Color Guide*. Jones and Bartlett Publishers, 2008, 2a edição.

BRASIL, Portal. Safra de cana 2016/17 cresce em produção e área. 2017. Disponível em: <https://www.novacana.com/n/cana/safra/conab-dados-finais-2016-17-levantamento-safra-2017-18-cana-de-acucar-180417> Acesso em: 28 set. 2018.

BRIENZO, Michel et al. Comparison Study on the Biomass Recalcitrance of Different Tissue Fractions of Sugarcane Culm. *BioEnergy Research*, v. 7, n. 4, p. 1454-1465, 2014.

BRIENZO M, ABUD Y, FERREIRA S, CORRALES RCNR, FERREIRA-LEITÃO VS, DE SOUZA W, SANT'ANNA C. Characterization of anatomy, lignin distribution, and response to pretreatments of sugarcane culm node and internode. *Industrial Crops and Products*, 2016.

BURANOV, A.U., MAZZA, G. Lignin in Straw of Herbaceous Crops. *Ind. Crops and Prod.*, n. 28, p. 237-259, 2008.

CARVALHO, W., CANILHA, L., FERRAZ, A., & MILAGRES, A. M. F. (2009). Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. *Química Nova*, 32(8),2191–2195.doi:10.1590/s0100-40422009000800033.

CARRASCO, C., et al. (2010). Catalyzed steam pretreatment and fermentation of enzymatically hydrolyzed sugarcane bagasse. *Enzyme Microb. Tech.* 46: 64–73.

CASTRO, A. M.; PEREIRA Jr., N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova*, v. 33, p. 1-12, 2010.

CHANDRA, R.P.,BURA, R.,MABEE, W.E.,BERLIN, A., PAN, X.. SADLEER, J.N. Substrate pretreatment: the key to effective enzymatic hydrolysis of lignocelullosics? *Adv. Biochem. Engin. Biotechnol.*, n.108, p.67–93, 2007.

CHANG, V. S., NAGWANI, M., & HOLTZAPPLE, M. T. (1998). Lime pretreatment of crop residues bagasse and wheat straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 74(3), 135-159.

CHEN, M., ZHAO, J., XIA, L. Comparison of four different chemicals pretreatment of corn stover for enhancing enzymatic digestibility. *Biomass and energy*, n.33, p. 1381-1385, 2009.

CHUM, H. L.; DOUGLAS, L. J.; FEINBERG, D. A.; SCHROEDER, H. A. Evaluation of pretreatments for enzymatic hydrolysis of cellulose. Colorado: Solar Energy Research Institute, 1985.

CLARKE, M.A.,GODSHAL; M.A. Chemistry and Processing of Sugarbet and Sugarcane. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam; 1988.

DEMİRBAŞ, A. (2003). Fuel Conversional Aspects of Palm Oil and Sunflower Oil. *Energy Sources*, 25(5), 457–466.doi:10.1080/00908310390142451.

DOHERTY, W.O.S., Mousavioun, P. and Fellows, C.M. (2011). Value-adding to cellulosic ethanol: Lignin polymers. *Ind. Crops Prod.* 33: 259–276.

ELANDER, R. T.; HSU, T. Processing and economic impacts of biomass delignification for ethanol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, San Diego, v. 45/46, p. 463-478, 1994.

EL-SAKHAWY, M., Lönnberg, B., Fahmy, Y. and Ibrahim, A. A. (1996). Organosolv pulping. 3. Ethanol pulping of wheat straw. *Cell. Chem. Technol.* 30: 161-174.

FAN, L.T., LEE, Y.H., GHARPURAY, M.M. The nature of lignocelulosics and their pretreatments for enzymatic hydrolysis. *Adv. Biochem. Eng.*, n.23, p. 157-187,1982.

FENGEL, D.; WEGENER (1984). G. Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions, Berlin and New York. *Holz Als Roh- Und Werkstoff*, 42(8), 314–314.doi:10.1007/bf02608943

FERREIRA, F. N. A., FERREIRA, W. M., MOTA, K. C. D. N., SILVA NETA, C. S., LARA, L.B.; SANTOS, E. A. D. (2015). Avaliação nutricional do bagaço de cana-de-açúcar

enriquecido com vinhaça em dietas para coelhos em crescimento. *Revista Caatinga*, 28(4), 217–226.

