

**UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar, hidrólise e sua
caracterização química e estrutural, visando a produção de
etanol de segunda geração

ISMAEL ULISES MIRANDA ROLDÁN

Tese de Doutorado

2014



ISMAEL ULISES MIRANDA ROLDÁN

Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar, hidrólise e sua
caracterização química e estrutural, visando a produção de
etanol de segunda geração

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como
parte dos requisitos para obtenção do
Título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: **Profa. Dra. Cecilia Laluce**

Araraquara
2014

FICHA CATALOGRÁFICA

R744p Roldan, Ismael Ulises Miranda
Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar, hidrólise e sua caracterização química e estrutural, visando a produção de etanol de segunda geração / Ismael Ulises Miranda
Roldan. – Araraquara : [s.n], 2014
158 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Cecília Laluce

1. Biotecnologia. 2. Bagaço de cana. 3. Hidrólise. 4. Viscosidade. 5. Termogravimetria. I. Título.

DADOS CURRICULARES

Ismael Ulises Miranda Roldán

1. Dados pessoais

Nascimento: 05 de novembro de 1975

Nacionalidade: Peruana

Estado civil: Solteiro

Filiação: Mãe: Maria Virginia Roldán de Miranda

Pai: Oswaldo Miranda Gonzales

Endereço Profissional: Instituto de Química de Araraquara – UNESP

Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química

Rua Prof. Francisco Degni s/n –14800-900– Araraquara-SP

Profissão: Ingeniero en Industrias Alimentarias

2. Formação Acadêmica

2001-2003: Maestría en Biotecnología y Bioingeniería.

Universidad Nacional de Trujillo, UNT, Trujillo, Perú.

1993-1998: Graduación en Ingeniería en Industrias Alimentarias

Universidad Nacional de la Amazonia Peruana, UNAP, Iquitos, Perú.

3. Atuação profissional

2006 - 2009: Professor universitário, Universidad Científica del Perú, Iquitos.

Disciplinas ministradas no nível de graduação: Fundamentos de Biotecnologia, Química integrada, Fundamentos de matemática.

4. Atividades de pesquisa

4.1. Trabalhos apresentados em congressos

REMOVAL OF HEMICELLULOSE AND LIGNIN FROM SUGARCANE BAGASSE IN NATURA BY TWO-CONSECUTIVE PRETREATMENTS BASED ON THE USE OF MICROWAVE IRRADIATION. XIX SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS X SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS. 2013.

Physicochemical procedures for fractionation of sugarcane bagasse and lignocellulose hydrolysis. XLI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. 2012.

Selección primaria de *Xanthomonas* spp. productoras de xantana aisladas de Brassica oleracea. Congreso Peruano de biotecnología e bioingeniería, Lambayeque, Perú, 2001

Producción de xantana por *Xanthomonas campestris* CCBT-576 a partir de infusión de papa sacarosa. Congreso Peruano de biotecnología e bioingeniería, Lambayeque, Perú, 2001

Rendimiento de la recuperación de xantana por precipitación con etanol comercial e isopropanol. Congreso Peruano de biotecnología e bioingeniería, Lambayeque, Perú, 2001.

4.2. Trabalhos e Resumos Publicados

Extracción y Caracterización de Pectina de Citrus medica L. (CIDRA). Revista Amazónica de Investigación Alimentaria, v. 3-4, p. 125-132, 2005.

Obtención de mutantes de *Xanthomonas campestris*, sobreproductoras de xantana, a diferentes tiempos de irradiación láser ultravioleta A. ECIPERU, v. 2, p. 29-31, 2005.

Ethanol production from molasses in mixed cultures.. In: XXVIII International Society of Sugar Cane Technologists Congress-ISSCT 2013, 2013, São Paulo. XXVIII ISSCT Congress Program and Abstract Book, 2013. v.1.

Food fermentations: contributions of positive cooperation between yeasts. In: IX Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages, 2012, Araraquara. Book of Abstract of ninth IX Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages, 2012. p. 102.

4.3. Participação em eventos

8° Congresso Internacional de Bioenergia. São Paulo, Brasil, 2013.

Mini-Curso: Caracterização de Biomassa Vegetal. (Carga horária: 6h). XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos, Foz de Iguaçu, Brasil, 2013

Workshop 2012 Programas de Pós-graduação Química e Biotecnologia. UNESP. Araraquara, Brasil, 2012.

X Evento de Educação em Química. UNESP. Araraquara, Brasil, 2012

Operação e instalação básica do Sistema HPLC. (Carga horária: 17h). Scientific Instruments Co. Araraquara, Brasil, 2011.

Mini-Curso: HPLC Aplicações na área farmacêutica a atualidades da técnica. Congresso Farmacêutico da UNESP. Araraquara, Brasil, 2011.

IX Evento de Educação em Química. UNESP, Araraquara, Brasil, 2011.

Noções Básicas da Base Reaxys. UNESP, Araraquara, Brasil, 2010.

Fontes Informativas da Systems Link. UNESP, Araraquara, Brasil, 2010.

Oring 8. UNESP, Araraquara, Brasil, 2010.

ISMAEL ULISES MIRANDA ROLDAN

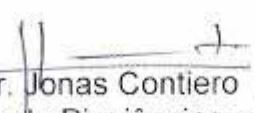
Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia.

Araraquara, 15 de abril de 2014.


BANCA EXAMINADORA


Prof^a Dr^a Cecilia Laluca (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara.


Prof. Dr. Jose Maria Corrêa Bueno
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia – UFSCar, São Carlos.


Prof. Dr. Jonas Contiero
Instituto de Biociências – UNESP, Rio Claro.


Dr^a Sarita Candida Rabelo
Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol – CTBE, Campinas.


Prof^a Dr^a Maria das Graças de Almeida Felipe
Escola de Engenharia de Lorena – USP, Lorena.

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais
e meus irmãos, com muito carinho.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me dado força para concluir esta etapa da minha vida.

À minha orientadora Professora Dra. Cecilia Laluce, por acreditar neste trabalho de pesquisa e ter levado adiante a conclusão desta tese.

Agradeço a toda equipe do laboratório: Jéssica Medina Gallardo, Maria Olivia Campos Masiero, Meline Morais, Ricardo Ventura, Jufner C. Vaz Toni, Thamires T. Zamai, Leonardo Almeida, Luís Fernando, Fernando Delfino, pelo apoio neste trabalho de pesquisa.

Agradeço ao Professor Daniel Pasquini e a toda a equipe de trabalho Wilson, Hudson e Ingrid pela ajuda na análise química da pesquisa.

Agradeço a meu amigo Robson Rosa da Silva por ser um grande amigo.

Agradeço a Maria Do Carmo Luiz por ter ajudado nesta pesquisa e pela amizade.

Agradeço a meu pai que me deu as forças para acreditar nesta pesquisa e que sempre teve o sonho de utilização do Bagaço de cana-de-açúcar em ser uma fonte de energia líquida.

Agradeço à minha mãe por sempre estar ao meu lado todo o tempo.

Agradeço meus irmãos por ter compreendido durante os anos que morei com eles.

Agradeço a Valdirene Ferreira Santos por ter me ajudado e me compreendido durante meu estudo de Doutorado.

Agradeço a todos meus amigos e amigas que conheci no Brasil e que ajudaram de forma direta e indireta para a realização deste trabalho.

Agradeço à CAPES pela bolsa concedida e pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

Ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Instituto de Química da UNESP pela oportunidade de cursar o doutorado.

RESUMO

A fermentação do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar (BCA), permite a obtenção de etanol 2G. Um dos principais desafios neste trabalho foi desenvolver metodologias para obtenção de hidrolisados ricos em glicose para a fermentação. Sete pré-tratamentos do BCA resultaram de simplificações e ajustes com base em procedimentos descritos na literatura foram realizados com o objetivo de obter frações ricas de pré-tratamento mais adequado na conversão de celulose em açúcares fermentáveis em etanol. Técnicas de caracterização química, morfológica e estrutural foram aplicadas ao bagaço de cana e frações ricas com celulose foram apresentadas aos vários pré-tratamentos a fim de prever e compará-los. Estas técnicas foram SEM, FT-IR, DRX, TG e análise química, utilizando o método TAPPI. O pré-tratamento com base na utilização de hidróxido de sódio assistida por micro-ondas provou ser mais eficiente e isto resultou em frações ricas em celulose PT6. As concentrações de fenóis totais e furanos resultantes de extrações ácidas aplicadas a frações ricas com celulose também foram determinados. As concentrações mais elevadas de extrações com fenol foram obtidos para as frações ricas em celulose, utilizando 30 % (m/v) de ácido sulfúrico, na presença de 100 mM de FeCl_3 , enquanto que as soluções de ácido sulfúrico, ambos os fenóis como os furanos foram obtidos em concentrações mais baixas, possivelmente devido degradação. No entanto, a utilização de 30 % (m/v) de ácido sulfúrico não era recomendada para a extração de frações menores de outras concentrações. Finalmente, o melhor pré-tratamento resultou no PT6 por seu maior rendimento e menor perda de massa inicial do BCA, enquanto que o tratamento com 6 % (m/v) de ácido sulfúrico, na presença de 100 mM de FeCl_3 liberou mais açúcares redutores libertados mais não-solubilizado durante os pré-tratamentos. Esta parece à fração mais rica de celulose mais promissora para obtenção de etanol de segunda geração.

Palavras chaves: Biotecnologia. Bagaço de cana. Hidrólise. Viscosidade. Termogravimetria.

ABSTRACT

The fermentation of sugarcane bagasse hydrolyzate (BCA) allows obtaining ethanol 2G. One of the main challenges in this work was to develop methodologies for obtaining rich hydrolysates into glucose for fermentation. Seven pretreatments BCA resulted from simplifications and adjustments based on literature procedures were carried out with the goal of getting rich fractions from pretreatment most appropriate in converting cellulose into fermentable sugars into ethanol. Techniques of chemical, morphological and structural characterization were applied to sugarcane bagasse and cellulose-enriched fractions were submitted the various pretreatments in order to predict and compare it. These techniques were SEM, FT-IR, XRD, TG and chemical analysis using the TAPPI method. The pre- treatment based on the use of sodium hydroxide assisted by microwave proved to be more efficient and this has resulted in fractions rich in cellulose PT6. Concentrations of total phenols and furans resulting from acid extractions applied to cellulose-enriched fractions were also determined. The highest concentrations of phenol extractions were obtained for fractions rich in cellulose using 30% (w/v) sulfuric acid in the presence of 100 mM FeCl₃, whereas solutions of sulfuric acid, both total phenols as furans were obtained at lower concentrations possibly due to degradation. However, the use of 30 % (w/v) sulfuric acid was not recommended for extracting minor fractions of other concentrations. Finally, the best pretreatment resulted in a fraction PT6 for its higher performance and lower loss of the initial mass of the BCA, whereas treatment with 6% (w/v) sulfuric acid in the presence of 100 mM FeCl₃ total reducing sugars released more non- solubilized during the pretreatment . This seems the most promising enriched fractions of cellulose for obtaining second-generation ethanol.

Keywords: Biotechnology. Sugarcane bagasse. Hydrolysis. Viscosity. Thermogravimetry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura recalcitrante da biomassa lignocelulósica.....	27
Figura 2. Estrutura química das principais hemiceluloses da parede celular das plantas.....	29
Figura 3. Estrutura da celulose.....	30
Figura 4. Representação das ligações de hidrogênio supramolecular da celulose.....	30
Figura 5. Álcoois precursores das unidades fenilpropanóides da lignina.....	31
Figura 6. Fluxograma modificado da obtenção do etanol de segunda geração	33
Figura 7. Fluxograma do pré-tratamento alcalino a temperatura ambiente.....	44
Figura 8. Fluxograma do pré-tratamento com ácido peracético.....	45
Figura 9. Fluxograma do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino	46
Figura 10. Fluxograma do pré-tratamento alcalino seguido de peróxido de hidrogênio.....	47
Figura 11. Fluxograma do pré-tratamento com hipoclorito de sódio.....	48
Figura 12. Fluxograma do pré-tratamento alcalino com BCA pré-tratado com explosão a vapor.....	49
Figura 13. Fluxograma do pré-tratamento do BCA com álcali assistido por micro-ondas, seguido de ácido assistido por micro-ondas	50
Figura 14. Mecanismo de hidrólise da celulose catalisada por ácido.....	57
Figura 15. Formação de inibidores da fermentação	57
Figura 16. Fluxograma da presente pesquisa	61
Figura 17. Fluxograma para medir os teores de umidade, cinza, lignina.....	65
Figura 18. Fluxograma para medir o teor de holocelulose.....	69
Figura 19. Fluxograma para medir os teores de α -celulose	71
Figura 20. Sistema de refluxo.....	72
Figura 21. Reação do reagente ácido dinitrossalicílico é reduzido pelo açúcar redutor em médio alcalino	74
Figura 22. Reação enzimática para quantificar a glicose.....	74
Figura 23. Esquema do viscosímetro de Ostwald.....	79
Figura 24. Fotos do BCA e das frações ricas em celulose	85

Figura 25. Liberação de açúcares redutores após extração com ácido sulfúrico 2-6% aplicado a fração rica em celulose do PT1, em ausência e presença do FeCl ₃	87
Figura 26. Liberação de açúcares redutores por extração com ácido sulfúrico 2-6% aplicado a fração rica em celulose do PT4, em ausência e presença do FeCl ₃	88
Figura 27. Liberação de açúcares redutores após hidrólise ácida diluída da fração rica em celulose do PT6, em ausência e presença do FeCl ₃	89
Figura 28. Liberação de açúcares redutores totais extraídos com soluções de ácido sulfúrico 2-6% da fração rica em celulose do PT7 em ausência e presença do FeCl ₃	90
Figura 29. Liberação de xilose por extração com soluções de ácido sulfúrico 2-6% da fração rica em celulose do PT1, em ausência e presença do FeCl ₃	92
Figura 30. Liberação de xilose por extração com soluções de ácido sulfúrico 2-6% da fração rica em celulose do PT4, em ausência e presença do FeCl ₃	93
Figura 31. Liberação de xilose por extração com soluções de ácido sulfúrico 2-6% da fração rica em celulose do PT6, em ausência e presença do FeCl ₃	95
Figura 32. Liberação de xilose por extração com soluções de ácido sulfúrico 2-6% da fração rica em celulose do PT7, em ausência e presença do FeCl ₃	96
Figura 33. Formação de fenóis totais por extração com ácido sulfúrico 2-6% da fração rica em celulose da hidrólise ácida do PT1, em ausência e presença do FeCl ₃	98
Figura 34. Formação de fenóis totais por extração com ácido sulfúrico 2-6% da fração rica em celulose da hidrólise ácida do PT4, em ausência e presença do FeCl ₃	99
Figura 35. Formação de fenóis totais por extração com ácido sulfúrico 2-6% da fração rica em celulose da hidrólise ácida do PT6, em ausência e presença do FeCl ₃	100

Figura 36. Formação de fenóis totais por extração com ácido sulfúrico 2-6% da fração PT7, em ausência e presença do FeCl ₃ .	102
Figura 37. Formação de furanos por extração com ácido sulfúrico 2-6% da fração PT1, em ausência e presença do FeCl ₃ .	104
Figura 38. Formação de furanos por extração com ácido sulfúrico 2-6% da fração PT4, em ausência e presença do FeCl ₃ .	105
Figura 39 Formação de furanos por extração com ácido sulfúrico 2-6% da fração PT6, em ausência e presença do FeCl ₃ .	106
Figura 40. Formação de furanos por extração com ácido sulfúrico 2-6% da fração PT7, em ausência e presença do FeCl ₃ .	107
Figura 41. Liberação de açúcares redutores totais após extração das frações concentrações ricas em em celulose dos pré-tratamentos 1, 4, 6 e 7, com ácido sulfúrico 30% em ausência e presença de FeCl ₃ .	109
Figura 42. Liberação de xilose durante as extrações com ácido sulfúrico 30% aplicadas as concentrações ricas em celulose dos pré-tratamentos 1, 4, 6 e 7, em ausência e presença de FeCl ₃ .	110
Figura 43. Liberação da glicose durante as extrações com ácido sulfúrico 30% aplicadas as concentrações ricas em celulose dos pré-tratamentos 1, 4, 6 e 7, em ausência e presença de FeCl ₃ .	111
Figura 44. Formação de fenóis totais durante as extrações com ácido sulfúrico 30% aplicadas as frações ricas em celulose dos pré-tratamentos 1, 4, 6 e 7, em ausência e presença de FeCl ₃ .	113
Figura 45. Formação de furanos durante as extrações com ácido sulfúrico 30% aplicadas as frações ricas em celulose dos pré-tratamentos 1, 4, 6 e 7, em ausência e presença de FeCl ₃ .	114
Figura 46. Fotografias e Imagens de MEV das amostras do BCA e das frações ricas em celulose (ampliados 330x a 20000x)	117
Figura 47. Imagens de MEV das amostras do BCA e das frações ricas em celulose ampliadas 330x	118
Figura 48. Espectros FTIR do BCA moído e das frações ricas em celulose.	122
Figura 49. Curvas de TG em atmosfera de N ₂ para BCA moído e das frações ricas em celulose	126

Figura 50. Curvas de DTG em atmosfera de N ₂ para BCA e das frações ricas em celulose	126
Figura 51. Curvas de TG em atmosfera de O ₂ para BCA e das frações ricas em celulose	128
Figura 52. Curvas de DTG em atmosfera de O ₂ para BCA e das frações ricas em celulose.....	129
Figura 53. Difratrogramas de raios-X do BCA e das frações ricas em celulose	131
Figura 54. Curva padrão de calibração de glicose 0,1% (m/v) para dosagens de açúcares redutores pelo método DNS.....	146
Figura 55. Curva padrão de calibração de glicose 0,1% (m/v) para dosagens de glicose pelo método enzimático da glicose oxidase.....	147
Figura 56. Curva padrão de calibração de xilose (mmol/L) para dosagens de xilose pelo método Floroglucinol.....	148
Figura 57. Curva padrão de calibração de fenóis totais (mg/L) para dosagens de Fenóis totais pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteau....	149
Figura 58. Deconvolução do BCA (Bagaço de cana-de-açúcar).....	150
Figura 59. Deconvolução do resíduo do PT1 (Pré-tratamento com peróxido alcalino).....	150
Figura 60. Deconvolução do resíduo do PT2 (Pré-tratamento com hipoclorito de sódio).....	151
Figura 61. Deconvolução do resíduo do PT3 (pré-tratamento alcalino a temperatura ambiente).....	151
Figura 62. Deconvolução do resíduo do PT4 (pré-tratamento alcalino a 100°C)	152
Figura 63. Deconvolução do resíduo do PT5 (pré-tratamento com NaOH seguido de H ₂ O ₂).....	153
Figura 64. Deconvolução do resíduo do PT6 (Pré-tratamento com álcali assistido com micro-ondas).....	154
Figura 65. Deconvolução do resíduo do PT7 (Pré-tratamento com álcali assistido com micro-ondas seguido de pré-tratamento com ácido assistido com micro-ondas).....	155

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito de diferentes pré-tratamentos nos materiais lignocelulósico.....	35
Tabela 2. Comparação entre os pré-tratamentos em relação aos rendimentos e perda de massa correspondentes as frações ricas em celulose	81
Tabela 3. Composições químicas obtidas para o bagaço de cana-de-açúcar (BCA) moído e das frações ricas de celulose por metodologia TAPPI	83
Tabela 4. Perda por solubilização dos componentes macromoleculares das frações ricas em celulose	84
Tabela 5. Concentração dos valores de máximos de açúcares redutores, xilose e glicose encontradas nos extratos das frações ricas em celulose durante extrações com soluções de ácido sulfúrico 6% e 30% (m/v).....	116
Tabela 6. Dados de temperaturas iniciais de degradação (T inicial), de degradação máxima (T Max), Temperatura com 50% de perda de massa e rendimento de carvão residual do BCA e das frações ricas em celulose obtidos em análises TG em atmosfera de N ₂	127
Tabela 7. Dados de temperaturas iniciais de degradação (T inicial), de degradação máxima (T Max), Temperatura com 50% de perda de massa e rendimento de carvão residual do BCA e das frações ricas em celulose obtidos em análises TG em atmosfera de O ₂	130
Tabela 8. Os índices de cristalinidade do BCA e das frações ricas em celulose	133
Tabela 9. Correlação entre composição química e o grau de polimerização (GP) e massa molecular (MM) das frações α-Celulose do BCA moído e das frações ricas em celulose.....	134
Tabela 10. Liberação de glicose nas frações ricas em celulose dos pré-tratamentos 1, 4, 6 e 7 pela hidrólise ácida com ácido sulfúrico 6% (m/v) em ausência e na presença do co-catalizador FeCl ₃	156
Tabela 11. Formação de Inibidores da fermentação das frações ricas em celulose dos pré-tratamentos 1, 4, 6 e 7 pela hidrólise ácida com ácido sulfúrico 6% (m/v) em ausência e presença do co-catalizador FeCl ₃	157
Tabela 12. Formação dos Inibidores da fermentação das frações ricas em celulose dos pré-tratamentos 1, 4, 6 e 7 pela hidrólise ácida com ácido sulfúrico 30% (m/v) em ausência e presença do co-catalizador FeCl ₃	158

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

at	atmosfera técnica (1 at = 1 kgf/cm ²)
ART	açúcares redutores totais
BCA	bagaço de cana-de-açúcar
DTG	derivada termogravimétrica
DRX	difração de raios-X
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
FTIR	infravermelho por transformada de Fourier (“Fourier transform infrared spectroscopy”)
g	gramas
GP	grau de polimerização
h	hora
HCl	ácido clorídrico
H ₂ SO ₄	ácido sulfúrico
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
ICr	índice de cristalinidade
IV	infravermelho
KBr	brometo de potássio
Kg	Kilograma
KOH	hidróxido de potássio
L	litro
MEV	microscopia eletrônica de varredura
min	minutos
mg/g	miligramas por grama
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
m/m	massa por massa
Nm	nanômetro
NREL	National Renewable Energy Laboratory
m/v	massa por volume
pH	potencial hidrogeniônico
PT1	Pré-tratamento com peróxido alcalino

- PT2 Pré-tratamento com Hipoclorito de sódio
- PT3 Pré-tratamento com NaOH 8% (m/v), a temperatura ambiente por 24 h
- PT4 Pré-tratamento com NaOH 1% (m/v) a 100°C por 1 hora.
- PT5 Pré-tratamento com NaOH 5 % (m/v) seguido de H₂O₂ 11% (v/v)
- PT6 Pré-tratamento com NaOH 1% (m/v) assistido por micro-ondas.
- PT7 Pré-tratamento com NaOH 1% (m/v) assistido por micro-ondas seguido com H₂SO₄ 1% (m/v) assistido por micro-ondas.
- rpm rotações por minuto
- TAPPI Technical Association of the Pulp and Paper Industry
- TG termogravimetria
- UV ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1. Breve panorama sobre a produção de etanol no Brasil	25
2.2. Bagaço de cana-de-açúcar (BCA)	26
2.2.1. Hemicelulose	28
2.2.2. Celulose	29
2.2.3. Lignina	31
2.2.4. Extrativos da biomassa vegetal	32
2.2.5. Cinzas	32
2.3. Pré-tratamento aplicados ao bagaço de cana-de-açúcar	32
2.3.1. Pré-tratamento efetivo e ideal	33
2.3.2. Tipos de pré-tratamentos do bagaço de cana-de-açúcar: fundamentos, vantagens e desvantagens.	34
2.3.3. Principais pré-tratamentos descritos na literatura	36
2.3.4. Fluxograma de pré- tratamentos descritos pela literatura	43
2.4- Caracterização morfológica e física do BCA e dos BCA pré-tratados	50
2.5. Hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar e dos BCA pré-tratados	56
3. OBJETIVO	59
3.1. Objetivo Geral	59
3.2. Objetivos específicos	59
4. MATERIAIS E MÉTODOS	60
4.1 Matéria-prima e Métodos de pré-tratamentos	60
4.1.1. Matéria-prima	60
4.1.2. Secagem e moagem	60
4.1.3. Lavagem do Bagaço de Cana-de-Açúcar	60
4.1.4. Procedimento para remover os extrativos do BCA	61
4.1.5. Métodos de pré-tratamentos	61
4.1.5.1. Pré-tratamento 1 (pré-tratamento com peróxido alcalino)	62
4.1.5.2. Pré-tratamento 2 (pré-tratamento com hipoclorito de sódio)	62