FERREIRA, Jorge A., e Mohammad J. Taherzadeh. “Improving the Economy of Lignocellulose-Based Biorefineries with Organosolv Pretreatment”. *Bioresource Technology*, vol. 299, março de 2020, p. 122695.

FERREIRA, V. Produção de β -glucosidase em *Saccharomyces cerevisiae* recombinante e avaliação de seu emprego no processo de hidrólise enzimática simultânea à fermentação para a produção de etanol de segunda geração. 2010. 132 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

FERREIRA, V. F., ROCHA, D. R. da, & SILVA, F. de C. DA. (2009). Potencialidades e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares. *Química Nova*, 32(3), 623–638.

FIGUEIREDO, F. C., et al. “Chemical Input Reduction in the Arabinoxylan and Lignocellulose Alkaline Extraction and Xylooligosaccharides Production”. *Bioresource Technology*, vol. 228, março de 2017, p. 164–70

GELLERSTEDT, G.; EK, M.; HENRIKSSON, G. *Wood chemistry and biotechnology*. [s.l.] Walter de Gruyter GmbH and Co. KG, 2009.

GIBSON, L. J. The hierarchical structure and mechanics of plant materials. *Journal of the Royal Society Interface*, v. 9, p. 2749–2766, 2012.

GÍRIO, F. M., et al. “Hemicelluloses for Fuel Ethanol: A Review”. *Bioresource Technology*, vol. 101, no 13, julho de 2010, p. 4775–800.

GOUVEIA, E. R., NASCIMENTO R. T., SOUTO-MAIOR, A.M., ROCHA, G. J M. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. *Química Nova*. 32:1-4, 2009.

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

HU, F. et al. Impact of Pseudolignin Versus Dilute Acid-Pretreated Lignin on Enzymatic Hydrolysis of Cellulose. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2012.

HU, F. e RAGAUSKAS, A. Suppression of Pseudo-Lignin Formation Under Dilute Acid Pretreatment Conditions. *Rsc Adv.* 4:4317, 2014.

IBGE. A geografia da cana-de-açúcar: Dinâmica Territorial Agropecuária 8p. 2017

JEDVERT, Kerstin; HEINZE, Thomas. Cellulose modification and shaping - a review . [S.l.: s.n.], 2017. 845-860 p.

JUSBRASIL - Lei 11241/02 | Lei nº 11.241, de 19 de setembro de 2002. Disponível em: https://www.al.sp.gov.br/repositorio/legislacao/lei/2002/lei-11241-19.09.20_02.html Acesso em 14/09/2018.

KAUTTO, J.; REALFF, M.J.; RAGAUSKAS, A.J. Design and simulation of an organosolv process for bioethanol production. *Biomass Conversion and Biorefinery*, v. 3, p. 199– 212, 2013.

KIM, D.; PAN, X. Preliminary study on converting hybrid poplar to high-value chemicals and lignin using organosolv ethanol process. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, Washington, D. C., v. 49, n. 23, p. 12156–12163, 2010.

KLAMRASSAMEE, T.; CHAMPREDA, V.; REUNGLEK, V.; LAOSIRIPOJAN, N. Comparison of homogeneous and heterogeneous acid promoters in single-step aqueous-organosolv fractionation of eucalyptus wood chips. *Bioresource Technology*, Oxon, v. 147, p. 276–284, 2013.

KONG, F., ENGLER, C.R., SOLTES, E.J. Effects of cell-wall acetate, xylan backbone and lignin on enzymatic hydrolysis of aspen Wood. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, n.34/35, p. 23-35, 1992.

KOSARIC, N.; VARDAR-SUKAN, F. Potential Source of Energy and Chemical Products. *The Biotechnology of Ethanol*. M. Roehr. Weinheim, WILEY-VCH. 2001

KUMAR, P. et al. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient

hydrolysis and biofuel production. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 28, n.8, p. 3713- 3729, 2009.