4.1.5.3. Pré-tratamento 3 (Pré-tratamento alcalino a temperatura ambiente)	62
4.1.5.4. Pré-tratamento 4 (Pré-tratamento alcalino a 100°C)	62
4.1.5.5. Pré-tratamento 5 (Pré-tratamento com hidróxido de sódio seguido de peróxido de hidrogénio)	63
4.1.5.6. Pré-tratamento PT6 (Pré-tratamento com álcali assistido com micro-ondas)	63
4.1.5.7. Pré-tratamento PT7 (Pré-tratamento com álcali assistido com micro-ondas seguido por tratamento ácido assistido com micro-ondas)	63
4.1.6. Lavagem e secagem das frações ricas em celulose derivados dos pré-tratamentos	64
4.2. Análise da composição química e rendimentos do bagaço de cana-de-açúcar e das frações ricas em celulose usando-se metodologias TAPPI modificadas	64
4.2.1. Teor de Umidade	64
4.2.2. Teor de Cinzas	65
4.2.3. Teor de Lignina Klason Insolúvel	66
4.2.4. Teor de Lignina Klason Solúvel	67
4.2.5. Obtenção da Holocelulose	68
4.2.6. Teor de α -Celulose	69
4.2.7. Teor das Hemiceluloses	70
4.3. Extrações de açúcares e formação de produtos inibidores da fermentação por tratamento com soluções de ácido sulfúrico	71
4.3.1. Hidrólise com ácido sulfúrico 2-6%	72
4.3.2. Hidrólise com ácido sulfúrico 30%	73
4.4. Ensaio analítico dos hidrolisados	73
4.4.1. Determinação de açúcares redutores totais	73
4.4.2. Determinação de glicose	74
4.4.3. Determinação de xilose	75
4.4.4. Determinação dos fenóis totais	76
4.4.5. Determinação de furanos	76
4.5. Caracterizações morfológicas e físicas do BCA e dos BCA pré-tratados	77
4.5.1. Microscopia eletrônica de varredura	77
4.5.2. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier	77
4.5.3. Difração de Raios-x	77

4.5.4. Termogravimetria	78
4.6. Determinação da massa molecular média viscosimétrica da α-celulose do BCA e do BCA pré-tratado	78
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	80
5.1. Composição química do BCA	80
5.2. Rendimento e composição das frações ricas em celulose resultantes dos pré-tratamentos em relação ao BCA	80
5.3. Liberação de açúcares redutores totais (ART) durante extração com ácido sulfúrico 2-6% das frações ricas em celulose (PT1, PT4, PT6 e PT7): efeito do tempo e concentração do ácido sulfúrico em ausência e presença de FeCl_3	86
5.3.1. Açúcares redutores liberados durante extração com ácido sulfúrico 2-6% aplicada a fração rica de celulose do PT1	86
5.3.2. Açúcares redutores liberados durante extração com ácido sulfúrico 2-6% da aplicada a fração rica em celulose PT4	87
5.3.3. Açúcares redutores liberados durante extração com ácido sulfúrico 2-6% da fração rica em celulose PT6	89
5.3.4. Açúcares redutores liberados durante extração com de ácido sulfúrico 2-6% aplicadas a fração rica em celulose PT7	90
5.4. Liberação de xilose durante extrações com soluções de ácido sulfúrico 2-6% obtidas das frações ricas em celulose (PT1, PT 4, PT 6 e PT7): efeito do tempo e concentração do ácido sulfúrico diluído em ausência e presença de FeCl_3	91
5.4.1. Xilose liberada por extração com solução 2-6% de ácido sulfúrico da fração rica em celulose PT1	92
5.4.2. Xilose liberada por extração com solução 2-6% de ácido sulfúrico da fração rica em celulose PT4	93
5.4.3. Xilose liberada por extração com solução 2-6% de ácido sulfúrico da fração rica em celulose PT6	94
5.4.4. Xilose liberada por extração com solução 2-6% de ácido sulfúrico da fração rica em celulose PT7	95

5.5. Formação de fenóis durante a extração das frações rica em celulose (PT1, PT4, PT6 e PT7): efeito do tempo, concentração de ácido sulfúrico ausência e presença de FeCl₃	97
5.5.1. Fenóis totais formados por extração com ácido sulfúrico 2-6% da fração rica em celulose PT1	97
5.5.2. Fenóis totais formados por extração com ácido sulfúrico 2-6% da fração rica em celulose PT4	99
5.5.3. Fenóis totais formados por extração com ácido sulfúrico 2-6% da fração rica em celulose PT6	100
5.5.4. Fenóis totais formados por extração com ácido sulfúrico 2-6% da fração rica em celulose PT7	101
5.6. Formação de furanos durante a extração das frações rica em celulose (PT1, PT4, PT6 e PT7): efeito do tempo, concentração de ácido sulfúrico ausência e presença de FeCl₃	102
5.6.1. Furanos formados durante extração com ácido sulfúrico 2-6% da fração rica em celulose PT1	103
5.6.2. Furanos formados durante extração com ácido sulfúrico 2-6% da fração rica em celulose PT4	105
5.6.3. Furanos formados durante extração com ácido sulfúrico 2-6% da fração rica em celulose PT6	106
5.6.4. Furanos formados durante extração com ácido sulfúrico 2-6% da fração rica em celulose PT7	107
5.7. Liberação dos açúcares redutores (xilose, glicose e formação de fenóis totais e furanos: efeito do tempo e hidrólise ácida concentrada das frações ricas em celulose, em ausência e presença de FeCl₃	108
5.7.1. Liberação de açúcares totais durante as extrações com ácido sulfúrico 30% (m/v) das frações ricas em celulose (PT1, PT4, PT6 e PT7).	108
5.7.2. Liberação da xilose durante as extrações com ácido sulfúrico 30% (m/v) das frações ricas em celulose (PT1, PT4, PT6 e PT7).	110
5.7.3. Liberação da glicose durante as extrações com ácido sulfúrico 30% (m/v) das frações ricas em celulose (PT1, PT4, PT6 e PT7).	111
5.7.4. Formação de fenóis durante as extrações com ácido sulfúrico 30% (m/v) das frações rica em celulose (PT1, PT4, PT6 e PT7)	112

5.7.5. Liberação de furanos durante as extrações com ácido sulfúrico 30% (m/v) das frações ricas em celulose (PT1, PT4, PT6 e PT7)	114
5.8. Comparação dos extratos quanto as maiores concentrações dos produtos extratidos	115
5.9. Características físicas e morfológicas do bagaço de cana-de-açúcar (BCA) e das frações ricas em celulose	117
5.9.1. Microscopia eletrônica de varredura	117
5.9.2. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier	119
5.9.3. Termogravimetria	122
5.9.3.1 TG (termogravimetria) e DTG (derivadas das curvas de termogravimétricas)	123
5.9.3.1.A. TG e DTG em atmosfera de nitrogênio	123
5.9.3.1.B. TG e DTG em atmosfera de oxigênio	127
5.9.4 Difração dos Raios-X	130
5.10. Determinação da massa molecular média viscosimétrica da α -celulose do BCA e das frações ricas em celulose	133
6. CONCLUSÕES	135
7. REFERÊNCIAS	137
8. APÊNDICE	146

1. INTRODUÇÃO

O pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar (BCA) é uma etapa fundamental para poder desestruturar a biomassa vegetal lignocelulósica, preparando-a para passar por um processo de hidrólise. Assim, o BCA pré-tratado hidrolisado poderá liberar os açúcares e estes poderão ser fermentados por leveduras, tornando possível a destilação e obtenção de etanol 2G.

Os diferentes pré-tratamentos, dependendo dos parâmetros submetidos, como temperatura, pressão, tempo e catalisador, permitem obter diferentes características químicas, morfológicas e físicas dos BCA pré-tratados, sendo que, os diversos pré-tratamentos não conseguem remover toda a lignina e todas as hemiceluloses. O pré-tratamento efetivo seria aquele que permitisse obter um teor maior de celulose ou de holocelulose, minimizando a degradação destes biopolímeros nos diversos pré-tratamentos. Já no processo de hidrólise, que pode ser ácida, enzimática ou por catálise heterogênea, é importante que seja utilizado um BCA pré-tratado com menor teor de lignina e com maior teor de celulose ou holocelulose.

Nesse sentido, o presente trabalho realiza um estudo sobre pré-tratamentos do bagaço da cana-de-açúcar, visando analisar empiricamente pré-tratamentos e identificar os que oferecem um melhor preparo ao material a ser utilizado na hidrólise e liberação de açúcares. O tipo de hidrólise escolhida, portanto foi à ácida, e não a enzimática, por liberar a xilose com mais facilidade e por custos operativos. Na hidrólise ácida utilizou-se um ácido de Lewis como co-catalizador (FeCl_3) para observar seus efeitos na liberação dos açúcares e formação de inibidores da fermentação na hidrólise.

A estrutura do trabalho contém revisão bibliográfica tratando os componentes majoritários e minoritários, os diversos tipos de pré-tratamento e caracterização de biopolímeros existentes na literatura. O tópico seguinte refere-se a objetivos do presente trabalho, que encontram-se divididos em gerais e específicos, tendo por finalidade comparar os rendimentos dos sete BCA pré-tratados a fim de selecionar e melhorar os BCA pré-tratados selecionados para a sua hidrólise. No terceiro tópico, realiza-se uma explanação sobre material e métodos utilizados para caracterizar o BCA moído e os BCA pré-tratados, utilizando-se a metodologia TAPPI, MEV, XRD, FTIR e TG. Para avaliar a liberação de açúcares e formação de inibidores da fermentação após a hidrólise, onde utilizou-se métodos bioquímicos e

posteriormente realizou-se a leitura em espectrofotômetro UV em diferentes comprimentos de onda. No quarto tópico, apresenta-se os principais resultados e discussão obtidos neste trabalho, procurando sustentar a explicação dos resultados, tendo como base os métodos de caracterização discutidos. O uso do FTIR confirma a deslignificação e aumento dos teores de celulose feitas com a metodologia TAPPI. Nesse mesmo contexto, ainda procura justificar a escolha dos BCA pré-tratados para a realização da hidrólise ácida. Assim, os BCA pré-tratados (PT1, PT4, PT6 e PT7) foram escolhidos por apresentar um alto rendimento no pré-tratamento da biomassa. Cabe destacar que o BCA do pré-tratamento 2 apresentou alto rendimento, mas não foi escolhido por utilizar hipoclorito de sódio que atualmente não é eco amigável. Por fim, com os melhores rendimentos dos BCA pré-tratados mediu-se a solubilização das frações lignocelulósicas, previamente caracterizadas, e a hidrólise com ácido sulfúrico 2, 4, 6 e 30% (m/v) foi realizada tendo como medidas finais concentrações de açúcares e inibidores da fermentação. Com isto, é possível concluir que os pré-tratamentos possibilitam um alto teor de celulose, o qual é essencial para a produção do etanol 2G devido a esse biopolímeros conter alto teor de hexoses.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Breve panorama sobre a produção de etanol no Brasil

A cana-de-açúcar é parte de pelo menos seis espécies de gramíneas perenes altas do gênero *Saccharum*, e que forma parte da família *Poaceae*. Trata-se de uma planta nativa de climas temperados quentes, comum nas regiões tropicais como Brasil, Índia, África e Ásia-Pacífico (CANILHA et al, 2012). Cabe destacar que no caso do Brasil, ela é destinada à produção de açúcar, bem como à produção do etanol, o qual poderá tornar-se uma commodity global, dado o seu potencial na substituição de combustíveis fósseis (HENRIQUE NETO, 2013).

De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento – BRASIL (2014), somente na safra 2014/15, a previsão do total de cana-de-açúcar moída é de 671,69 milhões de toneladas, com um aumento de 2,0% na produção em relação à safra anterior. Isso significa que 12,87 milhões de toneladas a mais serão moídas, conduzindo a produção de cerca de 39,46 milhões de toneladas de açúcar e 28,37 bilhões de litros de etanol.

Cada tonelada de cana de açúcar colhida e processada pelas usinas gera cerca de 270-280 kg de bagaço de cana (50% de umidade) e 140 kg de palha de cana. (CANILHA et al, 2012). Assim, estima-se que as usinas brasileiras produziram de 178 a 169 milhões de toneladas de bagaço de cana-de-açúcar e 92 milhões de toneladas de palha, somente na colheita 2014/15. Em cada milhão de toneladas de açúcar e / ou etanol, aproximadamente 85% do bagaço é queimado para a produção de vapor (calor) e geração de eletricidade/energia. Como o Brasil é um país emergente e empreendedor, busca com a expansão do mercado do etanol para competir com a gasolina, considerando-se assim um ganho em termos energéticos para o país por se tratar de um combustível líquido renovável.

Atualmente o estado de São Paulo é o maior produtor de área cultivada de cana-de-açúcar, respondendo por 51,7% do total da produção no país (BRASIL, 2014). Segundo Companhia Nacional de Abastecimento – BRASIL (2013), há 402 usinas produtoras de açúcar e etanol no Brasil, dentre as quais 257 usinas produzem açúcar e etanol, 127 produzem apenas álcool e 18 produzem apenas açúcar.

2.2. Bagaço de cana-de-açúcar (BCA)

O bagaço de cana-de-açúcar é um dos principais co-produtos gerados no processamento da cana-de-açúcar para produção de açúcar e etanol. Este co-produto da moenda da cana-de-açúcar está disponível nas usinas sucroalcooleiras, podendo ser utilizado para gerar energia térmica, elétrica e etanol de segunda geração, utilizando a infraestrutura convencional das plantas de produção de etanol (DIAS et al., 2009). Esta via alternativa de produção do etanol consiste em hidrolisar a biomassa celulósica com geração de glicose, a qual, durante esse processo deve ser fermentada (OGEDA; PETRI, 2010).

Segundo Canilha et al., (2011), a composição do bagaço de cana-de-açúcar é muito variável, sendo que a explicação desse autor parte do princípio de que a diversidade de dados da composição química dos materiais lignocelulósicos depende, entre outros fatores, da variedade, da localização e das práticas agrícolas utilizadas para fazer crescer a cultura, bem como, dos métodos empregados em análises da composição. Além disso, o bagaço de cana-de-açúcar, como muitos outros tipos de biomassa, é um co-produto de um processo industrial, que introduz uma fonte adicional de variação composicional (HAMES et al., 2003). Este material lignocelulósico (Figura 1) contém teores relativamente altos de monômeros e polisacarídeos, além de baixos de lignina. As fibras do bagaço da cana-de-açúcar são constituídas por: 35 – 45% de celulose; 26,2 – 35,8% de hemicelulose e 11,4 – 25,2% de lignina (CANILHA et al., 2011).

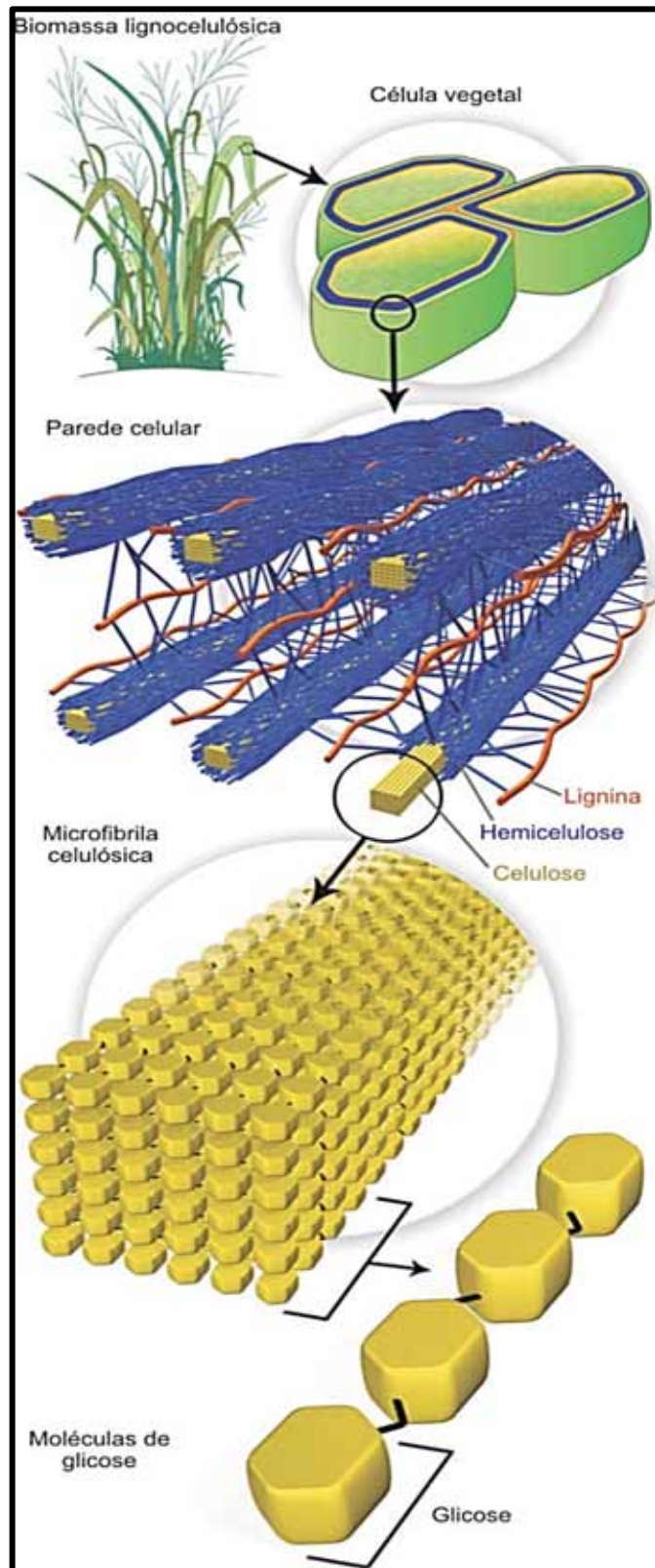


Figura 1. Estrutura recalcitrante da biomassa lignocelulósica (SANTOS et al, 2012).

2.2.1. Hemiceluloses

As hemiceluloses são polissacarídeos constituintes da parede celular das plantas, as quais ocupam lugar de segundo polímero renovável mais abundante nos materiais lignocelulósicos, depois da celulose. Elas representam um tipo de heteropolissacarídeo de menor grau de polimerização (100 - 200 unidades) e muito ramificada, com estrutura complexa que contém como maior constituinte a xilose seguido de glicose, manose, galactose, arabinose, ramnose, ácido glucurônico e ácido galacturônico, em várias quantidades, dependendo da fonte vegetal (RAMOS, 2003; STAMBUK et al., 2008; OGEDA e PETRI 2010; PENG et al., 2012; SANTOS et al., 2012). As hemiceluloses são normalmente ligadas a outros componentes da parede celular tais como celulose, proteínas da parede celular, lignina e compostos fenólicos ligados covalentemente e com ligações de hidrogênio, e por interações iônicas e hidrofóbicas (PENG et al., 2012).

As principais hemiceluloses encontradas em plantas são os xiloglucanos (XyG), os glucuronoarabinoxilanos (GAX) e os mananos (MN) (Figura 2). A maioria das plantas possui o xiloglucano como hemicelulose principal. Já as gramíneas apresentam como principal os glucuronoarabinoxilanos (GAXs) (SAAVEDRA et al., 1988; PENG et al., 2012), embora também possuam, em pequenas proporções, xiloglucanos e mananos. Além do GAXs, os β -glucanos são relativamente abundantes em todos os tecidos de cana-de-açúcar (BUCKERIDGE et al., 2010, PENG et al., 2012).

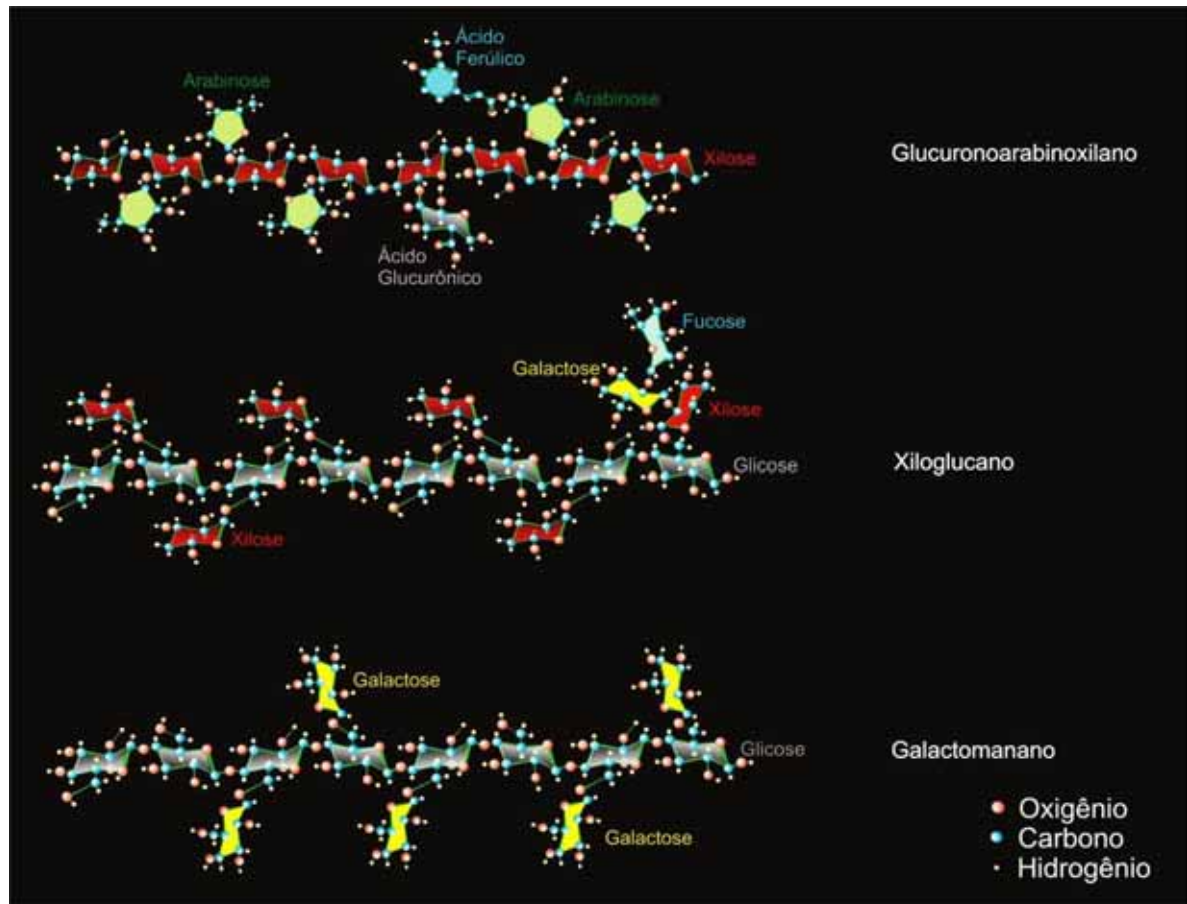


Figura 2. Estrutura química das principais hemiceluloses da parede celular das plantas (BUCKERIDGE et al., 2010; PENG et al., 2012).

2.2.2. Celulose

Como pode ser observada na Figura 3, a celulose é um polímero linear altamente ordenado de celobiose, cujo comprimento pode apresentar 10.000 unidades de D-glicose em sua cadeia de celulose, formando fibrilas. (STAMBUK et al., 2008; PANDEY et al., 2000; CHUNDAWAT et al., 2011). A estrutura da celulose pode ser classificada em três níveis organizacionais. O primeiro é definido pela sequência de resíduos β -D-glicopiranosídicos unidos por ligações covalentes, formando o homopolímero de anidroglicose com ligações β -D (1 \rightarrow 4) glicosídicas, da fórmula geral $(C_6H_{10}O_5)_n$. Na Figura 4, pode-se perceber o segundo nível que descreve a conformação molecular, isto é, a organização espacial das unidades repetitivas, sendo caracterizado pelas distâncias das ligações e respectivos ângulos e pelas ligações de hidrogênio intramoleculares. O terceiro nível define a associação

das moléculas, formando agregados com uma determinada estrutura cristalina. Estes agregados conferem elevada resistência à tensão, tornando a celulose insolúvel em água e em um grande número de outros solventes. (SANTOS et al., 2012; DHEPE e FUKUOKA, 2008).

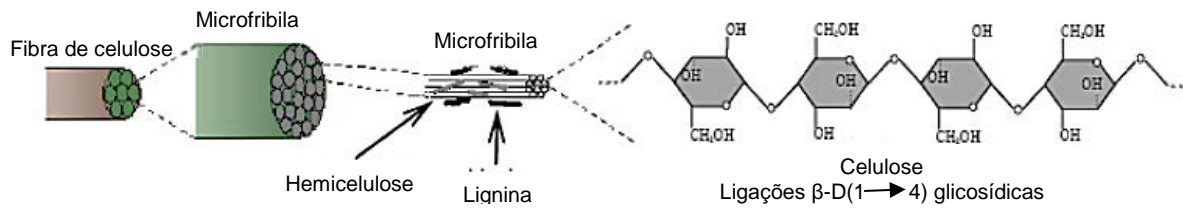


Figura 3. Estrutura da celulose (adaptado de TAHERZADEH et al. (2008).

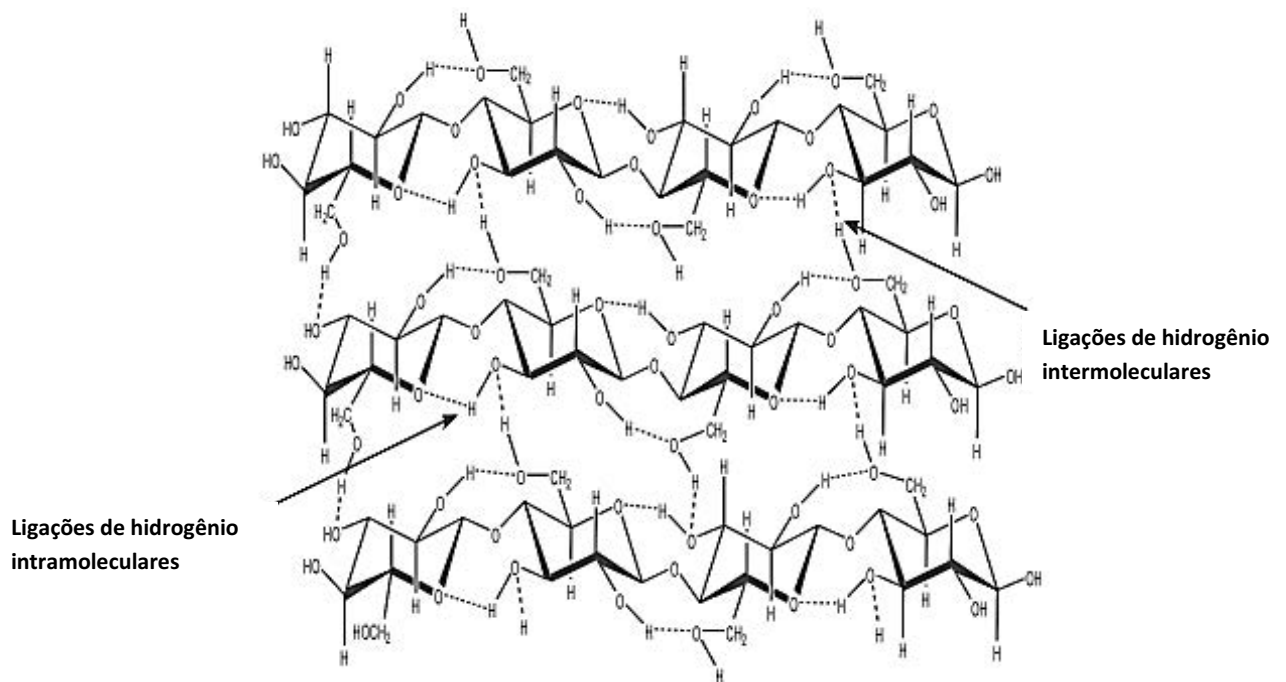


Figura 4. Representação das ligações de hidrogênio supramolecular da celulose (SANTOS et al., 2012).

2.2.3. Lignina

As ligninas são macromoléculas complexos amorfos de fenilpropanos derivadas de três unidades monoméricas básicas: p-hidroxifenilas (H), guaiacilas (G), e siringilas (S) (Figura 5), que variam entre as espécies e de acordo com o tipo de tecido das células. A estrutura da lignina não é homogênea uma vez que apresenta regiões amorfas e estruturas globulares. (SANTOS et al., 2012; CHUNDAWAT et al., 2011; ZHA e PUNT, 2013; GOSSELINK et al., 2004). A hipótese da estrutura de lignina surge a partir da polimerização dos radicais fenil (β -O-4- ligado ao éter de arilo que são as ligações mais comuns) formados pelas enzimas oxidativas na parede celular. As ligninas de madeira dura são predominantes nas unidades G e S com vestígios de unidades H. As ligninas de madeira mole são maioritariamente compostas por unidades G (PU et al., 2011; CHUNDAWAT et al, 2011), enquanto que as monocotiledôneas (exemplo: palha de milho, cana-de-açúcar) incorporam quantidades equivalentes de unidades G e S, juntamente com quantidades significativamente mais elevadas de unidades H (CHUNDAWAT et al, 2011).

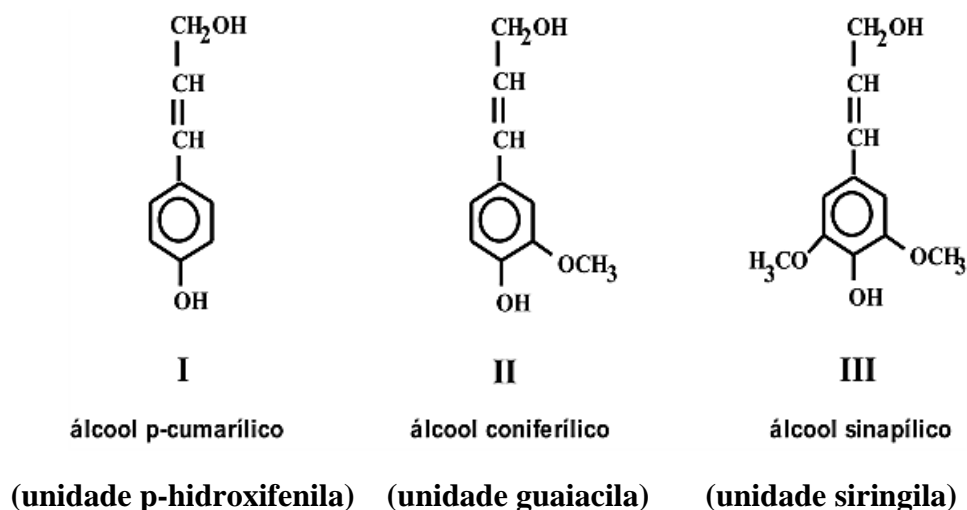


Figura 5. Álcoois precursores das unidades fenilpropanóides da lignina (ZHA e PUNT, 2013, PU et al., 2011).

2.2.4. Extrativos da biomassa vegetal

Segundo Taherzadeh e Karimi (2007), os extrativos geralmente representam a menor fração (1-5%) do material lignocelulósico. No bagaço de cana-de-açúcar, o teor desses extrativos varia de 4,6 - 9,1% (CANILHA et al., 2012) e contém um grande número de compostos lipofílicos e hidrofílicos. Os extrativos são classificados em quatro grupos: a) terpenóides e esteróides, b) gorduras e ceras, c) constituintes fenólicos, e d) componentes inorgânicos.

2.2.5. Cinzas

Segundo Taherzadeh e Karimi (2007), os materiais lignocelulósicos apresentam pequenas quantidades de cinza que variam de 0 – 2% e que contêm vários compostos inorgânicos. Canilha et al., (2012) reporta uma variação de teor de cinza de 1,0% até 2,8% de vários bagaços de cana-de-açúcar. Estes compostos inorgânicos podem conter óxidos de silício, potássio, fosforo e ferro.

2.3. Pré-tratamentos aplicados ao bagaço de cana-de-açúcar

Como ilustrado na Figura 6 (CANILHA et al. 2012), os diversos tipos de pré-tratamentos podem gerar uma fração líquida rica em hemiceluloses e lignina (licor negro) e um resíduo sólido que pode ser a celulignina ou holocelulose, dependendo do pré-tratamento. A holocelulose contém como polímeros principais a celulose e a hemiceluloses. A hemiceluloses, a celulignina e a holocelulose podem ser hidrolisadas por via enzimática, química ou físico-química para formar os açúcares úteis no processo de fermentação por diversos micro-organismos com e sem co-cultura ou recombinantes (*Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis*, *Clostridium thermocellum*, *Candida shehatae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Issatchenkia orientalis*) (CARDONA et al., 2010, GALLARDO et al., 2011). Os hidrolisados são fermentados e resultam na produção de etanol quando são previamente neutralizados e/ou detoxificados. A fração final rica em celulose das hidrólises pode ser usado para produzir derivados de papel ou celulose (CARDONA et al., 2010).

2.3.1. Pré-tratamento efetivo e ideal

Segundo Santos et al. (2012), um pré-tratamento efetivo deve obedecer a uma série de características, como: resultar em uma elevada recuperação de todos os carboidratos, elevada digestibilidade da celulose na hidrólise enzimática subsequente, elevada concentração de sólidos, além de uma elevada concentração de açúcares livres na fração líquida. E deve requerer ainda uma baixa demanda energética, evitando a formação de subprodutos, resultando em baixo investimento e custo operacional. Já para Canilha et al. (2012), o pré-tratamento ideal de biomassa de cana-de-açúcar deve aumentar a área superficial acessível, descristalizar e despolimerizar parcialmente a celulose, solubilizar as hemiceluloses e / ou lignina, modificar a estrutura da lignina, maximizar a digestibilidade enzimática do material pré-tratado, minimizar a perda de açúcares e minimizar os custos de capital e de operacionais.

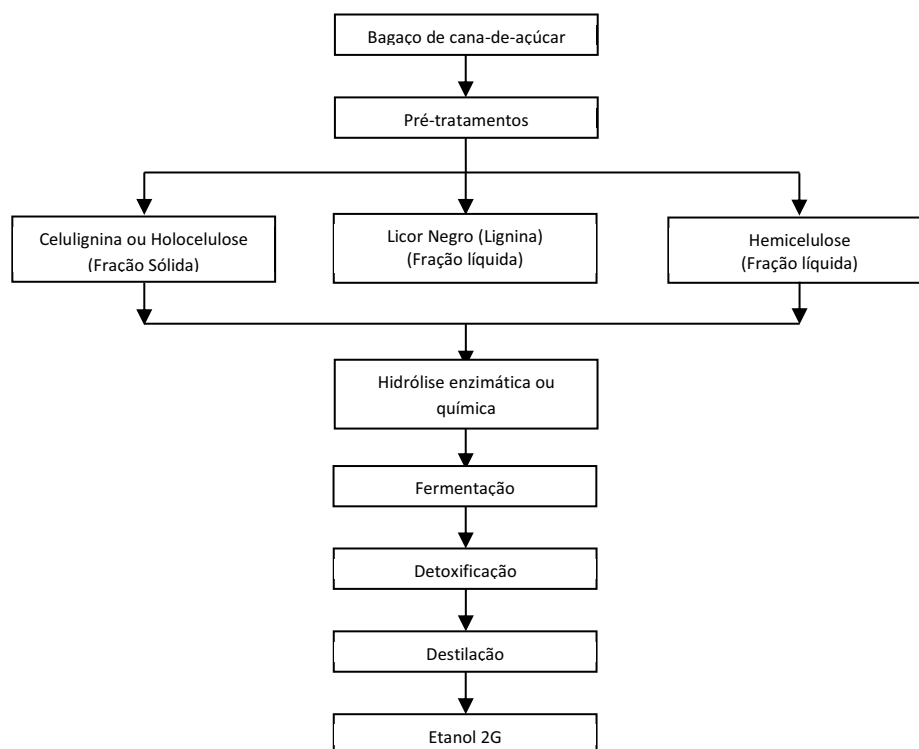


Figura 6. Fluxograma modificado da obtenção do etanol de segunda geração (CANILHA et al., 2012; RAMOS et al., 2003)

2.3.2. Tipos de pré-tratamentos do bagaço de cana-de-açúcar: fundamentos, vantagens e desvantagens

Ao longo dos últimos anos, foram pesquisados muitos métodos de pré-tratamento. As técnicas de pré-tratamento podem ser agrupadas em quatro categorias: físico, químico, físico-químico (ou combinado) e biológico (CARVALHO et al, 2009; SANTOS et al, 2012; CANILHA et al., 2012), que são apresentadas as vantagens e desvantagens dos pré-tratamentos na tabela 1 e são demonstrados nos exemplos que se seguem.

A. Pré-tratamentos físicos:

- Moagem: bolas, dois rolos, martelo, facas.
- Irradiação: raios gama, feixe de elétron, micro-ondas.
- Outras: Expansão, extrusão, pirólises.

B. Pré-tratamentos físico-químicos:

- Explosão: explosão a vapor, explosão da fibra com amônia (AFEX), explosão a CO₂, explosão a SO₂.
- Outras: hidrotermico (LHW), alta pressão de vapor, pré-tratamento químico junto com micro-ondas; pré-tratamento com sulfito para superar a recalcitrância do material lignocelulósico (SPORL).

C. Pré-tratamento químico:

- Alcalis: Hidróxido de sódio (NaOH), amônia, sulfito de amônia, hidróxido de cálcio (Ca(OH)₂), percloração com amônia reciclada (ARP).
- Ácidos: H₂SO₄, HCl, H₃PO₄, HNO₃, HO₂CCO₂H (ácido oxálico).
- Gás: dióxido de cloro, dióxido de nitrogênio, dióxido de enxofre.
- Agentes oxidantes: Peróxido de hidrogênio (H₂O₂), oxidação úmida, ozônio.
- Extração de lignina empregando solventes: organosolve (etanol/água, benzeno/água, etilenoglicol, butanol/água, acetona, metanol, e ácidos inorgânicos fortes ou bases como catalizadores).

D. Pré-tratamento biológico:

- Microbiana (fungos e actinomicetos), hidrólise enzimática.

Tabela 1. Efeito de diferentes pré-tratamentos nos materiais lignocelulósicos (SANTOS et al, 2012; CARVALHO, 2009).

Pré-tratamento		Características composicionais			Vantagens	Desvantagens
		Celulose	Hemicelulose	Lignina		
Físico	Moinho de bolas	Intensiva diminuição do grau de cristalinidade	Não remove	Não remove	Redução da cristalinidade	Alto consumo de energia
	Irradiação com micro-ondas	Pouca despolimerização	Significativa solubilização	Significativa solubilização	Alta eficiência no aquecimento	Caro
Químico	Ácido diluído	Pouca despolimerização	80-100% de remoção	Pouca remoção, mas ocorre mudança da estrutura	Condições médias, alta produção de xilose	Difícil recuperação do ácido, corrosivo e relativamente custoso
	Hidróxido de sódio	Inchaço significativa	Considerável solubilização	Considerável solubilização (>50%)	Remoção efetiva de ésteres	Reagente caro, recuperação alcalina
	cal	Insignificante despolimerização	Significativa solubilização (30%)	Parcial solubilização (~40%)	Remoção efetiva da lignina e acetil, barato	Menos efetivo devido a pobre solubilidade no tempo
	ARP (percloração com amônia reciclada)	Menor de 5% de despolimerização	~50% de solubilidade	~70% de solubilização	Efetiva deslignificação	Recuperação alcalina, relativamente caro
	Peróxido alcalino	Considerável inchaço	~50% de solubilidade	~50% de solubilidade	Efetiva deslignificação	Pequena decomposição de açúcares solúveis
	Ozonólise	Não foi observada despolimerização	Pequena solubilização	Solubilização >70%	Efetiva deslignificação em condições suaves	Caro, necessidade de mais ozônio
	Oxidação úmida	Pouca despolimerização	>90% solubilização	40-50% solubilização	Remoção efetiva de hemicelulose e lignina	não é efetivo para alta concentração de lignina
	Organosolve	Considerável inchaço	Significativo, quase completa	Significativo, pode ser quase completa	Alta produção de xilose, efetiva deslignificação	Recuperação cara do solvente
Combinado	Explosão de vapor	Pouca despolimerização	80-100% de remoção	Pouca remoção, mas ocorre mudança da estrutura	Geração eficiente de energia, baixo custo de reciclagem	Degradação da xilana à inibitório
	AFEX (explosão da fibra com amônia)	Diminuição do grau de cristalinidade	>60% de solubilidade	10-20% de solubilização	Menor perda de xilanas, não formação de inibidores	Recuperação de amônia, não é efetivo para alta concentração de lignina
	Explosão com CO ₂	Considerável inchaço	Considerável solubilidade	Considerável solubilidade	Não gera inibidores	Processo caro
	Hidrotérmico	Considerável inchaço	Quase total solubilização	Considerável solubilidade	Não requer agentes químicos, não é corrosivo	não é efetivo para alta concentração de lignina
Biológico	Biológico	20-30% de despolimerização	Acima de 80% de solubilização	~40% de deslignificação	Baixo requerimento de energia, efetiva deslignificação	Perda de celulose, baixa taxa de hidrólise

2.3.3. Principais pré-tratamentos descritos na literatura

A. Pré-tratamento Físico: moagem

Um dos principais pré-tratamentos físicos é a moagem seca. Este pré-tratamento mecânico tem como vantagem diminuir o tamanho da partícula do bagaço, aumentando a área superficial e reduzindo o grau de polimerização e a cristalinidade (OGEDA e PETRI, 2010; CANILHA et al., 2012). Este método pode ser considerado favorável ao meio ambiente, porque não é necessária adição de produtos químicos e não gera inibidores (CANILHA et al., 2012), porém, como desvantagem não é suficiente para elevar a taxa de conversão de açúcar e remoção de lignina (OGEDA e PETRI, 2010). Além disso, requer um alto consumo de energia pelas máquinas e, por conseguinte, altos custos na produção dessa energia. Moagens repetitivas são necessárias antes dos outros pré-tratamentos (CANILHA et al., 2012), por exemplo: a utilização de moinho de facas.

B. Pré-tratamento Químico:

Diversos pré-tratamentos químicos estão descritos na literatura como segue:

Ácidos

O pré-tratamento ácido (hidrólise ácida diluída) é, entre todos os tipos de pré-tratamentos químicos da biomassa, o mais utilizado e mais antigo. Na hidrólise ácida diluída, as solubilizações das hemiceluloses ocorrem perto do ponto de ebulição da água, enquanto que a hidrólise com ácido concentrado é realizada a baixas temperaturas. Essas hidrólises liberam as pentoses e facilitam a hidrólise enzimática do resíduo do pré-tratamento (celulignina) (CANILHA et al., 2012). O ácido mais comumente utilizado é ácido sulfúrico (H_2SO_4), de modo que seu contato com a biomassa promove a hidrólise das hemiceluloses em xilose e outros açúcares. No entanto, outros ácidos tais como ácido clorídrico, ácido fosfórico, ácido nítrico, e o ácido oxálico (CANILHA et al., 2012; CARDONA et al., 2010) também têm mostrado resultados promissores. As condições do processo podem ser realizadas a

temperaturas entre 120-180 °C em intervalos de tempos que variam de 15 - 60 min (CANILHA et al., 2012).

Uma vantagem do processo de pré-tratamento com o ácido é a possibilidade da sua realização próximo a ponto de ebulição da água como acima dela, conseqüentemente, uma redução dos custos de energia. No entanto, em concentrações elevadas de ácido podem ocorrer problemas com a corrosão do equipamento e os custos de manutenção ser dispendiosos. Outra desvantagem deste processo é a possibilidade de formação de outros sub-produtos considerados inibidores da fermentação microbiana, como furanos, ácidos carboxílicos, ácido acético, ácido fórmico e levulínico, e compostos fenólicos. (CANILHA et al., 2012; BANERJEE et al., 2010; CARDONA et al., 2010; TAHERZADEH e KARIMI, 2007). Por isso, é necessário neutralizar e elevar o pH dos hidrolisado antes das fermentações (CANILHA et al., 2012) para diminuir os efeitos dos inibidores da fermentação.

Bases:

O pré-tratamento alcalino compreende tanto um processo de deslignificação da biomassa lignocelulósica, como uma solubilização de uma quantidade significativa de hemiceluloses. Neste pré-tratamento são utilizadas várias bases, como hidróxido de cálcio (cal), hidróxido de amônio (TABIL et al., 2011), hidróxido potássio e hidróxido de sódio em combinação com peróxido de hidrogénio ou outros (CANILHA et al., 2012). O mecanismo de ação de hidrólise alcalina é de saponificação de ligações éster intermoleculares ligadas com a xilana das hemiceluloses e outros componentes, como por exemplo, lignina e outra estrutura das hemiceluloses (SUN e CHEN, 2002; CANILHA et al., 2012). Este processo utiliza baixas temperaturas e pressões se comparado a outras tecnologias de pré-tratamento, no entanto, o tempo de pré-tratamento é na ordem de horas ou dias. Comparado os processos de pré-tratamento alcalino com o ácido, os processos alcalinos provocam menor degradação de açúcar, e muitos dos sais cáusticos podem ser recuperados e/ou regenerados (TABIL et al., 2011; CANILHA et al., 2012)

O pré-tratamento alcalino dos materiais lignocelulósicos produz inchaço da celulose, levando a um aumento da área de superfície interna, diminuindo o grau de polimerização e cristalinidade, separando as ligações estruturais entre a lignina e

carboidratos, quebrando a estrutura da lignina (SUN e CHEN, 2002; TABIL et al., 2011), e fazendo com que a celulose e as hemiceluloses estejam disponíveis para a hidrólise enzimática (BANERJEE et al., 2010; CANILHA et al., 2012).