LARSSON PT, Wickholm K, Iversen T (1997) A CP/MAS C-13 NMR investigation of molecular ordering in celluloses. *Carbohydr Res* 302:19–25

LEE, J. Biological Conversion of Lignocellulosic Biomass to Ethanol. *Journal of Biotechnology*, v. 56, 1997.

LORENCINI, P. Otimização do Pré-tratamento Ácido de Bagaço de Cana para a sua Utilização como Substrato na Produção Biológica de Hidrogênio. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Programa de Pós-Graduação em Química, 2013.

MARABEZI, Karen. Estudo sistemático das reações envolvidas na determinação dos teores de lignina e holocelulose em amostras de bagaço e palha de cana-de-açúcar. 2009. Dissertação (Mestrado em Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009. doi:10.11606/D.75.2009.tde-07102009-100309. Acesso em: 2019-02-11

MARTINS, L. F. Caracterização do complexo celulásico de *Penicilium echinulatum*. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2005. 121 p.

MATSUOKA, S.; BRESSIANI, J.; MACCHERONI, W.; FOUTO, I. Sugarcane: Agricultural Production, Bioenergy and Ethanol. pp. 383-405 Published by Elsevier Inc, 2015.

MCDONOUGH, T. The chemistry of organosolv delignification IPST Technical Paper Series. [1992]. Disponível em: <<http://smartech.gatech.edu/handle/1853/2069>>.

MELATI, R. B. ; SHMATZ, A. ; PAGNOCCA, F. C. ; CONTIERO, J. ; Brienzo, M.. Sugarcane Bagasse: Production, Composition, Properties, and Feedstock Potential. In: Rachel Murphy. (Org.). Sugarcane: Production Systems, Uses and Economic Importance. 1ed.Nova York: Nova Science Publishers, 2017, v. 1, p. 1-38

MELATI, R. B., SHIMIZU, F. L., OLIVEIRA, G., PAGNOCCA, F. C., de SOUZA, W., SANT'ANNA, C., & BRIENZO, M. (2018). Key Factors Affecting the Recalcitrance and Conversion Process of Biomass. *BioEnergy Research*. doi:10.1007/s12155-018-9941-0.

MESA, L.; GONZALEZ, E.; RUIZ, E.; ROMERO, I.; CARA, C.; FELISSIA, F.; CASTRO, E. Preliminary evaluation of organosolv pre-treatment of sugar cane bagasse for glucose production: Application of 23 experimental design. *Applied Energy*, Elsevier, v. 87, p. 109–114, 2010.

MESA, L., et al. “The Effect of Organosolv Pretreatment Variables on Enzymatic Hydrolysis of Sugarcane Bagasse”. *Chemical Engineering Journal*, vol. 168, no 3, abril de 2011, p. 1157–62.

MORAIS, S.A.L.; NASCIMENTO, E.A.; MELO, D.C. Chemical analysis of *Pinus oocarpa* wood PARTE I – quantification of macromolecular components and volatile extractives. *Revista Árvore*, v. 29, n. 3, p. 461-470, 2005.

MOREIRA, J. R. (2000). Sugarcane for energy – recent results and progress in Brazil. *Energy for Sustainable Development*, 4(3), 43–54. doi:10.1016/s0973 0826(08)60252-5.

MOSIER, N. S. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technoly*, v. 96, p. 673–686, 2005.

MUURINEN, E. Organosolv pulping: a review and distillation study related to peroxyacid pulping. 2000. 314 f. Tese (Doutorado) - Faculty of Technology, University of Oulu, Oulu, Finlândia

NOVO, L. P. Determinação da relação dos parâmetros de solubilidade de Hansen de solventes orgânicos com a deslignificação organossolve de bagaço de cana. 2012. 139 f. Dissertação (Mestrado em Química, área de concentração Físico-Química) – Instituto de Química de São. [s.l: s.n.].

O’SULLIVAN, A. C. (1997). *Cellulose*, 4(3), 173–207. doi:10.1023/a:1018431705579.