A eficácia do pré-tratamento alcalino varia, dependendo do substrato e das condições de pré- tratamento. Em geral, o pré-tratamento alcalino é mais efetivo em madeira dura, culturas herbáceas e resíduos agrícolas com baixo conteúdo de lignina do que em madeira mole que contém um alto teor de lignina (BANERJEE et al., 2010; CANILHA et al., 2012). Por este processo, a palha da cana-de-açúcar e o BCA podem ser fracionados em lignina solúvel em álcali, hemiceluloses e resíduo pré-tratado, o que torna fácil de utilizá-los para produzir produto de alto valor agregado. O resíduo final (principalmente celulose) pode ser utilizado para produzir papel ou derivados de celulose, podendo ser também utilizado para geração de açúcares mediante hidrólise enzimática (CARDONA et al., 2010), e estes açúcares obtidos podem ser eventualmente utilizados para a produção de etanol. Os custos de reator são mais baixos do que os de tecnologias do pré-tratamento com ácido. No entanto, o uso destes sais tem o custo mais alto em concentrações elevadas, porque as águas residuais são difíceis de serem tratadas para serem reutilizadas posteriormente, sendo assim desvantajoso, visto que traz preocupações ambientais (CANILHA et al., 2012).

Agentes oxidantes:

Peróxido alcalino (deslignificação oxidativa)

O peróxido alcalino é um método de pré-tratamento que combina pré-tratamento oxidativo e alcalino que provoca a solubilização das hemiceluloses, a deslignificação (SUN et al., 2004a; BRIENZO et al., 2009; LACHKE et al 2009) e o inchaço químico da celulose para melhorar significativamente a sacarificação enzimática (SUN e CHEN, 2002; CANILHA et al., 2012). Durante o pré-tratamento oxidativo pode ocorrer várias reações como a substituição eletrofílica, deslocamento das cadeias laterais, clivagem de ligações éter, alquil, aril ou a clivagem oxidativa dos núcleos aromáticos (BANERJEE et al., 2010). Em geral, o ânion hidroperóxido (HOO^-) forma-se quando o peróxido de hidrogênio reage em meio alcalino, no sistema de branqueamento. Em contraste, o peróxido de hidrogênio é instável em

condições alcalinas e decompõe-se facilmente em radicais hidroxilas (HO^\cdot) e radicais ânions superóxido (O_2^-). Esta reação ocorre mediante a presença de certos metais de transição, tais como manganês, ferro e cobre, os quais são radicais que causam a oxidação da estrutura da lignina, permitindo a introdução de grupos hidrofílicos (carboxila), a clivagem de algumas uniões em interunidades e, eventualmente, a dissolução da lignina e das hemiceluloses (SUN et al. 2004a). A deslignificação oxidativa tem sido realizada com sucesso em uma operação de fluxo contínuo com alta carga de biomassa (cerca de 40% de sólidos) e baixa quantidade H_2O_2 , embora este método ainda é relativamente menos explorado em comparação com outros pré-tratamentos termoquímicos (CANILHA et al., 2012). A deslignificação oxidativa apresenta a vantagem de um baixo consumo de energia, ou seja, sem a alta capitalização do processo. O custo dos agentes oxidantes é significativo, e o processo pode levar de horas a alguns dias para ser concluído (BANERJEE et al., 2010). Apesar da desvantagem em relação ao tempo de realização do processo e custo dos agentes oxidantes, tem-se a vantagem de que a reutilização do solvente é possível (LACHKE et al 2009). Este método de pré-tratamento é fácil de manusear, facilmente disponível, e é ambientalmente amigável (SUN et al., 2004a), e tem sido aplicado a uma grande variedade de biomassa, como palha de milho, palha de cevada, palha de trigo, bambu, palha de arroz e bagaço de cana-de-açúcar (SUN et al., 2004a; CANILHA et al., 2012).

Hipoclorito de sódio

A oxidação da celulose com hipoclorito de sódio foi extensivamente estudado devido a necessidade de prevenir o branqueamento dos têxteis de algodão, onde o grau de oxidação e a natureza dos produtos dependem do pH da solução. O grau de oxidação até um pH próximo a 7, sugere que o íon hipoclorito e ácido hipocloroso não dissociados participam da reação (WERTZ et al., 2010). Uma combinação de reagentes que geram espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), superóxido (O_2^-), radicais hidroxila (OH^\cdot), ou íon hipoclorito (OCl^-), podem remover hemiceluloses e lignina da lignocelulose. Uma solução contendo ROS pode ser obtida com hipoclorito de sódio e peróxido de hidrogênio, sendo utilizados para oxidar bagaço de cana-de-açúcar (LEE et al., 2009). Quando o hipoclorito de sódio e peróxido de hidrogênio reagem, formam-se produtos

complexos estáveis (Ox-B) (BOARD OF SUPERVISORS OF LOUISIANA STATE UNIVERSITY AND AGRICULTURAL AND MECHANICAL COLLEGE THROUGH THE LSU AGCENTER, 2005). Oxigênio singlete, radicais superóxidos e radicais hidroxilas são produzidos na reação entre hipoclorito de sódio e peróxido de hidrogênio. Radicais superóxidos e hidroxila degradam a lignina, oxidando-a, e os carboidratos, gerando espécies reativas de oxigênio (ROS). Quando os radicais superóxidos reagem com reagentes orgânicos causam clivagem das cadeias de carbono-carbono, abertura dos anéis aromáticos e clivagem das cadeias laterais alifáticas. Diferentemente dos radicais superóxidos, os radicais hidroxila reagem rapidamente com as moléculas do substrato, que resultam em uma abertura ou a clivagem das estruturas aromáticas e alifáticas (GIERER, 2000).

Outras aplicações na deslignificação do BCA utilizando NaClO podem ser realizadas, ajustando o pH entre 3,8 e 4,0 com ácido acético, tal como foram realizadas por Sun et al. (2004b) e Liu et al. (2006) para obter holocelulose, sendo que foi possível obter celulose com utilização de bases (NaOH ou KOH).

Ácido peracético (agente oxidante)

O ácido peracético (PAA) é reconhecido como um potente agente de oxidação e é muito seletivo em relação à estrutura de lignina. O PAA oxida a lignina, clivando os anéis aromáticos e gerando ácido dicarboxílico e suas lactonas (ZHAO et al. 2007; TAN et al., 2010). A oxidação começa nas porções fenólicas com hidroxilação das posições *orto* ou *para* disponíveis, ou com o deslocamento do grupo *para* substituídos. A hidroxilação da posição *orto* conduz à formação de catecóis, os quais são os primeiros convertidos em *orto*-quinonas e, em seguida, submetidos à clivagem do anel para formar ácidos mucônico. O deslocamento *para* gera hidroquinonas, que são rapidamente oxidados a *para*-quinonas, seguido pela formação de ácidos maleico e fumárico (TAN et al., 2010).

Este pré-tratamento causa significativa redução na cristalinidade devido ao inchaço estrutural e à dissolução da celulose cristalina. Além disso, diminui o conteúdo de hemicelulose (LACHKE et al., 2009). Este processo é considerado ambientalmente amigável e muito eficaz na deslignificação (TAN et al., 2010).

C. Pré-tratamento Físico-Químico

Diversos pré-tratamentos físico-químico estão descritos na literatura como segue:

Pré-tratamento com bases e ácidos assistido com micro-ondas

O pré-tratamento com micro-ondas (aquecimento dielétrico) é considerado um processo alternativo para o pré-tratamento com aquecimento convencional (condução e convecção) e tem sido amplamente utilizado em muitas áreas (BINOD et al., 2012). Se comparado com o método de aquecimento convencional, o pré-tratamento com micro-ondas usa a interação direta entre um objeto aquecido e uma radiação eletromagnética aplicada, gerando alta eficiência no aquecimento e facilidade na operação (CANILHA et al., 2012; VANI et al., 2012). A principal vantagem deste processo são os tempos curtos de reação e um aquecimento homogêneo da mistura da reação, bem como a capacidade de se iniciar e parar o processo instantaneamente (BINOD et al., 2012; CANILHA et al., 2012; VANI et al., 2012). O pré-tratamento assistido com micro-ondas do BCA e da palha do bagaço de cana-de-açúcar pode ser um processo útil para poupar tempo e energia com uma mínima geração de inibidores da fermentação (CANILHA et al., 2012).

O pré-tratamento com micro-ondas pode ser considerado como um dos métodos de pré-tratamento mais promissores para alterar a estrutura nativa de celulose, com a degradação da lignina e hemicelulose, aumentando assim a susceptibilidade enzimática (BINOD et al., 2012; CANILHA et al., 2012). Este pré-tratamento pode ser combinado com os reagentes químicos que melhoram o rendimento de açúcar a partir do substrato (CANILHA et al., 2012), e aceleram a velocidade de reação química. Diversas pesquisas têm chegado à conclusão de que o pré-tratamento com micro-ondas, na presença de água, pode melhorar a hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos (TABIL et al., 2011). O pré-tratamento com micro-ondas é geralmente realizado a elevada temperatura (> 130°C) e, em essência, este é uma auto-hidrólise catalisada com ácido em materiais lignocelulósicos, porque aumenta a acidez com o aumento da temperatura durante o pré-tratamento com micro-ondas, de modo que a elevação da temperatura é essencial (CHEN et al., 2011; BINOD et al., 2012).

Para incrementar a eficiência no pré-tratamento com micro-ondas alguns pesquisadores realizaram trabalhos com ácido, álcali ou ácido seguido de álcali assistido com micro-ondas. Este procedimento pode ser uma alternativa para o pré-tratamento das biomassas lignocelulósicas (TABIL et al., 2011; BINOD et al., 2012, VANI et al., 2012), como sabugo do milho, casca de mandioca e amendoim (SUN e CHENG, 2002), palha de trigo (ZHU et al., 2006), painço amarelo (KESHWANI et al., 2007), bagaço de cana-de-açúcar (CHEN et al., 2011; BINOD et al., 2012), palha de cevada, palha de arroz, casca de arroz e madeira (TABIL et al., 2011).

A dificuldade para realizar-se a extração química usando micro-ondas está em conseguir um bom rendimento sem extensa degradação das hemiceluloses e contaminação com lignina e celulose. Em comparação com métodos alternativos, a extração com reagentes químicos, assistida por micro-ondas, pode ser uma nova forma de pré-tratamento eco-amigável para o isolamento das hemiceluloses (PENG et al., 2012).

Pré-tratamento com explosão a vapor

A explosão a vapor é um dos métodos de pré-tratamento mais comuns. Este método pode ser descrito como um processo termoquímico, onde o material lignocelulósico é submetido ao vapor. Este pré-tratamento com pouca adição de reagentes químicos ou na maioria dos casos sem nenhum reagente químico, por isso pode ser considerado como uma tecnologia ambientalmente amigável (CANILHA et al., 2012; PENG et al., 2012). Neste processo, a biomassa lignocelulósica é submetida a vapor e mantida a altas temperaturas e pressões (força mecânica) num reator, de forma que a sua estrutura deve vir a quebrar-se. Assim, a lignina é facilmente despolimerizada e/ou redistribuída (ALVIRA et al., 2010; PENG et al., 2012), e conseqüentemente, hidrolisa os grupos acetil das hemiceluloses, formando ácido acético, causando a auto-hidrólise das hemiceluloses. É importante ressaltar que a água do pré-tratamento por explosão a vapor pode atuar como ácido a altas temperaturas e o processo finaliza com uma rápida descompressão (ALVIRA et al., 2010; BANERJEE et al., 2010; CANILHA et al., 2012). A tecnologia de explosão a vapor tem sido efetuada para a produção de etanol em uma ampla gama de matérias-primas como a madeira do álamo, resíduos de oliveiras, resíduos herbáceos como palha de milho e palha de trigo. Esse

procedimento tem apresentado sucesso em madeiras duras e resíduos agrícolas ou biomassa herbácea, mas não é muito eficaz para madeiras moles devido ao seu baixo teor de grupos acetil na porção hemicelulósica (ALVIRA et al., 2010).

O pré-tratamento a explosão a vapor levam a altos rendimentos na solubilidade das hemiceluloses (produzindo principalmente oligossacarídeos) com baixa solubilidade da lignina (CANILHA et al., 2012). O grau de modificações na composição química e estrutural dos materiais lignocelulósicos deste pré-tratamento acontece de acordo com o tempo de residência, a temperatura, o tamanho da partícula e o teor de unidade da biomassa (SUN e CHEN, 2002; TABIL et al., 2011). Geralmente, as temperaturas de operação estão entre 160 e 240°C e a pressão empregada é entre 0,7 e 4,8 MPa (ou 7,14 e 48,95 at) (SUN e CHEN, 2002; CANILHA et al., 2012), por vários segundos a poucos minutos (BANERJEE et al., 2010), antes de que o material seja exposto a pressão atmosférica. A adição dos catalisadores como H₂SO₄ (ou SO₂) ou CO₂ no pré-tratamento com explosão a vapor pode melhorar eficazmente a hidrólise enzimática e leva a remoção mais eficiente das hemiceluloses (SUN e CHEN, 2002).

A abordagem do processo com explosão a vapor seguido da sacarificação enzimática é promissora porque apresenta um método que propõe aumentar a quantidade de açúcares fermentescíveis provenientes da hidrólise (CANILHA et al., 2012). No entanto, dependendo das condições do pré-tratamento, a explosão a vapor tem como desvantagens o alto consumo de energia e a geração de inibidores da fermentação (furanos, ácidos fracos e compostos fenólicos) (BANERJEE et al., 2010; ALVIRA et al., 2010).

2.3.4. Fluxograma de pré- tratamentos descritos pela literatura

A. Pré-tratamento alcalino a temperatura ambiente

O pré-tratamento apresentado no fluxograma da Figura 7 foi aplicado palha de arroz, casca e palha de milho, e uma graminea tailandesa como descrito por Deejing e Ketkorn (2009), e tem como objetivo otimizar a obtenção de uma biomassa pré-tratada parcialmente deslignificada com NaOH 8% (m/v) por um tempo de 24 h, a temperatura ambiente. Após este pré-tratamento, hidrolisa-se a biomassa pré-tratada com ácido sulfúrico diluído com três temperaturas (100°C, 111°C e 121°C) e tempos

de 15 e 30 minutos, obtendo assim a liberação dos açúcares redutores a serem determinados pelo método de Somogyi.

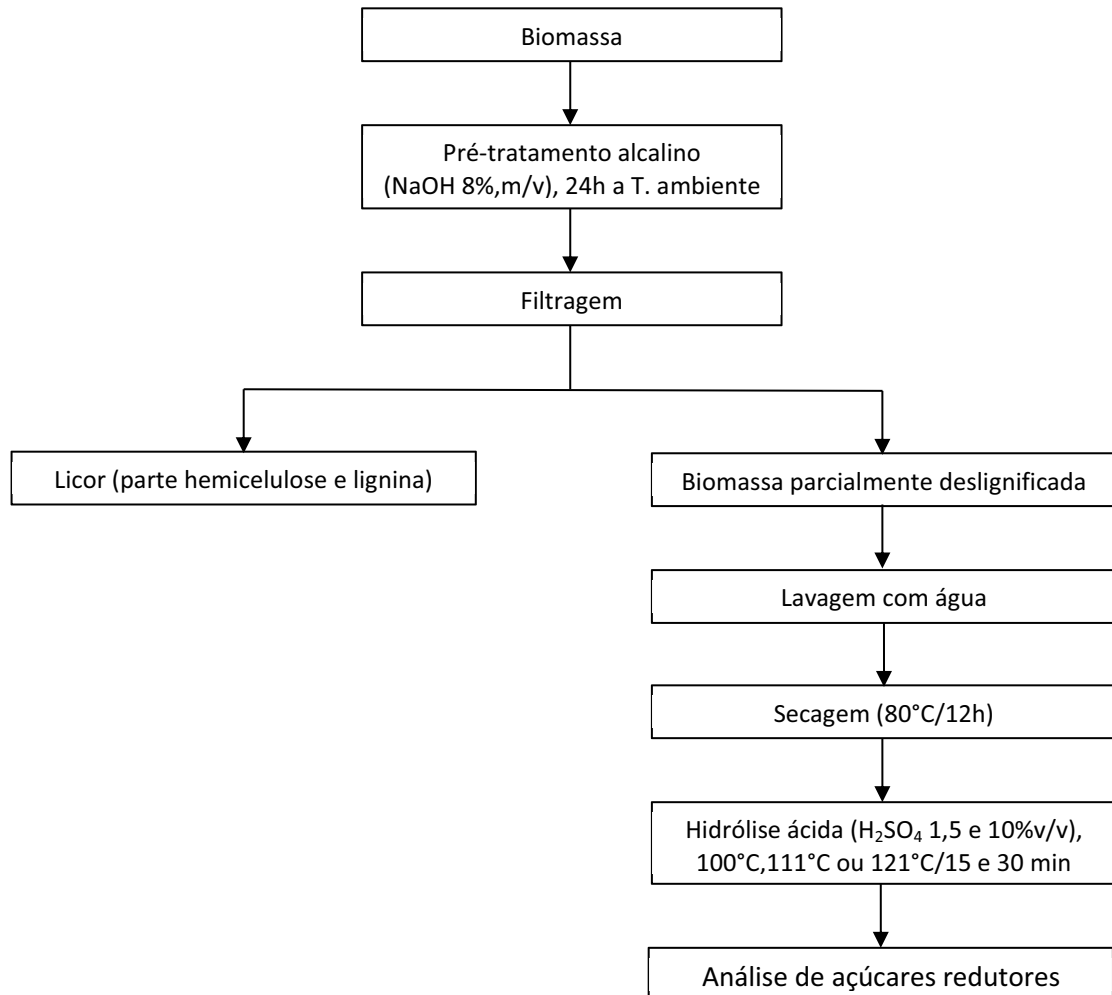


Figura 7. Fluxograma do pré-tratamento alcalino a temperatura ambiente (elaboração própria, baseada em Deejing e Ketkorn, 2009).

B. Pré-tratamento com ácido peracético

Segundo Tan et al. (2010), deve-se utilizar uma solução de peróxido de hidrogênio 30% e de ácido acético glacial (1 de H_2O_2 :1 de CH_3COOH) para deslignificar a matéria-prima. Para que seja possível catalizar esta reação de deslignificação a tempo menores, utiliza-se H_2SO_4 em pequenas quantidades 0,5% (m/m). O pré-tratamento foi feito numa proporção 1:8 (sólido-líquido), a 80°C em um intervalo de tempo de 0,2 até 3h. A lignina foi medida com a metodologia TAPPI T222, e as hemiceluloses e celulose foram calculadas a partir dos açúcares da parte

líquida (hidrolisado) da determinação de lignina, usando um cromatógrafo com um sistema Dionex LC20 equipado com um detector eletroquímico ED40. Os produtos de degradação da lignina foram determinados no hidrolisado pré-tratado por cromatografia gasosa acoplada a um espectrofotômetro de massas. Estas etapas estão representadas na figura 8.

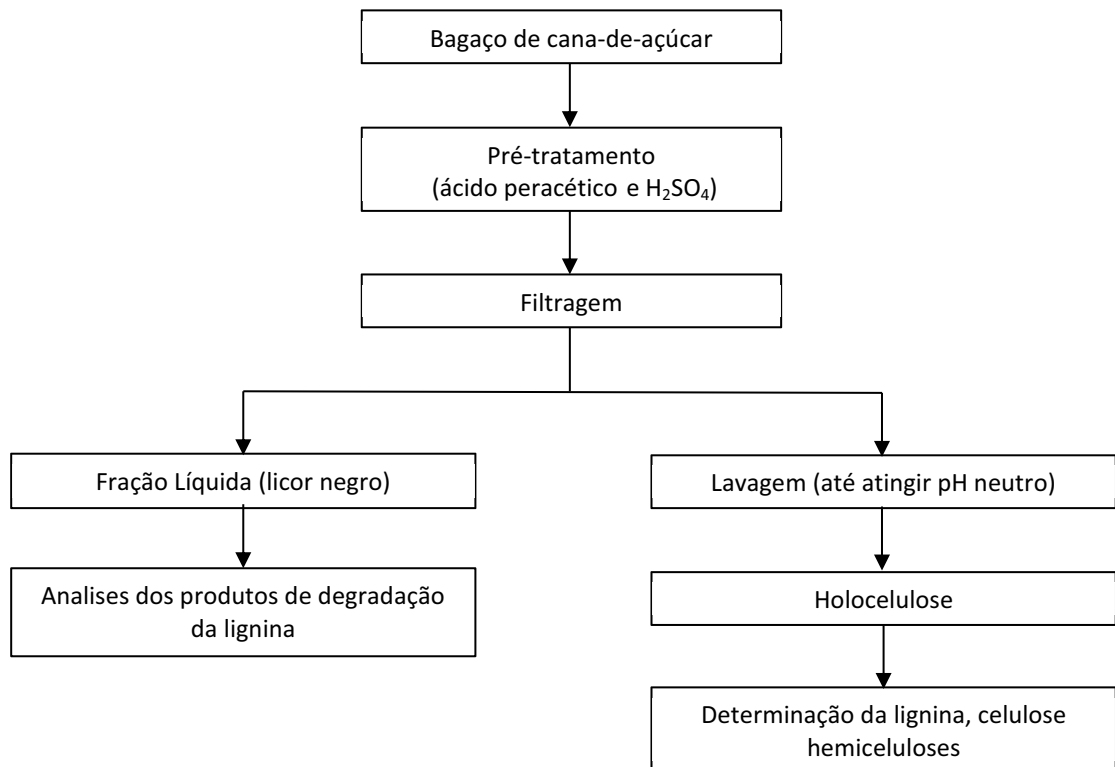


Figura 8. Fluxograma do pré-tratamento com ácido peracético (elaboração própria, baseada em Tan et al., 2010).

C. Pré-tratamento com H₂O₂ alcalino

Segundo Brienzo et al. (2009), antes do pré-tratamento com H₂O₂ alcalino deve-se retirar os cátions dos metais do BCA, livre extrativos, com 0,2% (m/v) de EDTA a 90°C, por 1 h, com a finalidade de evitar a decomposição rápida do peróxido de hidrogênio. O pré-tratamento com peróxido de hidrogênio (2-6% m/v) alcalino (pH 11,6) deslignifica e solubiliza as hemiceluloses da biomassa, sendo que para isso é necessário adicionar MgSO₄ (0-0,5%, m/m), com a finalidade de proteger as hemiceluloses de uma degradação, durante a deslignificação oxidativa, e estabilizar a reação durante o pré-tratamento, como se pode observa na figura 9.

Este pesquisador aponta nos resultados de experimentos por ele realizados, que foi possível remover até 94.5% da hemicelulose e até 88% da lignina presentes no bagaço de cana-de-açúcar.

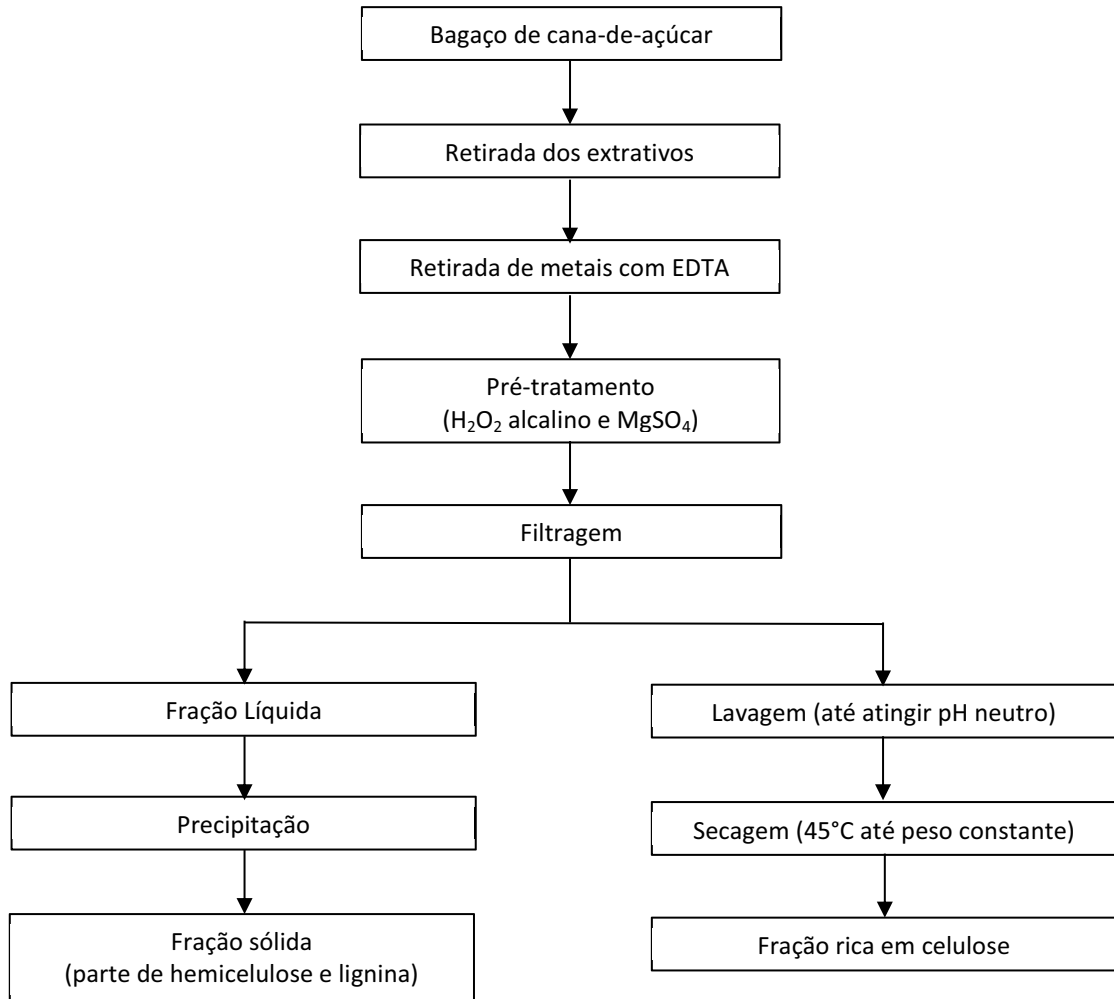


Figura 9. Fluxograma do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino (elaboração própria, baseada em Brienzo et al., 2009).

D. Pré-tratamento alcalino seguido de peróxido de hidrogênio

Segundo Teixeira et al. (2011), para se obter nanofibras de celulose (100 - 200 nm), a partir do bagaço de cana-de-açúcar, em primeiro lugar deve-se sonificar o BCA, sem extrativos, seguido de uma deslignificação da biomassa com NaOH 5%(m/v) a 55°C, e de um branqueamento com H₂O₂ 11%(v/v) por várias vezes. Terminado o pré-tratamento, esta fração rica em celulose deve ser submetida a uma hidrólise

ácida, seguida de neutralização e ultrasonificação. Por último se caracteriza a nanowhisker com MEV, DRX e TG. Estas etapas estão descritas na figura 10.

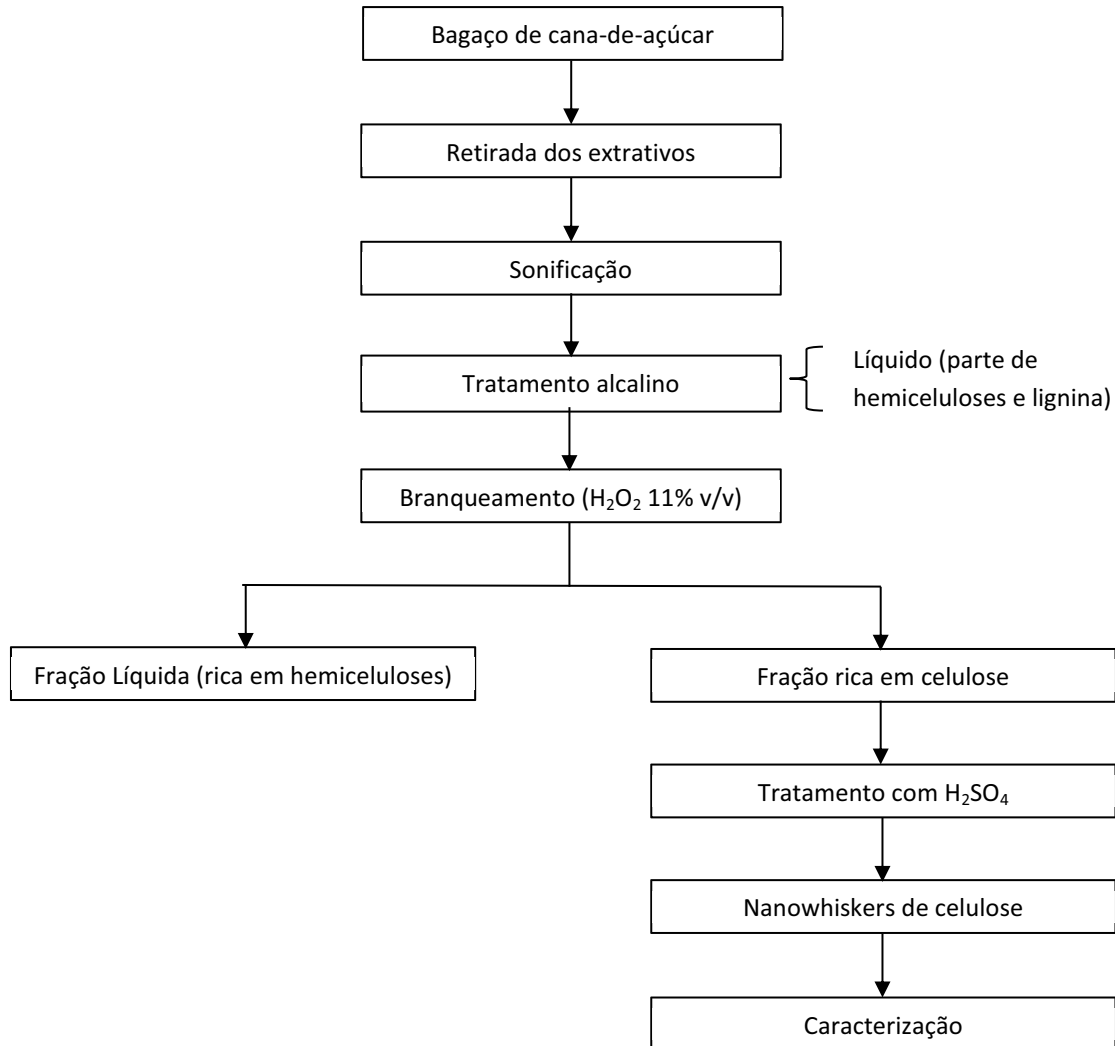


Figura 10. Fluxograma do pré-tratamento alcalino seguido de peróxido de hidrogênio (elaboração própria, baseada em Teixeira et al. 2011, Sun et al 2004b).

E. Pré-tratamento utilizando hipoclorito de sódio

Segundo Liu et al. (2006), para obter celulose a partir do bagaço de cana-de-açúcar, é necessário, primeiramente deslignificar com NaClO. A holocelulose obtida com NaClO é submetida a ultrassom e, logo em seguida, separa-se as hemiceluloses da holocelulose por tratamento alcalino (NaOH e /ou KOH) a diversas concentrações e temperatura ambiente de 23°C. Por último, a fração rica em celulose é filtrada e lavada com água até ser neutralizada, para se obter a celulose. A partir das celulosas obtidas,

é determinado o seu rendimento, caracterização química e XRD, GP, FTIR, TG e DTA. Estas etapas estão descritas na figura 11.

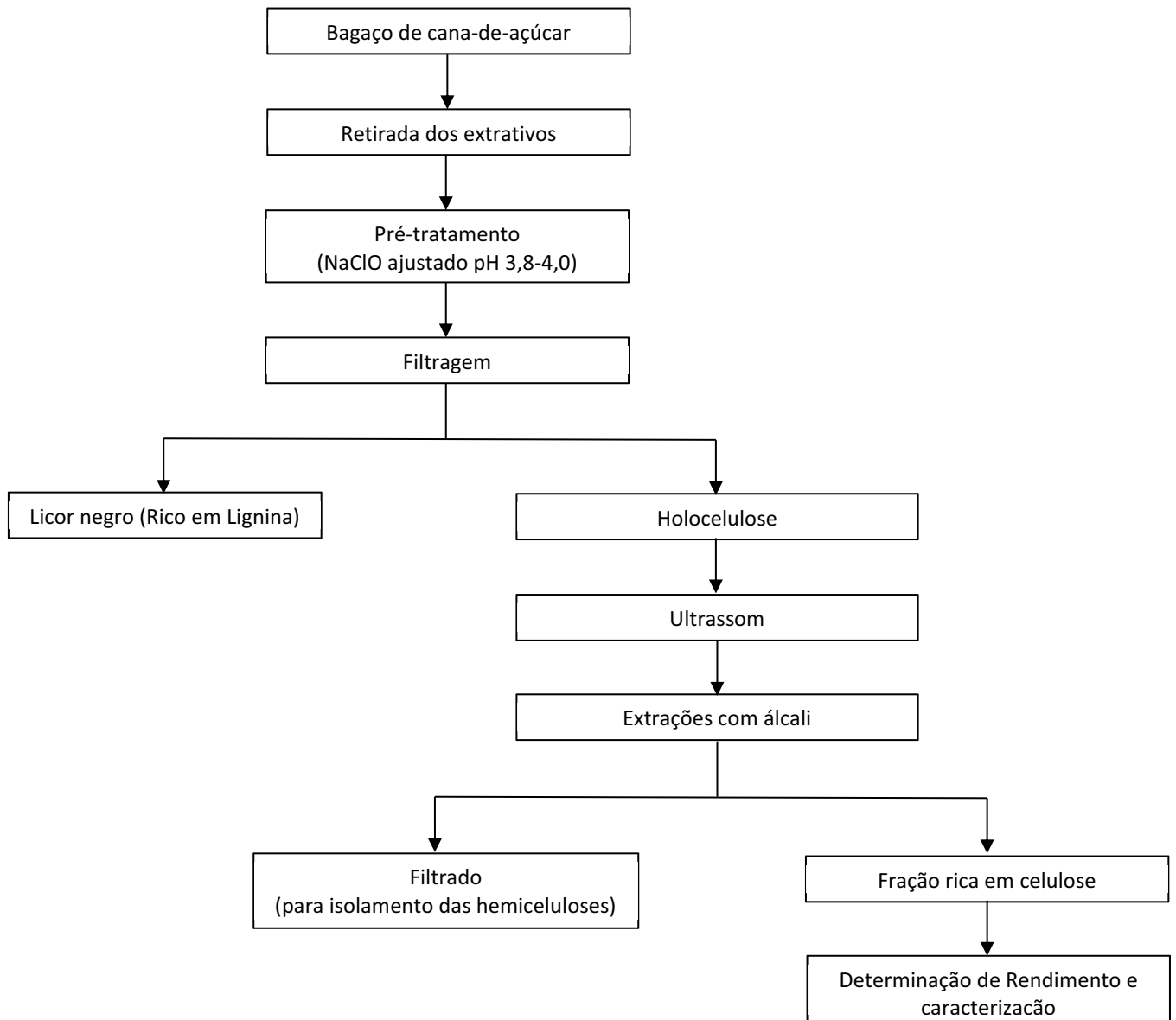


Figura 11. Fluxograma do pré-tratamento com hipoclorito de sódio, adaptado de Liu et al. (2006).

F. Pré-tratamento alcalino do BCA pré-tratado com explosão a vapor

Segundo Santos e Gouveia (2009), utiliza-se o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com explosão a vapor, onde a deslignificação consiste na utilização de NaOH 1% (m/v) a 100°C por 1 hora a 100 rpm. Após esta etapa, a solução é filtrada

para separar a fração líquida conhecida como licor negro, na fração rica em celulose, que é lavado várias vezes até atingir um pH neutro. Terminado o pré-tratamento, esta fração rica em celulose é hidrolisada com enzimas e, posteriormente, determina-se a glicose, xilose, ácido acético, hidroximetilfurfural e furfural, através do uso do HPLC. Já os fenóis totais, são determinados com o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu. Estas etapas estão descritas na figura 12.

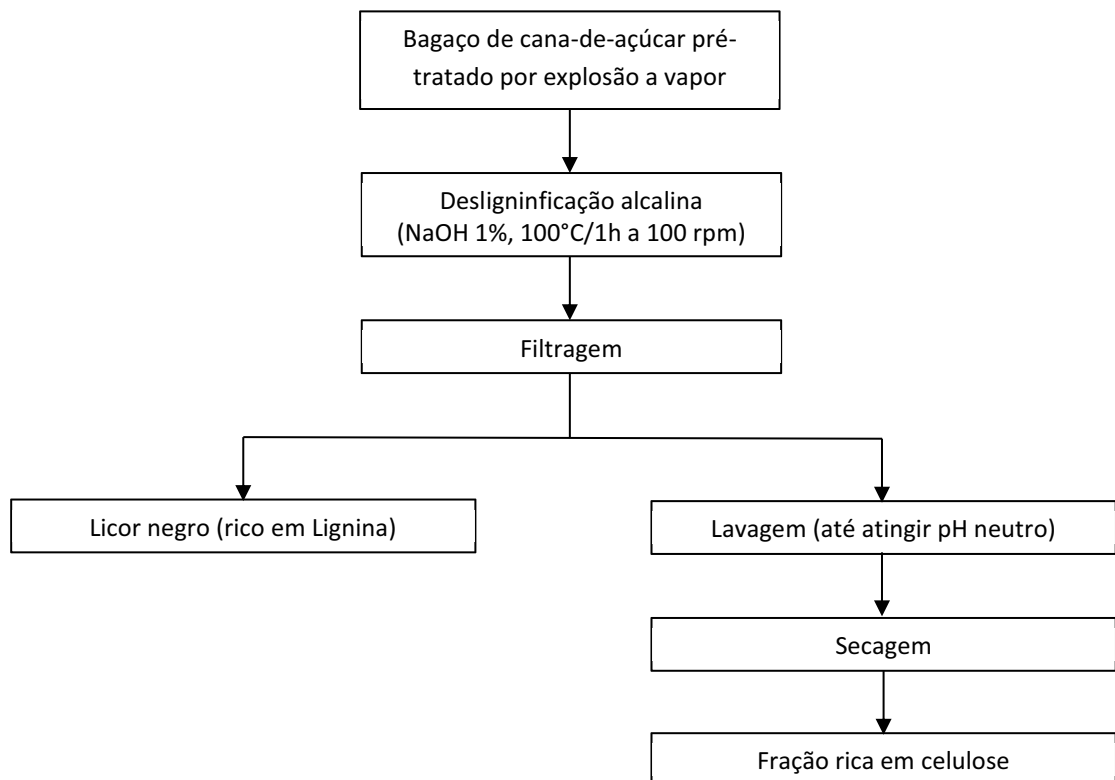


Figura 12. Fluxograma do pré-tratamento alcalino do BCA pré-tratado com explosão a vapor (elaboração própria, baseada em Santos e Gouveia, 2009).

G. Pré-tratamento do BCA com álcali assistido com micro-ondas, seguido de ácido assistido com micro-ondas

Segundo Binod, et al. (2012), uma deslignificação do bagaço da cana-de açúcar pode ser realizada com NaOH 1% (m/v), assistido com micro-ondas com diferentes potências (100w – 850w) em tempos curtos (0 - 15 min), seguida de um pré-tratamento ácido assistido com micro-ondas. Terminado o pré-tratamento, o BCA e as biomassas pré-tratadas são caracterizadas da seguinte maneira: caracterização química, que compreende a celulose, hemicelulose, lignina, cinza e extrativos

mediante a metodologia NREL; e outras caracterizações, como análises de DRX, MEV, FTIR. Estas etapas estão descritas na figura 13.

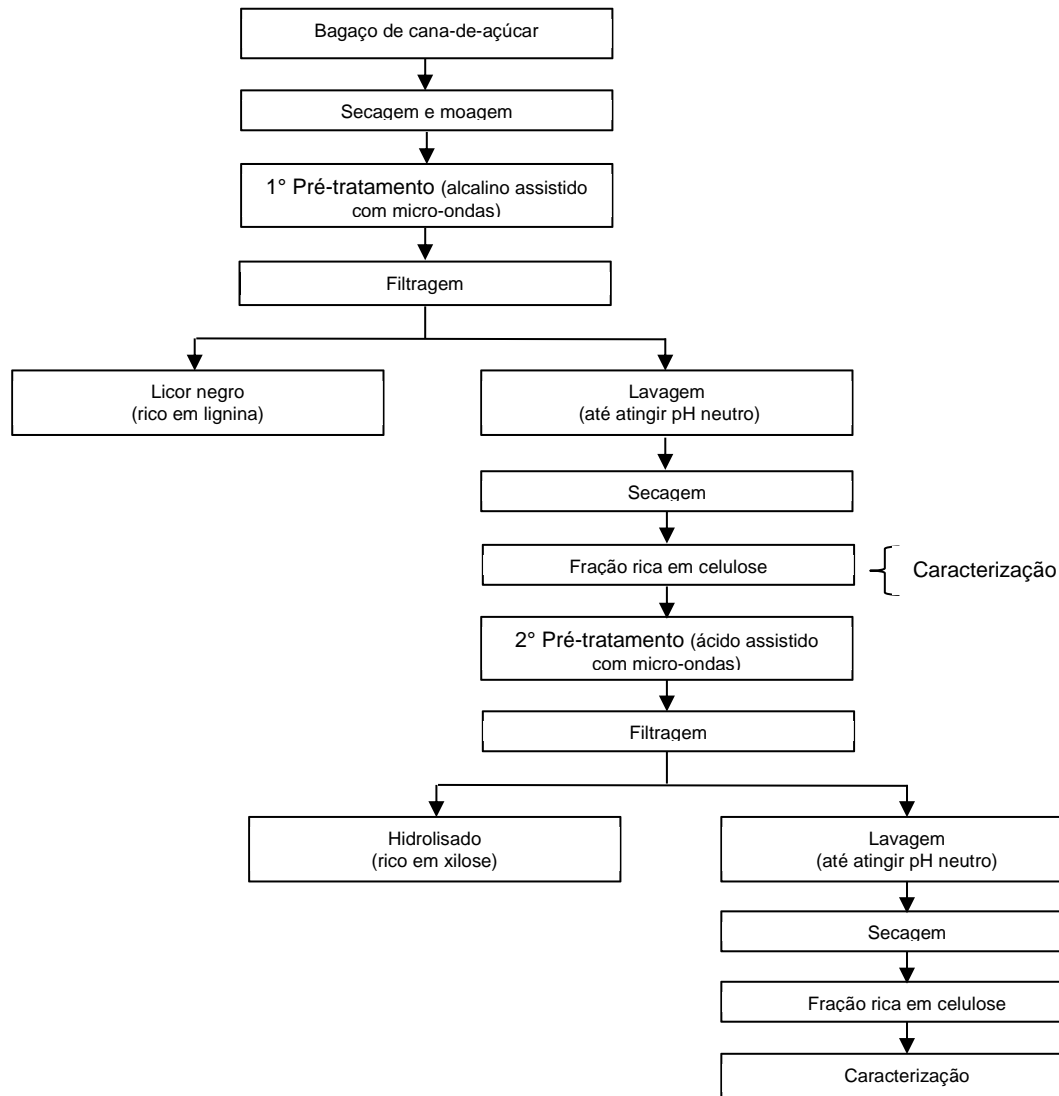


Figura 13. Fluxograma do pré-tratamento do BCA com álcali assistido por micro-ondas, seguido de ácido assistido por micro-ondas (elaboração própria, baseada em Binod et al., 2012).

2.4. Caracterização morfológica e física do BCA e dos BCA pré-tratados

A. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Um microscópio eletrônico de varredura utiliza um feixe de elétrons no lugar de fótons utilizados em um microscópio óptico convencional, o que permite solucionar o problema de resolução relacionado com a fonte de luz branca. O microscópio

eletrônico de varredura é um dos mais versáteis instrumentos disponíveis para a observação e análise de características microestruturais de objetos sólidos. A principal razão de sua utilidade é a alta resolução que pode ser obtida quando as amostras são observadas; valores da ordem de 2 a 5 nm são geralmente apresentados por instrumentos comerciais, enquanto instrumentos de pesquisa avançada são capazes de alcançar uma resolução em torno de 1 nm. Outra característica importante do MEV é a aparência tridimensional da imagem das amostras, resultado direto da grande profundidade de campo. Permite, também, o exame em pequenos aumentos e com grande profundidade de foco, o que extremamente útil, pois a imagem eletrônica complementa a informação dada pela imagem óptica (DEDAVID et al., 2007).

O aspecto mais atrativo do MEV é a facilidade de preparação de amostra. Materiais não condutores, como a maioria dos polímeros, requerem em geral apenas revestimentos condutivos ou uso de baixa voltagem de aceleração de feixe. A montagem da amostra é feita sobre suporte metálico, utilizando adesivos condutivos, tais como fitas de carbono ou suspensões coloidais de prata ou carbono. O revestimento da amostra por um filme condutor tem como objetivo evitar o acúmulo de carga negativa, no caso da mesma ser formada por um material não condutor. A camada de metal deve ser suficientemente contínua e fina (menor que 20 nm) para não mascarar a topografia da superfície, porém deve ser adequada para conduzir o excesso de carga negativa. A evaporação de metal e a metalização por *sputting* são as técnicas mais comuns para esta finalidade. Os metais mais utilizados são ouro, liga ouro-paládio, platina, alumínio e carbono (CANEVAROLO, 2004).

O microscópio eletrônico de varredura é um aparelho que pode rapidamente fornecer informações sobre a morfologia e identificação de elementos químicos de uma amostra sólida. Sua utilização é comum em biologia, odontologia, farmácia, engenharia, química, metalurgia, física, medicina e geologia (DEDAVID et al., 2007).

B. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

Os métodos analíticos espectroscópicos se baseiam na interpretação da energia radiante com a matéria, medindo a quantidade de radiação produzida ou absorvida por espécies atômicas ou moleculares. Os métodos espectroscópicos apresentam-se como uma ferramenta importante para a elucidação da estrutura

molecular e nas determinações qualitativas e quantitativas de compostos orgânicos e inorgânicos. Dentre eles, destaca-se a espectroscopia na região do infravermelho (IV) que se baseia nas transições entre dois níveis vibracionais da molécula no estado eletrônico fundamental, normalmente observada como um espectro de absorção (MARTIN et al., 2011).