OGATA, B. H, Caracterização das frações celulose, hemicelulose e lignina de diferentes genótipos de cana-de-açúcar e potencial de uso em biorrefinarias. Piracicaba 2013.

OKAMURA, K. Structure of Cellulose. In: Wood and Wood Cellulosic Chemistry. 10a. Marcel Decker Inc, 977p, 1990.

OLIVEIRA, F. M. V. Avaliação de Diferentes Pré-Tratamentos e Deslignificação Alcalina na Sacarificação da Celulose de Palha de Cana. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de Lorena, 2010.

OLIVEIRA, Luís Ricardo Martins. Estudo de alternativas de pré-tratamento e hidrólise do bagaço e palha de cana-de-açúcar para obtenção de etanol a partir de celulose. 2012. Tese (Doutorado em Conversão de Biomassa) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2012.

PAN, X.; ARATO, C.; GILKES, N.; GREGG, D.; MABEE, W.; PYE, K.; XIAO, Z.; ZHANG, X.; SADDLER, J. Biorefining of softwoods using ethanol organosolv pulping: preliminary evaluation of process streams for manufacture of fuel-grade ethanol and co-products. *Biotechnology and Bioengineering*, Hoboken, v. 90, n. 4, p. 473-481, 2005.

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

PANDEY, A. Handbook of plant-based biofuels. Boca Raton: CRC Press. ISBN, 1560221755, 2009

PATURAU, J.M. By-product of the Cane Sugar Industry – an Introduction to their Industrial Utilization. 3a. Ed. Amsterdam, Elsevier, 435p, 1989.

PEREIRA Jr., N.; COUTO, M. A. P. G.; SANTA ANNA, L. M. M. Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery. In *Series on Biotechnology*. Escola de Química - UFRJ, Rio de Janeiro, v. 2, p. 45, 2008.

PITARELO, A. P. Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha de cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática. Dissertação de mestrado - UFPR, Curitiba-PR (2007) p. 142

RABELO, S. C.; Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração. Tese de Doutorado – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química 2010. 447 p, 2010.

RAMOS, L.P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. *Quimica Nova*. v. 26, n. 6, p. 863–871, 2003.

RASMUSSEN, H. et al., Formation of Degradation Compounds From Lignocellulosic Biomass in the Biorefinery: Sugar Reaction Mechanisms. *Carbohydrate Research*. 385(19):45-57, 2014.

RASMUSSEN, H. et al., Formation of Degradation Compounds From Lignocellulosic Biomass in the Biorefinery: Sugar Reaction Mechanisms. *Carbohydrate Research*. 385(19):45-57, 2014.

RIBEIRO, E. A. M. Caracterização de membranas assimétricas de acetato de celulose produzidas a partir do aproveitamento do resíduo da palha de milho para uso em ultrafiltração. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 37, n. 3, p. 385-391, 2014.

ROCHA, G. J. DE M. et al. Influence of mixed sugarcane bagasse samples evaluated by elemental and physical–chemical composition. *Industrial Crops and Products*, v. 64, p. 52–58, fev. 2015.

ROSILLO-CALLE, F. ; BAJAY, S. V.; ROTHMAN,H. Uso da biomassa para produção de energia na indústria brasileira. UNICAMP. 447 p. Campinas, 2005.

SALOMAO, G. S. B. Análise da produção de celulasas por fungos utilizando bagaço de cana como substrato. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Espírito Santo, Instituto de Energia, São Mateus, ES, 2017.

SANT'ANNA, C., et al., The Influence of the Heterogeneity, Physicochemical and Structural Properties on the Recalcitrance and Conversion of Sugarcane Bagasse. In: Sugarcane: Production, Consumption and Agricultural Management Systems. 1 ed.: Nova Science Publishers, p. 1-33, 2014.

SANTOS, D. S. Produção de Etanol de Segunda Geração por *Zymomonas mobilis* Naturalmente Ocorrente e Recombinante, Empregando Biomassa Lignocelulósica. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2012.

SEABRA, J.E.A.; TAO, L.; CHUM, H.L.; MACEDO, I.C. A techno-economic evaluation of the effects of centralized cellulosic ethanol and co-products refinery options with sugarcane mill clustering. *Biomass Bioenerg.* 34, 1065–1078, 2010.