A região do espectro eletromagnético correspondente ao infravermelho varia entre números de onda de $12.800 - 10 \text{ cm}^{-1}$ ou $0,78 - 1.000 \text{ }\mu\text{m}$. Essa região é dividida em três partes denominadas IV próximo ($12.800 - 4.000 \text{ cm}^{-1}$), IV médio ($4.000 - 200 \text{ cm}^{-1}$) e IV longínquo ($200 - 10 \text{ cm}^{-1}$). A região do IV médio é dividida em duas regiões principais: a região da frequência de grupo, que corresponde à parte do espectro entre $4.000 - 1.200 \text{ cm}^{-1}$, e a região denominada impressão digital ($1.200 - 600 \text{ cm}^{-1}$). A interpretação dos resultados envolve identificação do grupo funcional ao qual a amostra pertence, e a análise detalhada da região de *impressão digital*, que fornece informações características do composto analisado. As pequenas modificações na estrutura da molécula são observadas através de mudanças nas bandas nesta região (MARTIN et al., 2011).

As amostras a serem analisadas por espectroscopia de absorção no infravermelho necessitam de um suporte adequado (células para IV) e janelas ópticas. As janelas ópticas de KBr são adequadas para soluções não aquosas e, devido a sua elevada solubilidade em água ($65,2 \text{ g}/100\text{g H}_2\text{O}$), são transparentes ao IV na faixa de 4.000 e 400 cm^{-1} (MARTIN et al., 2011).

FTIR tem sido usada como uma técnica simples para a obtenção de uma informação rápida sobre a estrutura química e de cristalinidade das amostras de celulose, uma vez que trata-se de um método relativamente fácil de obtenção de informações diretas sobre mudanças químicas que ocorrem durante vários pré-tratamentos e tratamentos químicos (SUN et al., 2004b). Ao contrário da análise química convencional, este método requer amostras em pequenas quantidades e pouco tempo de análise, além de ser não destrutivo (POLETTO et al., 2013).

C. Difração de Raios X e grau de cristalinidade

Esta técnica utiliza o espalhamento coerente da radiação X, por estruturas organizadas (cristais), permitindo realizar estudos morfológicos em matérias,

determinando sua estrutura cristalina e sua fração (percentual) cristalina (CANEVAROLO, 2004).

O grau de cristalinidade de um polímero é um importante parâmetro que define suas propriedades físicas e químicas, juntamente com o seu peso molecular (massa molar) e a sua distribuição. A fração cristalina (grau de cristalinidade) em um material polimérico pode ser medida por diversos métodos, tais como medidas de densidade, calorimetria exploratória diferencial (DSC) (CANEVAROLO, 2004) e as seguintes espectroscopias: ressonância magnética nuclear (RMN), FTIR e Raman. Ainda se tem também o DRX como um dos métodos mais utilizados (PARK et al., 2010).

A utilização do DRX para determinar ICr de polímeros foi intensamente estudada durante a década de 1960, principalmente através dos trabalhos de Ruland, Farrow e Wakelin. W. Ruland foi responsável pelo desenvolvimento de toda a base de cálculo necessária para a interpretação do fenômeno de espalhamento de raios X por estruturas cristalinas e sua utilização quantitativa. Tais equações requerem que as seguintes condições sejam satisfeitas para sua perfeita utilização: 1) que as imperfeições nos cristais sejam mínimas, ou quantificadas por outras técnicas; 2) que os cristais estejam aleatoriamente distribuídos espacialmente; 3) que a organização dos cristais seja tridimensional; e, 4) que existam métodos que permitam separar os picos cristalinos do espalhamento amorfo, no difratograma do material (CANEVAROLO, 2004).

O método de Ruland e todos os aperfeiçoamentos e detalhamentos posteriores aplicam uma relação simples entre as áreas do(s) pico(s) cristalino(s) e o halo amorfo de um difratograma de raios X (CANEVAROLO, 2004). Terinte et al. (2011) determinaram o grau de cristalinidade de materiais celulósicos por cinco métodos, como segue: método de altura de picos (Segal), Ruland-Vonk, Hermans-Weidinger, Jayme-Knolle e por deconvolução (ajuste de curva). Este método de deconvolução consiste em técnicas sofisticadas usando procedimentos de deconvolução e é muitas vezes aplicado para medições de cristalinidade, com a utilização do software adequado (PeakFit, Origin ou Microsoft Excel) que separa as áreas não cristalinas e cristalinas para o espectro de difração, e ao final aplica-se um ajuste de curvas.

A finalidade da deconvolução é aumentar a resolução espectral. É usado numa faixa espectral estreita, onde há ocorrência de bandas superpostas. O processo de

deconvolução mantém a posição das bandas, mas altera as respectivas áreas e o perfil de bandas (CANEVAROLO, 2004).

O ajuste de curva tem como propósito determinar a posição e a intensidade de várias bandas individuais que se superpõem, reproduzindo o perfil da banda superposta. O ajuste de curva decompõe a banda larga superposta em um conjunto de bandas individuais, considerando o número de ondas, largura, altura, posição e forma das bandas individuais. Para saber o número de bandas existentes na faixa espectral de interesse, pode-se recorrer à deconvolução ou obter o espectro da segunda derivada, na referida faixa espectral. Denomina-se espectro residual aquele espectro obtido pela diferença entre o espectro da amostra e o espectro calculado pelo ajuste de curva. Quanto menor for o espectro residual, melhor o ajuste de curva. O ajuste de curva fornece um conjunto de bandas com largura, altura, posição e forma definidas que, quando combinadas, geram um espectro que se assemelha ao espectro da amostra original (CANEVAROLO, 2004).

D. Análise Termogravimétrica

A termogravimetria (TG) é uma técnica de análise térmica na qual a variação da massa da amostra (perda ou ganho) é determinada em função da temperatura e/ou tempo, enquanto a amostra é submetida a uma programação controlada de temperatura. Esta técnica possibilita conhecer as alterações que o aquecimento pode provocar na massa das substâncias, permitindo estabelecer a faixa de temperatura em que elas adquirem composição química, fixa, definida e constante, a temperatura que começam a se decompor e acompanham o andamento de reações de desidratação, oxidação, combustão, decomposição, etc.

Existem três modos de TG que são utilizados em análises térmicas: TG isotérmica, TG quase-isotérmica e TG dinâmica ou convencional. Esta última permite que a amostra seja aquecida ou esfriada num ambiente cuja temperatura varia de maneira pré-determinada, preferencialmente, à razão de aquecimento ou resfriamento linear (CANEVAROLO, 2004).

Os experimentos empregados na TG para avaliar as variações da massa de um dado material em função da temperatura são executados mediante uma termobalança (associação forno-balança), que deve permitir o trabalho sob as mais

variadas condições experimentais (diferentes atmosferas gasosas e massa de amostra, variadas razões de aquecimento e/ou condições isotérmicas em temperaturas específicas, etc). As curvas geradas fornecem informações quanto à estabilidade térmica da amostra, à composição e à estabilidade dos compostos intermediários e do produto final. Obviamente que, durante os processos térmicos, a amostra deve liberar um produto volátil devido a processos físicos ou químicos, tais como desidratação, vaporização, dessorção, oxidação, redução, etc; ou deve interagir com o gás da atmosfera atuante no interior do forno, resultando em processos que envolvem ganho de massa, tais como absorção, oxidação de ligas ou metais e óleos, etc. As variações de massa podem ser determinadas quantitativamente, enquanto outras informações obtidas a partir de uma curva TG são de natureza empírica, visto que as temperaturas dos eventos térmicos são dependentes de parâmetros relacionados às características da amostra e/ou fatores instrumentais (CANEVAROLO, 2004).

A Termogravimetria é uma das técnicas mais amplamente utilizadas para monitorar a conformação de polímeros e sua dependência estrutural na degradação térmica de fibras naturais da celulose. Isto porque os diferentes polímeros e estruturas supramoleculares da celulose se comportam de formas diferentes quando submetidos à degradação térmica (LIU et al., 2006).

E. Viscosidade e massa molecular

A partir da viscosidade pode calcular-se a massa molecular, de modo que, quanto maior é a massa molecular, maior é a sua viscosidade. Portanto, as massas moleculares das celulosas são determinadas a partir da viscosidade intrínseca (SUN et al., 2004b). A viscosidade intrínseca é uma medida do volume hidrodinâmico ocupado por uma molécula. A diminuição da viscosidade intrínseca significa uma diminuição do volume hidrodinâmico da cadeia macromolecular. Em outras palavras, a viscosidade intrínseca é uma característica das macromoléculas que está relacionado diretamente à sua capacidade de modificar o fluxo, e, indiretamente, o tamanho e forma deles. Com base em um amplo estudo acerca do cálculo das massas moleculares da celulose determinadas pela viscosidade intrínseca, Evans e Wallis (1989) mostraram que o grau de polimerização (GP) de uma amostra de celulose depende da sua viscosidade intrínseca (η) em solução de hidróxido de

cuproetilenodiamina (cuene), que pode ser calculada usando a equação de $P^{0,90} = 1,65[n]$ (SUN et al., 2004b).

2.5. Hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar (BCA) e dos BCA pré-tratados

A Química proporciona um meio alternativo para a hidrólise da biomassa. Já em 1819, Braconnot demonstrou que o tecido de linho dissolvido em H_2SO_4 concentrado, diluído com água, e aquecido foi transformado em açúcar fermentescível. O ácido concentrado desempenha uma dupla função na hidrólise da biomassa. Quando quebra sua rede de ligações de hidrogênio intra e inter-cadeia, os ácidos fortes descristalizam a celulose e torna-a acessível aos reagentes. Esses ácidos ainda catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas e clivam a celulose e as hemiceluloses em açúcares. Bergius tomou vantagem destes atributos do HCl no desenvolvimento de um processo comercial que operava na Alemanha entre os anos 1935-1948. Nos Estados Unidos, vários processos relacionados usando H_2SO_4 foram desenvolvidos, tipicamente com 80 - 90 % de conversão da celulose e as hemiceluloses em açúcares (BINDER e RAINES, 2010).

A Figura 14 mostra o mecanismo de hidrólise ácida da celulose. O primeiro passo para a realização da hidrólise ácida é a protonação do oxigênio glicosídico (Figura 14a) com posterior quebra da ligação $C_1 - O$. O carbocátion gerado na etapa b é estabilizado pelo deslocamento do par de elétrons existente sobre o oxigênio do anel glicosídico, adjacente a C_1 . O ataque nucleofílico da água sobre C_1 (Figura 14c) com regeneração do ácido (Figura 14d e 14e) encerra a etapa de despolimerização (se esta ocorrer no interior da cadeia da celulose, gerando novos terminais) ou de produção de glicose (quando ocorre hidrólise diretamente nos terminais) (OGEDA e PETRI, 2010). Além disso, a hidrólise ácida libera muitos inibidores da fermentação (produtos tóxicos na fase de fermentação, derivados da lignina e degradação dos açúcares, tais como, fenóis, furanos, ácido fórmico, ácido levulínico e ácido acético (JÖNSSON et al., 2013), conforme está demonstrado na Figura 15. Devido a acidez do hidrolisado é necessário a neutralização que além de reduzir a corrosão dos equipamentos evita uma exposição prolongada dos produtos de hidrólise a decomposição ácida, além disso o pH deve ser ajustado as condições enzimáticas. Por isso, necessita de detoxificação do material para que sejam eliminados os inibidores da fermentação, e neutralizada a acidez (já que a acidez poderia causar

uma ação corrosiva nos equipamentos utilizados) (YANG e WYMAN, 2008), além de ajudar os microrganismos a fermentar em condições adequadas.

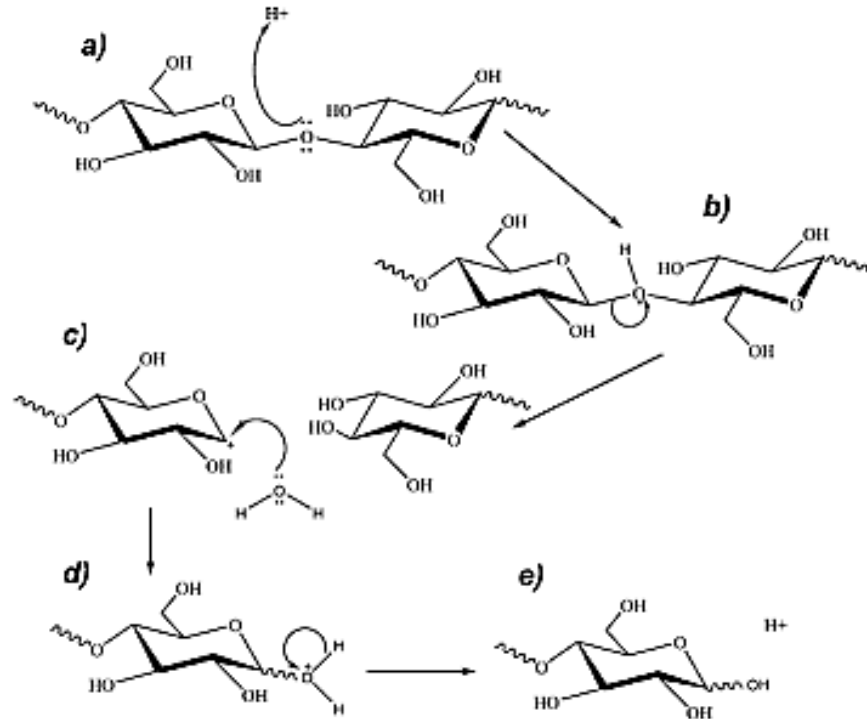


Figura 14. Mecanismo de hidrólise da celulose catalisada por ácido (Ogeda e Petri, 2010).

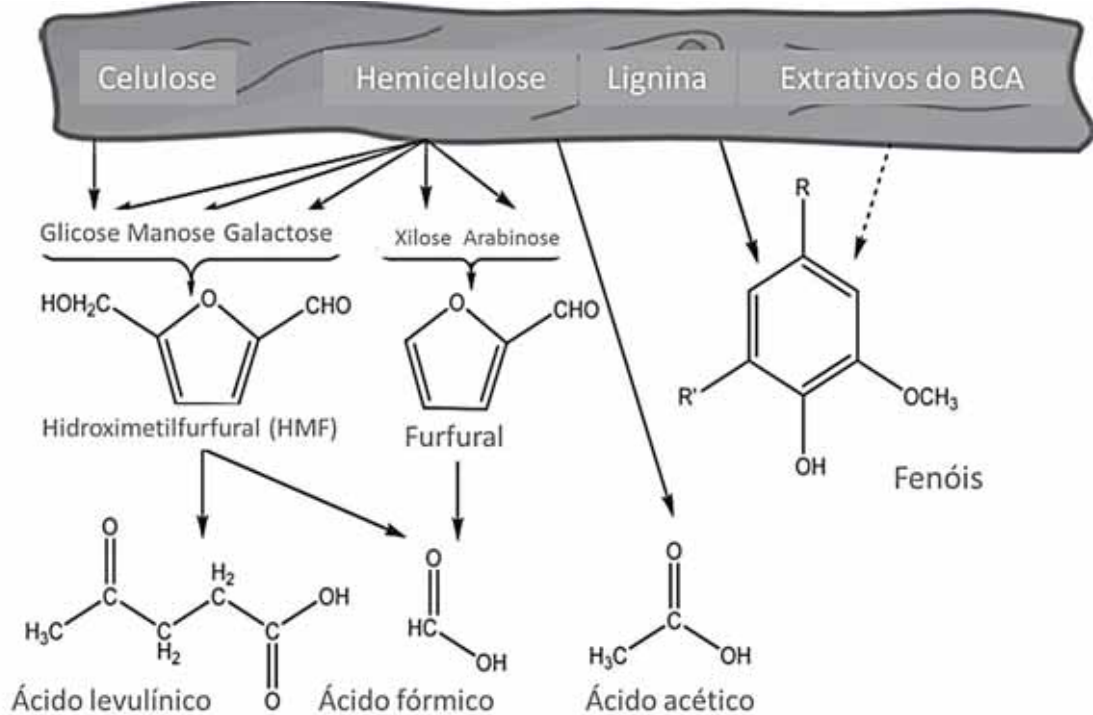


Figura 15. Formação de inibidores da fermentação (JÖNSSON et al., 2013).

Para se realizar a conversão de bagaço de cana-de-açúcar em etanol combustível, deve-se desestruturar o BCA através da realização de pré-tratamentos físicos e químicos da lignocelulose. O pré-tratamento ou hidrólise ácida é uma estratégia de baixo custo. Esta estratégia consiste na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar, para a liberação dos monômeros de açúcares dos polímeros. No caso de baixas concentrações de ácido (0,5 - 15%) (CARDONA et al., 2010; THALAGALA et al., 2009a), a biomassa pode ser tratada com altas pressões (10 - 15 atm) e em temperaturas altas (100 - 250°C). As concentrações de ácido concentrado estão entre 30% e 70% (TAHERZADEH e KARIMI, 2007), e as temperaturas utilizadas devem ser baixas (20 - 45°C) (CAMACHO et al., 1996; THALAGALA et al., 2009a).

O procedimento para hidrolisar os oligossacarídeos de hemiceluloses, celulose da madeira e resíduos vegetais agrícolas, consiste em um processo de extração em duas etapas (THALAGALA et al., 2009b) da seguinte forma: utilização de ácido sulfúrico a 43,5% (v/v) à temperatura de 20°C por 6 h, seguida por uma segunda etapa que utiliza ácido sulfúrico a 55% (v/v) à temperatura de 20°C por 6 h. Assim, a D-glicose pode ser preparada a partir da sacarificação completa dos oligossacarídeos de celulose em temperaturas baixas e a pressão atmosférica.

Um exemplo de hidrólise com ácido diluído faz parte da patente de propriedade do Council of Scientific & Industrial Research_(2009), na qual o Bagaço de cana-de-açúcar foi hidrolizado em duas etapas. Na primeira etapa utilizou-se 1 kg de bagaço em ácido sulfúrico diluído com uma concentração 7,58% (m/m) e uma concentração de sólidos de 16,7% (m/v) a 95°C, 1000 rpm por 1,5h, obtendo maior concentração de xilose 27,5% (m/m) do que glicose 2,5% (m/m). Na segunda operação foi feita hidrólise ácida com ácido sulfúrico concentrado com uma concentração de 18,7% (m/m) em condições semelhantes às da primeira etapa, porém variando-se apenas o tempo para 1 hora. Segundo a pesquisa mencionada, obteve-se um aumento significativo de glicose (30%, m/m) em relação ao bagaço seco inicial. Esta última hidrólise confirma a tese sustentada por Ogeda e Petri (2010) de que a hidrólise ácida concentrada aumenta o rendimento de glicose. Não obstante, os perigos da manipulação de ácidos concentrados a complexidades de reciclá-los têm limitado a aprovação do presente tecnologia (BINDER e RAINES, 2010).

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho consistiu no pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar aplicando simplificações e modificações baseados em pré-tratamentos conhecidos do BCA, visando obter maior quantidade e menor solubilização das frações ricas em celulose e, assim, possibilitar futuras melhorias no processo de etanol 2G.

3.2. Objetivos Específicos

- a) Comparação das diferenças entre os rendimentos e solubilização parcial das frações ricas em celulose provenientes dos pré-tratamentos do bagaço de cana-de-açúcar (BCA);
- b) Realização de extrações ácidas diluídas e concentradas das frações ricas em celulose visando retirada de resíduos (lignina e hemicelulose), utilizando FeCl_3 como co-catalisador;
- c) Análises dos produtos de extração ácida, visando avaliar a quantidade de açúcares (ART, xilose, glicose) e formação de produtos de degradação (furanos e fenóis totais);
- d) Caracterização química do BCA e das frações ricas em celulose, mediante a aplicação da metodologia TAPPI (Technical Association of the Pulp and Paper Industry);
- e) Caracterização morfológica (microscopia eletrônica de varredura – MEV) e física (espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier – FT-IR, termogravimetria – TG, e difração por raios-x – DRX) do BCA e das frações ricas em celulose para confirmar e/ou fornecer maiores detalhes para a seleção do melhor método de pré-tratamento visando à utilização futura do etanol 2G.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Matéria-prima e Métodos de pré-tratamentos

4.1.1. Matéria-prima

As amostras de bagaço de cana-de-açúcar (~50% de umidade) utilizadas na presente pesquisa são da primeira safra de 2010, as quais foram gentilmente cedidas pelo professor Hossamo Hojo, do Instituto de Química da UNESP, as quais tinham sido obtidas junto à Usina da Pedra, localizada na Rodovia Abrão Assed, Serrana – SP. As amostras foram transportadas em baixa temperatura e estocadas em freezer a -80°C. Estas amostras do BCA *in natura* correspondem a uma mesma extração de caldo de cana realizada na usina.

4.1.2. Secagem e moagem

Antes da moagem do BCA, o mesmo foi seco em estufa a menos de 50°C até atingir peso constante (PAIVA et al., 2009) e, a seguir, foi triturado em um moinho de facas (Tecnal, modelo TE-633 do Departamento de Química Orgânica). Triturou-se inicialmente 500 g de bagaço de cana-de-açúcar por 10 minutos em duas vezes consecutivas. O bagaço de cana-de-açúcar triturado foi peneirado em malhas (n° 32, 35, e 150), ajudado com um agitador de peneiras (marca Produtest modelo T), sendo selecionados os BCA com tamanho de partículas $\leq 0,5$ mm, para aumentar a área superficial. As amostras trituradas foram armazenadas a temperatura ambiente (AGUILAR et. al. 2002; PAIVA et al., 2009; BINOD et al., 2012).

4.1.3. Lavagem do Bagaço de Cana-de-Açúcar

As lavagens do BCA peneirado foram feitas duas vezes em água a uma temperatura de 60°C, como recomendado por Schuchardt e Duarte (1986). Este procedimento foi utilizado em todos os pré-tratamentos, para eliminar os resíduos de açúcares do xarope de cana-de-açúcar provenientes da moagem na usina.

4.1.4. Procedimento para remover os extrativos do BCA

Os extrativos do BCA foram removidos com tolueno e etanol (2:1, v/v), utilizando-se um sistema de refluxo durante 6 horas. Em seguida, as amostras foram lavadas com água destilada no próprio sistema de refluxo e seco a 50°C até obter peso constante (SUN et al., 2004a; LIU et al, 2006).

4.1.5. Métodos de pré-tratamentos

Amostras secas de BCA (10g) foram removidas os extrativos para os pré-tratamentos PT1, PT2, PT3, PT5 e BCA moídos (10g) para os pré-tratamentos PT4, PT6 e PT7. Cada pré-tratamento foi realizado em triplicada, em uma proporção sólido:líquido de 1:20. A figura 16 apresenta o fluxograma sobre esta pesquisa, onde os pré-tratamentos representam um passo relevante para avaliação da digestão.

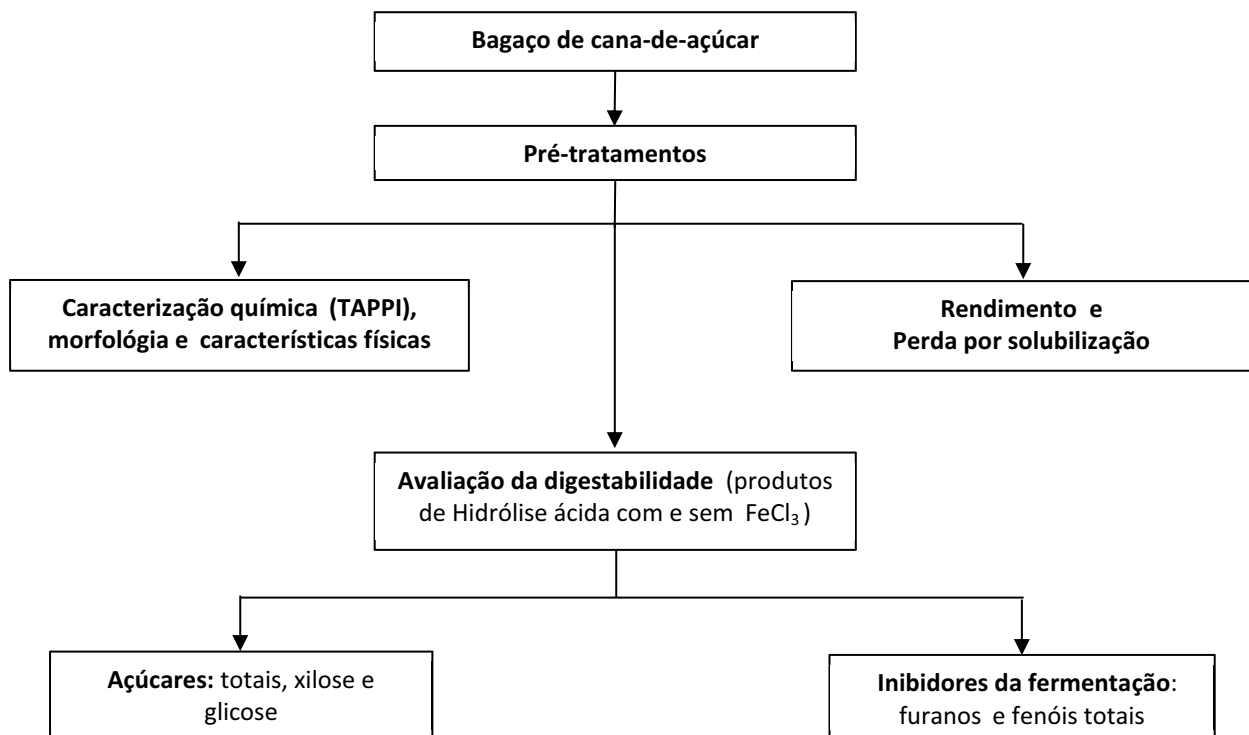


Figura 16. Fluxograma da presente pesquisa

4.1.5.1. Pré-tratamento 1 (Pré-tratamento com peróxido alcalino).

Uma amostra de BCA livre de extrativo foi tratado com 4% (m/v) de peróxido de hidrogênio e 0,25% (m/v) de sulfato de magnésio (0,25 m/m) como utilizado na polpação kraft, e pH ajustado a 11,6 com NaOH, num volume de reação de 200 mL incubado durante 10 h em banho de água (40°C), como descrito por Brienzo et al. (2009). O material resultante deste pré-tratamento denominado fração rica em celulose do PT1 ou BCA pré-tratado do PT1.

4.1.5.2. Pré-tratamento 2 (Pré-tratamento com hipoclorito de sódio)

Uma amostra de BCA livre de extrativo foi deslignificado a 75°C durante 3 h, em hipoclorito de sódio 6% (v/v) e ácido acético para ajustar o pH a 3,8 - 4,0 como descrito por Liu et al. (2006). Neste trabalho, além do ácido acético, adicionou-se 0,5% (m/m) de ácido sulfúrico atuando como catalisador segundo Tan et al (2010). Este pré-tratamento resultou da modificação utilizando duas metodologias que se complementaram. O material que resultou após este pré-tratamento foi denominado fração rica em celulose do PT2 ou BCA pré-tratado do PT2.

4.1.5.3. Pré-tratamento 3 (Pré-tratamento alcalino à temperatura ambiente)

Uma amostra de BCA livre de extrativo foi pré-tratada com NaOH 8% (m/v) durante 24 h à temperatura ambiente, tal como o descrito por Deejing e Ketkorn (2009). O material resultante após este pré-tratamento foi denominado fração rica em celulose do PT3 ou BCA pré-tratado do PT3.

4.1.5.4. Pré-tratamento 4 (Pré-tratamento alcalino a 100°C)

Uma amostra de bagaço moído foi colocada em um Kitasato junto com 1% (m/v) de NaOH e aquecida a 100 °C em uma chapa durante 1 hora. Esta metodologia foi modificada de Santos e Gouveia (2009). O material resultante após este pré-tratamento foi denominado fração rica em celulose do PT4 ou BCA pré-tratado do PT4.

4.1.5.5. Pré-tratamento 5 (Pré-tratamento com hidróxido de sódio seguido de peróxido de hidrogênio)

Uma amostra de BCA livre de extrativos foi pré-tratada com NaOH 5% (m/v) a 55°C, durante duas horas. Em seguida, os resíduos sólidos foram separados por filtração e a eles foi adicionada uma solução de 100 mL de peróxido de hidrogênio (11%, v/v). Em um frasco Kitasato, os resíduos sólidos juntamente com H₂O₂ foram incubados a 40 °C durante 2 h, com a finalidade de se obter o branqueamento do resíduo. Este processo consiste em uma adaptação baseada em Teixeira et al. (2011). O material resultante deste pré-tratamento 5 foi denominado fração rica em celulose do PT5 ou BCA pré-tratado do PT5.

4.1.5.6. Pré-tratamento PT6 (Pré-tratamento com álcali assistido com micro-ondas)

Uma amostra de BCA moído foi submetida a pré-tratamento com NaOH 1% (w/v) assistido com micro-ondas em forno de micro-ondas doméstico (Brastemp, BMS35BBHNA 00, Brasil, potência 820 W) com uma frequência de operação de 2450 MHz, durante 3 minutos (ZHU et al., 2006; BINOD et al., 2012). O material resultante após este pré-tratamento foi denominado fração rica em celulose do PT6 ou BCA pré-tratado do PT6.

4.1.5.7. Pré-tratamento PT7 (Pré-tratamento com álcali assistido com micro-ondas seguido por tratamento ácido assistido com micro-ondas)

A biomassa seca do PT6 foi submetida a pré-tratamento com ácido H₂SO₄ 1% (m/v) BINOD et al. (2012) e exposta ao micro-ondas doméstico por 3 minutos. O material resultante após este pré-tratamento foi denominado fração rica em celulose do PT7 ou BCA pré-tratado do PT7.

4.1.6. Lavagem e secagem das frações ricas em celulose derivados do pré-tratamentos

As frações ricas em celulose obtidas a partir de todos os pré-tratamentos descritos foram separados por filtração. Em seguida foi feita a lavagem desses BCA pré-tratados com água destilada até atingir pH 7, depois foram lavados em etanol 70% (v/v) para ajudar a eliminação da água e a seguir todos foram secos separadamente em estufa a 50°C até atingir peso constante, como descrito por Teixeira et al. (2011) e Liu et al (2006). Depois de secas, as frações ricas em celulose foram caracterizadas (TAPPI, XRD, FTIR, TG, MEV) e submetidos a tratamentos com soluções de ácido sulfúrico para extração de resíduos de lignina e hemiceluloses.

4.2. Análise da composição química e rendimentos do bagaço de cana-de-açúcar e das frações ricas em celulose usando-se metodologias TAPPI modificadas

Os dados foram obtidos no Laboratório de Físico-Química e Laboratório de Reciclagem de Polímeros do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, junto ao professor Dr. Daniel Pasquini, utilizando-se a metodologia TAPPI modificada. Nas figuras 17, 18 e 19 apresentam fluxogramas sobre as etapas da caracterização química do BCA e dos BCA pré-tratados ou frações ricas em celulose.

4.2.1. Teor de Umidade

O teor de umidade foi determinado pelo método da estufa de acordo com a norma modificada TAPPI T264 OM-88. Uma massa de aproximadamente $2 \pm 0,01$ g de amostra foi colocada em cadinho previamente seco e tarado. Este conjunto foi condicionado em estufa a 105 ± 3 °C por 2 horas, resfriado em dessecador até atingir temperatura ambiente e pesado. Logo em seguida, o conjunto foi colocado na estufa por mais 1 hora a 105 ± 3 °C e foram repetidos os procedimentos de arrefecimento e pesagem até se atingir massa constante (quando as pesagens sucessivas não diferiram por mais de 0,002 g). Assim, o teor de umidade foi

calculado como a diferença percentual entre a massa de amostra inicial e a massa de amostra depois do processo de secagem. Onde a fórmula para calcular o teor de umidade é a seguinte:

$$TU\% = \frac{(MRAU - MRAS)}{MAU} \times 100$$

TU%: teor de umidade

MAU: massa da amostra úmida

MRAU: massa do conjunto recipiente/ amostra úmida

MRAS: massa do conjunto recipiente/ amostra seca

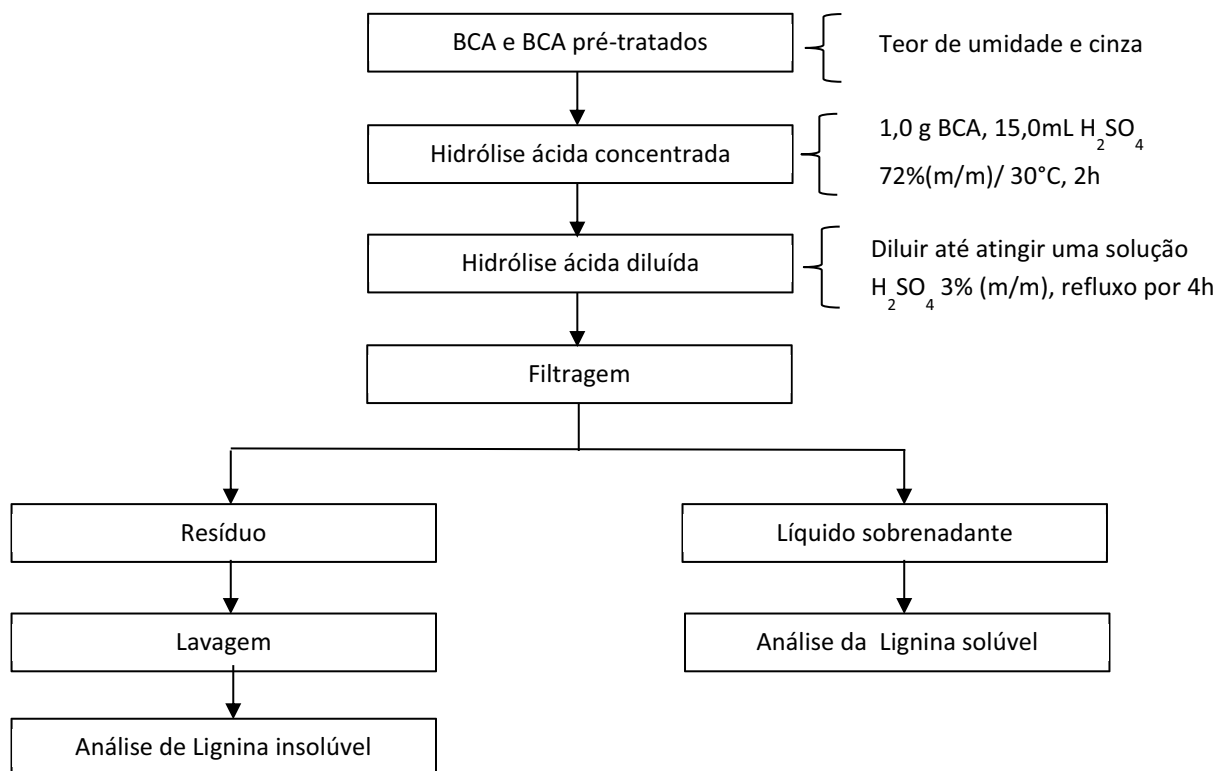


Figura 17. Fluxograma para medir os teores de umidade, cinza, lignina pela metodologia TAPPI

4.2.2. Teor de Cinzas

A determinação do teor de cinzas foi realizada de acordo com norma modificada TAPPI T211 OM-93. Em um cadinho de porcelana, previamente seco e tarado, foi colocada uma massa de aproximadamente 1 g de amostra e o conjunto foi condicionado à temperatura de 800°C em mufla por 2 h. Em seguida o sistema

(cadinho + amostra calcinada) foi transferido para uma estufa e posteriormente resfriado em dessecador até temperatura ambiente e pesado. O conteúdo de cinzas foi determinado considerando a percentagem de massa do resíduo (amostra após a calcinação) com relação à massa inicial de amostra seca. Onde a fórmula para calcular o teor de cinza é a seguinte:

$$TC\% = \frac{(MRAC - MR)}{MA} \times 100$$

TC%: teor de cinzas totais

MR: massa do recipiente

MA: massa da amostra

MRAC: massa do conjunto recipiente/ amostra calcinada

4.2.3. Teor de Lignina Klason Insolúvel

A determinação do teor de lignina Klason insolúvel foi realizada seguindo a norma TAPPI 222om-98 modificada. Uma massa de aproximadamente $1 \pm 0,01$ g de amostra seca foi colocada em Erlenmeyer onde foram adicionados 15,0 mL de solução de ácido sulfúrico 72% (m/m) ($d = 1,6389 \text{ g.mL}^{-1}$), lentamente e sob agitação por 2 horas a temperatura ambiente (contadas a partir da adição de ácido a amostra). Após esse tempo, a mistura foi transferida para um balão redondo de 1 L, diluída com água destilada para a concentração de ácido sulfúrico de 3% (m/m) (adição de água até que a solução tenha um volume total de 575 mL) e aquecida em refluxo por 4 h. Em seguida, filtrou-se a lignina insolúvel em funil de vidro sinterizado nº4, previamente seco e tarado. Coletou-se o filtrado para análise posterior de lignina Klason solúvel. A lignina insolúvel contida no funil foi lavada e secada em estufa a 105 ± 3 °C por 12 horas, resfriada em dessecador até temperatura ambiente e pesado (em uma balança com precisão de 0,0001 g). O conteúdo de lignina insolúvel foi calculado como a porcentagem da massa de lignina insolúvel em relação à massa inicial de amostra seca, onde obteve-se a seguinte equação para calcular o teor de lignina insolúvel:

$$TLI\% = \frac{(MFL - MF)}{MA} \times 100$$

TLI%: teor de lignina insolúvel

MFL: massa do funil somada à massa de lignina, após a secagem em estufa

MF: massa do funil limpo e seco

MA: massa da amostra

4.2.4. Teor de Lignina Klason Solúvel

A quantidade de lignina solubilizada em meio ácido foi quantificada por meio da espectroscopia na região do ultravioleta de acordo com a norma TAPPI T13M-54 contendo modificações. As soluções analisadas foram preparadas utilizando o filtrado da etapa anterior e diluindo-o com água até a concentração final de 0,05 M de ácido sulfúrico. Uma solução de referência de concentração de 0,05 M foi preparada, a partir do ácido sulfúrico 72% (m/m). Medidas de absorvância do filtrado foram realizadas nos comprimentos de onda de 215 e 280 nm. A concentração (g.L^{-1}) de lignina Klason solúvel foi calculada pela equação abaixo (1):

Equação 1. $\text{CLS (g/L)} = [(4,53 \times A_{215}) - A_{280}] / 300$

Onde: $\text{CLS (g.L}^{-1}\text{)}$ = concentração de lignina Klason solúvel em meio ácido; A_{215} = valor da absorvância a 215 nm; A_{280} = valor da absorvância a 280 nm.

A equação (1) aplica os mesmos princípios da lei de Lambert-Beer. Os dois valores de absorvância refletem a necessidade de se fazer uma correção para os compostos, como furfural, gerados durante a hidrólise, que interferem na medição da lignina solúvel. A absorvância em 280 nm (equação 2) é, na verdade, uma correção para os compostos de furfural enquanto que a absorvância em 215 nm (equação 3) é uma medida da concentração de lignina solúvel mostrada na equação (1) é resultante da resolução simultânea de outras duas equações:

Equação 2. $A_{280} = 0,68 C_D + 18 C_L$

Equação 3. $A_{215} = 0,15 C_D + 70 C_L$

Onde: A_{280} = valor da absorvância a 280 nm; A_{215} = valor da absorvância a 215 nm; C_D = concentração dos carboidratos (g.L^{-1}); C_L = concentração da lignina solúvel

(g.L⁻¹). As constantes das equações 2 e 3 são absorvidades molares de 0,68 e 0,15 dos produtos de degradação em 280 e 215 nm, respectivamente, e os valores de 18 e 70 são absorvidades molares da lignina solúvel em 280 e 215 nm, respectivamente. Para a obtenção do teor de lignina solúvel, usa-se a seguinte equação:

$$\text{TLS\%} = \frac{\text{MLS}}{\text{MA}} \times 100$$

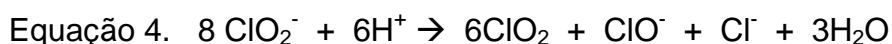
TLS%: teor de lignina solúvel

MLS: massa de lignina na amostra seca

MA: massa da amostra

4.2.5. Obtenção da holocelulose

A holocelulose é o produto resultante da extração da lignina e é constituída por celulose e hemiceluloses. Este processo de deslignificação utiliza o clorito de sódio e está baseado na reação entre lignina e ClO₂, ClO⁻, produtos estes formados em reações redox de ClO₂⁻ em meio ácido segundo a equação (4).



O procedimento para obtenção da holocelulose (BROWNING, 1967) – método de extração que utiliza clorito ácido como descrito: uma massa de 5 g de amostra seca foi colocada em um Erlenmeyer de 250 mL com 100 mL de água destilada. O Erlenmeyer foi colocado em banho-maria, a 75 °C e a ele foram adicionados 2,0 mL de ácido acético e 3,0 g de clorito de sódio, nesta ordem, tampando o Erlenmeyer para não ocorrer à perda do gás produzido na reação. Após 1 hora, adicionou-se novamente 2,0 mL de ácido acético e 3,0 g de clorito de sódio. Esse processo foi repetido por mais duas vezes. A mistura foi então resfriada a 10 °C, filtrada em funil de Buchner de vidro sinterizado n°2, previamente seco e tarado, e lavada com água destilada a 5 °C até que o resíduo fibroso apresentasse coloração esbranquiçada e o pH do líquido filtrado fosse igual ao da água utilizada na lavagem. Em seguida, o funil de Buchner de vidro sinterizado n°2 com o resíduo fibroso foi seco em estufa a 105 ± 3 °C por 6 horas, resfriado em dessecador e pesado para se quantificar o

rendimento da holocelulose. Onde a fórmula para calcular o teor de holocelulose é a seguinte:

$$TH\% = \frac{(MFH - MF)}{MA} \times 100$$

TH%: teor de holocelulose

MFH: massa do funil somada à massa de holocelulose, após a secagem em estufa

MF: massa do funil limpo e seco

MA: massa da amostra

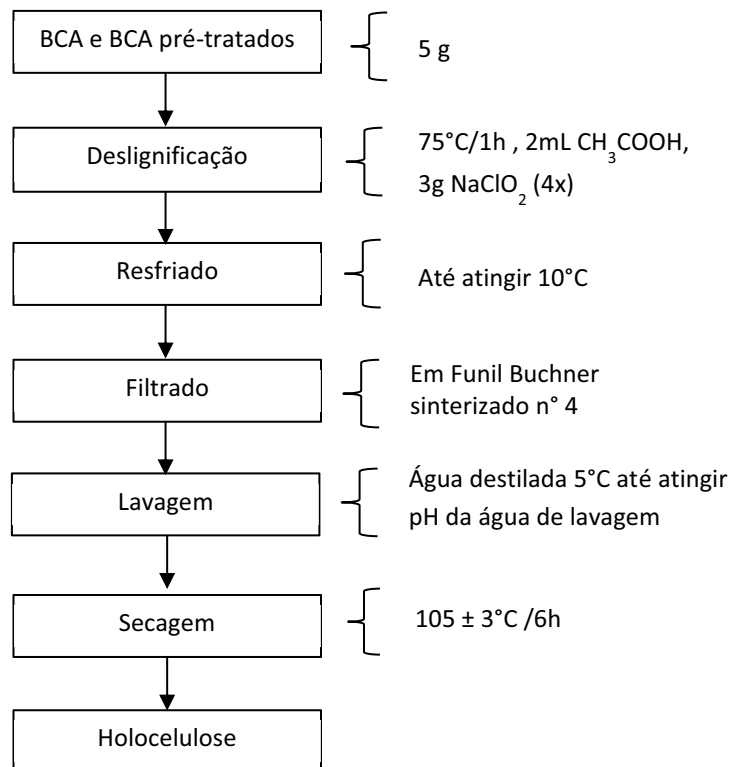


Figura 18. Fluxograma para medir o teor de holocelulose pela metodologia TAPPI

4.2.6. Teor de α-Celulose

A celulose distingue-se analiticamente das hemiceluloses pela sua insolubilidade em soluções alcalinas aquosas. A extração sucessiva da holocelulose (preparada pelo método do clorito ácido) com hidróxido de potássio 5 e 24 % em forma sequencial resulta em valores que, somados, representam a fração de hemiceluloses. O resíduo fibroso que resulta das duas extrações acima

mencionadas é designado α -celulose (BROWNING, 1967). Para a obtenção de α -celulose na presente pesquisa, transferiu-se 3,0 g de holocelulose seca para um Erlenmeyer de 250 mL, adicionou-se 100 mL de solução de KOH (5%) e uma atmosfera inerte foi obtida pelo aborbulhamento de gás nitrogênio, durante os cinco minutos iniciais da extração para evitar a oxidação da celulose. O Erlenmeyer foi tampado e mantido sob agitação constante por 2 horas. A mistura foi então filtrada em funil de Buchner de vidro sintetizado nº 2, lavada com 50 mL de solução de KOH (5%) e em seguida com 100 mL de água destilada. O resíduo fibroso retido no funil foi transferido mais uma vez de forma quantitativa para o Erlenmeyer de 250 mL. O mesmo procedimento de extração foi repetido utilizando solução de KOH (24 %). Para lavagem do resíduo fibroso retido no funil, utilizou-se 25 mL de solução de KOH (24%), 50 mL de água destilada, 25 mL de ácido acético (10%) e 100 mL de água destilada, respectivamente. Após a extração dos componentes solúveis em soluções aquosas de hidróxido de potássio, o resíduo fibroso foi lavado com água destilada até que o filtrado apresentasse pH neutro. O resíduo foi então lavado com 50 mL de acetona, seco a 105 ± 3 °C por 6 horas, e pesado. O conteúdo de α -celulose foi determinado como a percentagem da massa de resíduo em relação a massa inicial de amostra seca, levando em conta o rendimento calculado na obtenção da holocelulose.

$$\text{TAH\%} = \frac{(\text{MFA} - \text{MF})}{\text{MAH}} \times 100$$

TAH%: teor de α -celulose com respeito à holocelulose

MFA: massa do funil somada à massa de α -celulose, após a secagem em estufa

MF: massa do funil limpo e seco

MAH: massa da amostra de holocelulose

$$\text{TA\%} = \frac{\text{TH\%} \times \text{TAH\%}}{100}$$

TA%: teor de α -celulose

4.2.7. Teor das hemiceluloses

O conteúdo das hemiceluloses foi determinado e expresso em percentagem da diferença entre os teores de holocelulose e α -celulose em relação às massas

iniciais das amostras secas (ZHAO et al., 2007; MORAIS et al., 2010). Onde a fórmula para calcular o teor de hemiceluloses é a seguinte:

$$\text{The\%} = \text{TH\%} - \text{TA\%}$$

The%: teor de hemiceluloses

TH%: teor de holocelulose

TA%: teor de α -celulose

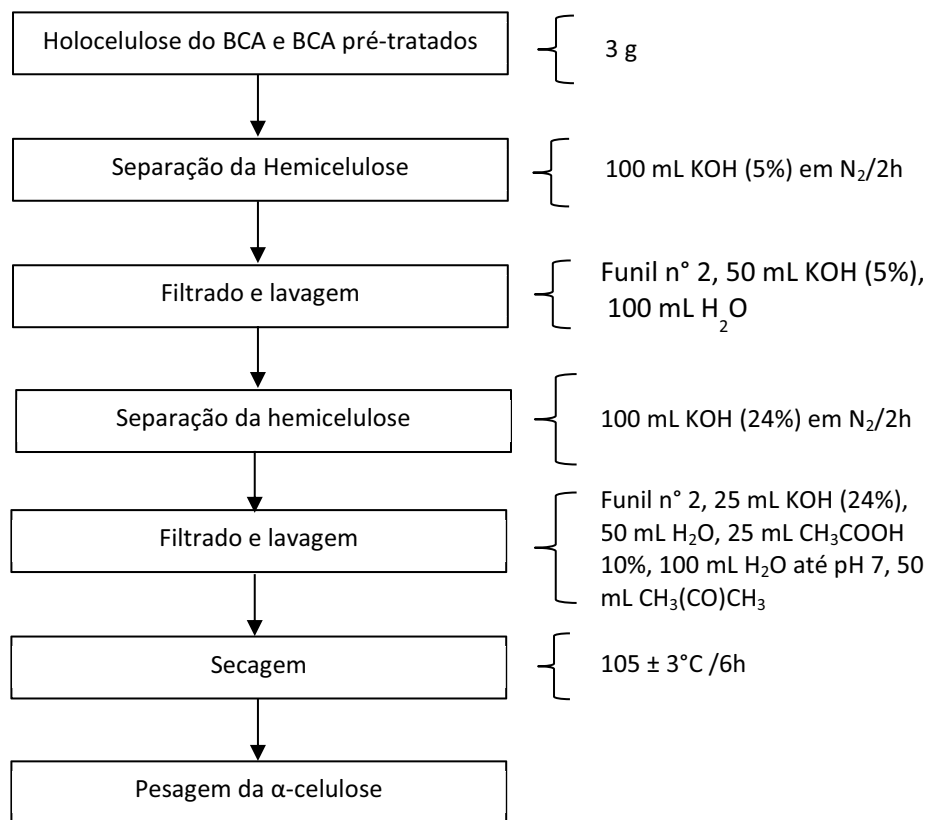


Figura 19. Fluxograma para medir o teor de α -celulose pela metodologia TAPPI

4.3. Extrações de açúcares e formação de produtos inibidores da fermentação por tratamento com soluções de ácido sulfúrico

As extrações dos açúcares das hemiceluloses variam com a concentração de ácido sulfúrico (2-6%) e com a temperatura, a elevação da temperatura acima de 122°C mostrou tempos máximos de hidrólise acima dos quais ocorreu a degradação dos açúcares simples (AGUILAR et. al., 2002). Em concentrações maiores (30-49% m/v) com porcentagens altas de conversão na faixa de 50°-70°C dependendo da

porcentagem de sólidos (SARROUH et al.,2007). Com base nestas duas literaturas decidiu-se realizar experimentos com concentrações ácidas tão baixas quanto 2% a 6% e tão altas como 30%.