SILVA, A.M. Caracterização da parede celular de *Saccharum officinarum* L. (cana-de-açúcar) e *Brachiaria decumbens* Stapf (braquiaria). 105 p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, SP, 2005.

SILVA, N.L.C. Produção de Bioetanol de Segunda Geração a Partir de Biomassa Residual da Indústria de Celulose. 123 p. Tese (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, RJ, 2010.

SILVANIA, A. L. Aproveitamento de resíduos agroindustriais para a produção de celulasas e xilanases por espécies de *Bacillus* sp. 2013. 139p. Tese. (Doutorado em Produção Vegetal) Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE, Rio de Janeiro, 2013.

SOARES, P. Conversão da Celulose pela tecnologia Organosolv. v. 3, NAIPPE/USP, São Paulo, SP, 2011.

SOUSA, T. M. Estudo da hidrólise enzimática no tratamento de biomassa lignocelulósica usada como matéria-prima para a produção de biocombustível. 2014. 48 f. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia/MG, 2014

STICKLEN, M. B. Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. *Nature Reviews Genetics*, v. 9, n. 6, p. 433–443, jun. 2008.

SUN, Y., CHENG, J. Hydrolysis of Lignocellulosic Materials for Ethanol Production: a Review. *Biosource Technology*, n.83(1), p.1-11, 2002.

SUN, SN, Yuan, TQ, Li, MF, Cao, XF, Xu, F., Liu, QY: Caracterização estrutural de hemiceluloses de colmos de bambu (*Neosinocalamus Affinis*). *Célula. Chem. Technol.* 46, 3-4 (2012)

TAIZ, L., ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. Editora Arned, 4a edição, 2009.

TEERI, T. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. *Trends in Biotechnology*, n.15, p.160-167,1997.

TERAMOTO, Y.; LEE, S.H.; ENDO, H. Pretreatment of woody and herbaceous biomass for enzymatic saccharification using sulfuric acid-free ethanol cooking. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 8856–8863, 2008.

VILELA, A. D. S. Análise da produção de celulasas e beta glicosidae produzidas por *Streptomyces* sp. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, Goiânia, GO, 2013.

WILD, P, J, et al, *Organosolv fractionation of lignocellulosic biomass for an integrated biorefinery duurzame technologie*, 2015.

WONG, K. K., DEVERELL, K. F., MACKIE, K. L., CLARK, T. A., & DONALDSON, L. A. The relationship between fiber-porosity and cellulose 72 digestibility in steam-exploded *Pinus radiata*. *Biotechnology and bioengineering*, 31(5), 447-456, 1988.

XUE, B.-L., Wen, J.-L., Xu, F., Sun, R.-C.: Structural caracterização de hemiceluloses fracionadas por precipitação de etanol graduada de *Pinus yunnanensis*. *Carboidrato. Res.* 352, 159–165 (2012).

YAWALATA, D. Catalytic selectivity in alcohol organosolv pulping of spruce wood. 2001. 236 f. Tese (Doutorado) – Faculty of Forestry, University of British Columbia, Vancouver, Canada.

ZAKZESKI, Joseph, et al. “The Catalytic Valorization of Lignin for the Production of Renewable Chemicals”. *Chemical Reviews*, vol. 110, no 6, junho de 2010, p. 3552–99.

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

ZHANG, Z.; HARRISON, M. D.; RACKEMANN, D. W.; DOHERTY, W. O. S.; O’HARA, I. M. Organosolv pretreatment of plant biomass for enhanced enzymatic saccharification. *Green Chemistry*, Cambs, v. 18, n. 2, p. 360–381, 2016b.

ZHAO, X.; CHENG, K.; LIU, D. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 82, n. 5, p. 815–827, 2009.

ZHU, J. Y.; PAN, X.; ZALESNY JUNIOR, R. S. Pretreatment of woody biomass for biofuel production: energy efficiency, technologies, and recalcitrance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, New York, v. 87, n. 3, p. 847–857, 2010.