4.3.1. Hidrólise com ácido sulfúrico 2-6%

Os materiais ricos em celulose resultantes dos pré-tratamentos foram submetidos a um sistema de refluxo (Figura 20) com ácido sulfúrico diluído em concentrações de 2%, 4% e 6% (m/v) a 98°C durante um tempo que variou de 0 - 3 horas (AGUILAR et. al., 2002; HU et. al., 2010), numa proporção inicial de sólido e líquido de 1:20, conforme descrito por Nigam (2001); na ausência e presença de catalisador 100 mM FeCl₃ como descrito por Liu et al. (2009). Os resíduos dos materiais resultantes das extrações ácidas foram separados por centrifugação. Em seguida, o líquido sobrenadante foi neutralizado com adição de soluções de hidróxido de sódio de 0,5 - 1,5 M. Os precipitados de Na₂SO₄ resultantes as neutralizações foram separados por uma segunda centrifugação. Ao final os sobrenadantes foram usados para as análises de açúcares extraídos e de inibidores da fermentação formados.



Figura 20. Sistema de refluxo utilizado no presente trabalho.

4.3.2. Hidrólise com ácido sulfúrico 30%

Os resíduos dos pré-tratamentos foram submetidos a uma hidrólise ácida concentrada com ácido sulfúrico (30%) a 80°C (SARROUH et. al., 2007) em tempos de incubação modificados de 0 - 6 h, e em uma razão inicial de sólido e líquido de 1:20 (NIGAM, 2001) com e sem adição de 100 mM FeCl₃ como descrito por Liu et al. (2009). O resíduo foi separado por centrifugação. Em seguida, o líquido sobrenadante foi neutralizado com adição de concentrações de 13,17 mol L⁻¹ NaOH e o precipitado de Na₂SO₄ formado durante a neutralização foi separado por uma segunda centrifugação. Ao final os sobrenadantes foram usados para as análises de açúcares e de inibidores da fermentação.

4.4. Ensaio analítico dos hidrolisados

As curvas padrões obtidas para cada método de ensaio descrito abaixo foram ajustadas por regressão lineal (Origin Pro 8) como amostrado no apêndice 1.

4.4.1. Determinação de açúcares redutores totais

Para determinar os açúcares redutores nos hidrolisados dos resíduos do BCA pré-tratados, utiliza-se o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (MILLER, 1959). Este método baseia-se na redução do ácido 3,5-dinitrosalicílico, em meio alcalino (coloração amarela), sendo que o produto formado é estável e tem coloração laranja-avermelhado (3-amino 5-nitro salicilato) com máxima absorção no comprimento de onda de 546 nm (Figura 21). A faixa de concentração de glicose na curva da regressão linear elaborada neste estudo foi de 0,005 a 0,0325 % de glicose (m/v) e equivalente a absorbâncias de 0,057 a 0,8935, como mostra a Figura 54 do apêndice 1.

A composição do reagente DNS é a seguinte: 1,0g de Ácido 3,5-dinitrosalicílico; 30,0 g de Tartarato de Potássio; 1,6 g de Hidróxido de Sódio e 100 mL de água destilada. Os reagentes foram dissolvidos em água destilada, e a seguir adicionou-se o ácido reagente do dinitrossalicílico (DNS) os quais foram preparados separadamente. O reagente foi estocado a temperatura ambiente.

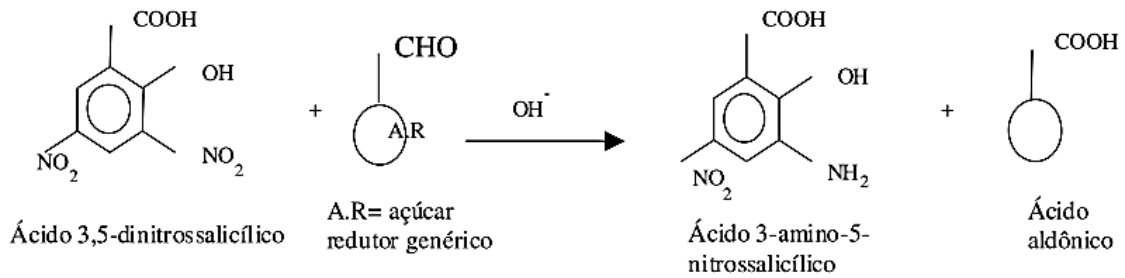


Figura 21. Reação do reagente ácido dinitrossalicílico é reduzido pelo açúcar redutor em meio alcalino (SILVA et al. 2003).

Para realizar a determinação de açúcares redutores utilizou-se três componentes: primeiramente foi empregado 2 mL da amostra padrão (0,1% m/v), diluída no intervalo da concentração (Figura 54, do apêndice 1); em seguida, uma amostra neutralizada e diluída em água; e, por último, o branco foi preparado adicionando-se 2 mL de água no lugar da amostra. A todos esses componentes foram adicionados 2 mL de reagente DNS. Os tubos foram transferidos para banho de água fervente (100°C) por 5 minutos e posteriormente foram feitas as leituras de absorbância a 546 nm.

4.4.2. Determinação de glicose

Os ensaios da glicose foram determinados pelo método enzimático da glicose oxidase (McCLEARY et al., 1988), utilizando-se o “kit” de procedência de LABORLAB.

Inicialmente, a glicose presente nas amostras é oxidada a ácido glucônico e peróxido de hidrogênio, em presença de glicose-oxidase. O peróxido de hidrogênio formado na presença de peroxidase e do sistema constituído por fenol e 4-aminofenazona (aceptor e oxigênio nesta reação) reage formando um cromógeno rosado que absorve a 505 nm como mostra a Figura 22.

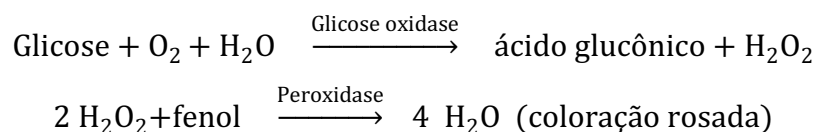


Figura 22. Reação enzimática para quantificar a glicose.

O reagente de cor foi constituído pelo “kit” enzimático de procedência Laborlab (código nº 077.011.016), contendo os seguintes constituintes: reativo enzimático CAT nº. 02202 (glicose oxidase e peroxidase), reativo de cor (1) CAT nº. 02203 (4-aminofenazona 0,025 mol/L e tampão Tris 0,92 mol/L) e reativo de cor (2) CAT nº. 02204 (fenol 0,055 mol/L), pH 7,4 ± 0,10.

As amostras padrões de glicose foram preparadas com concentrações na faixa de 0,03 até 0,27 % (m/v) como mostra a Figura 55 do apêndice 1.

Quanto ao procedimento da determinação de glicose, a análise foi realizada através da adição de 50 µL das amostras hidrolisadas previamente neutralizadas. Ao reagente de cor da glicose, a mistura foi então incubada em banho termostático a 37°C, durante 10 minutos. Por fim, resfriou-se em banho de gelo antes das leituras em espectrofotômetro em comprimento de onda ajustado para 505 nm.

4.4.3. Determinação de xilose

A xilose formada durante as hidrólises foi determinada pelo método de Floroglucinol (1,3,5-trihidrobenceno), descrito por Eberts et al, (1979). Na presença do ácido clorídrico 98%, para produzir furfural, ocorre desidratação da xilose. Este teste baseia-se na reação do furfural com floroglucinol para produzir um composto colorido com elevada absorvidade molar. O reagente de cor foi preparado para conter 0,5 g de floroglucinol, 100 mL de ácido acético glacial e 10 mL de HCl concentrado. Esse reagente é estável por 4 dias a temperatura ambiente desde que seja protegido da luz.

A curva de calibração da xilose foi feita da seguinte maneira: uma solução concentrada de D-xilose (13 mmol L⁻¹) foi preparada em ácido benzóico saturado (0,29 g de ácido benzóico/100 mL de água) a pH 2,8 a 25°C. Esta solução concentrada foi diluída em concentrações que variam entre a faixa de 0,13 mmol L⁻¹ até 3,81 mmol L⁻¹ de xilose diluída em ácido benzóico saturado. As concentrações diluídas foram ensaiadas em triplicada para obtenção das curvas, como mostra a Figura 56 do apêndice 1.

Quanto ao procedimento, em tubos contendo 5 mL de reagente de cor adicionou-se 50 µL de amostra, os quais foram agitados e mantidos a 100°C por 4 minutos. A reação foi rapidamente resfriada à temperatura ambiente. O conteúdo dos tubos de ensaios foi homogeneizado por agitação antes das leituras de

absorbância a 554 nm. O branco foi preparado adicionando-se 50 µL de água destilada no lugar de amostra.

4.4.4. Determinação dos fenóis totais

Os compostos fenólicos foram determinados pelo método de Singleton et al. (1999), Waterhouse (2002) que se baseia no uso do reagente folin-ciocalteau em microescala. Os polifenóis reagem com o agente redox (reagente de folin-ciocalteau) formando um complexo azul que é quantificado na região do visível do espectro. Foi feita uma modificação na construção da curva de calibração utilizando-se vanilina como padrão ao invés de ácido gálico, sugerida por Carvalho et al (2005) e Rodrigues et al. (2010) a concentrações da curva foram feitas em intervalo de 100 até 550 mg/L (ver Figura 57 do apêndice 1).

Para a dosagem dos fenóis totais dos hidrolisados, 20µL de amostras diluídas foram pipetadas e adicionou-se 1,58 mL de água destilada e 100 µL do reagente Folin-Ciocalteu. Após 8 minutos em repouso, foram adicionados 300 µL da solução de Na₂CO₃ a 20% (m/v). As amostras foram deixadas em repouso por 2 horas a temperatura ambiente, sendo as leituras da absorbância feitas em espectrofotômetro a 760 nm. O branco foi feito substituindo o volume da amostra pelo mesmo volume de água destilada, mantendo os demais reagentes.

4.4.5. Determinação de furanos

As determinações dos hidrolisados de hemicelulose foram baseadas na diferença de absorbância (nm) de A₂₈₀ e A₃₂₀, lidas no espectrofotômetro UV-Vis para medidas de furanos (furfural e hidroximetilfurfural), utilizando a equação descrita por Martinez et al., (2000). As amostras dos hidrolisados neutralizados foram diluídas com água destilada (1:20) para depois fazer as leituras no espectrofotômetro.

4.5. Caracterizações morfológicas e físicas do BCA e dos BCA pré-tratados

4.5.1. Microscopia eletrônica de varredura

A morfologia das amostras (BCA e dos BCA pré-tratados) foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) utilizando-se um microscópio modelo JEOL JSM -7500F, pertencente ao Departamento de Físico Química do Instituto de Química de Araraquara-UNESP. As amostras foram fixadas sobre suportes de alumínio recobertas por fita de carbono de 1-10 mm por 60 s (2Kb e 9,5 A) sob uma voltagem de aceleração de 2-10 kV para análise da morfologia de cada uma delas.

4.5.2. Espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier

Os experimentos foram realizados em um FTIR Perkin Elmer Spectrum1000 pertencentes ao laboratório de Química Inorgânica do Instituto de Química da UNESP-Araraquara. O método do disco de KBr (pastilhas ultrafinas) foi utilizado para se obter os espectros de FTIR. As amostras (BCA e BCA pré-tratados) foram moídas e misturadas com KBr (em todas as análises de FTIR foram usados 0,2 g de KBr e 0,002g de amostra em uma proporção de 1:100 m/m de amostra/KBr) para preparar as pastilhas. Os experimentos foram realizados na faixa de $500-4000\text{cm}^{-1}$, com uma resolução de 4cm^{-1} e um total de 32 varreduras por amostra.

4.5.3. Difração de Raios-X

Os difratogramas das amostras (BCA e dos BCA pré-tratados) foram obtidos à temperatura ambiente dentro de uma variação de 2θ entre 5° a 40° e uma velocidade de varredura de 2°min^{-1} . O equipamento utilizado foi um difratômetro Siemens Kristalloflex diffractometer, localizado no Departamento de Físico Química do Instituto de Química de Araraquara-UNESP, operando a uma potência de 40 kV com uma corrente de 30 mA sendo a radiação $K\alpha$ do Cu ($\lambda=1,5406 \text{ \AA}$). Antes de realizar as análises de DRX, todas as amostras foram secas a 50°C durante 12 horas em uma estufa de ar circulante. O índice de cristalinidade (ICr) das amostras foram medidas pelo método de deconvolução (ajuste de curvas) a partir de um difratograma de raios-X. Um programa de ajuste de curvas foi usado (PeakFit;

<www.systat.com>, assumindo os picos como funções gaussianas (PARK et al, 2010).

Após isso, o (ICr) foi calculado através da equação 5 (TERINTE et al, 2011):

Equação 5.
$$ICr(\%) = \left(\frac{A_c}{A_c + A_A} \right) \cdot 100$$

Onde A_C e A_A são as áreas dos picos cristalinos e halo amorfo, respectivamente.

4.5.4. Termogravimetria

Neste trabalho, a estabilidade térmica do BCA e dos BCA pré-tratados foram avaliadas utilizando o equipamento SDT de TA Instruments do Departamento de Físico Química do Instituto de Química da UNESP-Araraquara. As condições de análise foram as seguintes: atmosfera de nitrogênio e oxigênio com uma vazão de 100 mL.min⁻¹, em uma rampa de aquecimento de 20 °C.min⁻¹, intervalo de temperatura de 25 a 600 °C, massa da amostra de 5 a 7 mg e cadinho de alumina.

4.6. Determinação da massa molecular média viscosimétrica da α -celulose do BCA e dos BCA pré-tratados

Para determinação da massa molecular viscosimétrica da celulose seguiu-se o procedimento descrito na norma ABNT NBR 7730. Para isso o primeiro passo foi o preparo do solvente (solução de cuproetilenodiamina). Foi transferido para um Erlenmeyer 25 mL de água destilada e 25 mL de cuproetilenodiamina. Esta solução foi usada como controle. Após as etapas anteriores, foram preparadas soluções de celulose. Pesou-se 0,25 g α -celulose do BCA e dos diferentes BCA pré-tratados triturados e secos em estufa em temperatura aproximada de 105 °C. Transferiu-se essas amostras para um Erlenmeyer e adicionou-se 25 mL de água destilada, agitou-se em agitador magnético continuamente até que a pasta estivesse completamente dispersa. Transferiu-se 25mL da solução de cuproetilenodiamina e purgou-se com N₂ por 1 minuto. O frasco foi tampado e colocado em agitação, em agitador magnético até a dissolução completa da celulose, por aproximadamente 2 horas.

Para as medidas de viscosidade usou-se um viscosímetro capilar de Ostwald, Figura 23, imerso em um banho termostatzado de aproximadamente 25 °C. O viscosímetro foi preenchido com 10 mL de solução usada para dissolver a celulose (cuproetilenodiamina). Esperou-se 5 minutos para que a temperatura do solvente entrasse em equilíbrio térmico com o banho. Com o auxílio de um pipetador de borracha elevou-se o nível do sistema solvente até a marca superior do capilar e marcou-se o tempo de escoamento até a segunda marca. Foram feitas 5 medidas e em seguida repetiu-se o mesmo procedimento para as soluções de α -celulose do BCA e dos diferentes BCA pré-tratados.

Acerca da determinação da massa molecular viscosimétrica da celulose, Oliveira (2013) descreve o seguinte:

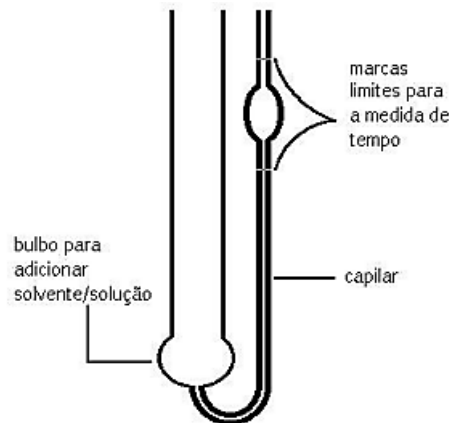


Figura 23. Esquema do viscosímetro de Ostwald.

Cálculo da viscosidade relativa: $n_{rel} = \frac{t_{solução}}{t_{solvente}}$

Cálculo da viscosidade específica: $n_{sp} = n_{rel} - 1$

Cálculo da viscosidade intrínseca (método do ponto único):

$$n_{int} = \frac{\sqrt{2 \cdot (n_{sp} - \ln n_{rel})}}{C}$$

Cálculo de grau de polimerização (GP): $P = 10^{\log(0,75 \cdot n_{int})/0,905}$

Determinação da Massa Molecular do polímero: $MM = 162 \times GP$

Em que: $162 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ é a massa de uma unidade glicosídica.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Composição química do BCA

A composição do BCA *in natura* é bastante variável (CANILHA et al 2011). Assim, foi necessário realizar análise da composição química do bagaço moído seco armazenado a temperatura ambiente para este estudo seguindo a metodologia TAPPI e a composição obtida foi a seguinte: 40,18% celulose, 34,98%, de hemicelulose, 23,49% de lignina e 1,56% de cinzas, como descrito em materiais e métodos.

5.2. Rendimento e composição das frações ricas em celulose resultantes dos pré-tratamentos em relação ao BCA

Como mostra a Tabela 2, as frações ricas em celulose dos PT1, PT4, PT6 e PT7 foram as que apresentaram os maiores rendimentos de biomassa. As frações do PT3 e do PT5 não foram selecionadas para estudos posteriores de hidrólise com ácido sulfúrico, por apresentarem rendimentos baixos de biomassa. A fração PT2 também foi excluída por apresentar rendimento alto no processo que utiliza hipoclorito de sódio, sendo este prejudicial ao meio ambiente (HILGEMBERG e BACHA, 2000). Os itens 5.3 a 5.7 e seus subitens, descritos a seguir, mostram os gráficos das análises dos produtos de extração (açúcares redutores, xilose, glicose, furanos e fenóis totais) das frações ricas em celulose PT1, PT4, PT6 e PT7, em solução de ácido sulfúrico (2%, 4%, 6% e 30% m/v), na ausência e presença de FeCl_3 em concentração 100 mM (YAN et al., 1996; LIU et al., 2009).

Como mostra a Tabela 2, a perda de massa do BCA variou com os diversos pré-tratamentos entre $28,79 \pm 2,45\%$ e $61,0 \pm 0,20\%$, devido a diferentes condições utilizadas, e isto resultou em diminuições das massas das amostras do BCA e aumentos nas massas das frações ricas em celulose.

Em geral, os aumentos na perda de massa nos pré-tratamentos do BCA são devido a vários fatores como menores tamanhos de partícula, menores proporções de sólido/líquido, maiores concentrações de reagentes utilizados, maiores tempos e temperaturas de pré-tratamentos. A exemplo disso, Irfan et al. (2011) realizou um experimento, partindo de amostras do BCA previamente embebidas em KOH por 2

horas, no qual obtiveram uma perda de massa do BCA máxima de 57,4% utilizando 4% de KOH em um tempo de pré-tratamento na de 15 min em autoclave, proporção sólido: hidrolisado de 1:10, e tamanho de partícula de 2mm. O resultado descrito por estes pesquisadores foi uma perda de massa superior a descrita para obtenção da fração PT4 (40,41 ± 0.81 %), devido ao tempo de 2h no qual o BCA esteve embebido em uma concentração de KOH 4%, concentração superior à que foi por nós utilizada no PT4 da presente pesquisa.

Tabela 2 Comparação entre os pré-tratamentos em relação aos rendimentos e perda de massa correspondentes das frações ricas de celulose

Amostras dos Pré-tratamentos	Tempo (h)	Temperatura (°C)	Rendimento (%)	Perda de massa (%)
PT1	11	40	↑ 55,53 ± 0,66	44,47 ± 0,66
PT2	3	75	↑ 66,80 ± 1,58	33,20 ± 1,58
PT3	24	25	48,00 ± 0,10	↑ 52,00 ± 0,10
PT4	1	100	↑ 59,59 ± 0,81	40,41 ± 0,81
PT5	4	55	39,00 ± 0,20	↑ 61,00 ± 0,20
PT6	0,05	160	↑ 71,21 ± 2,45	28,79 ± 2,45
PT7	0,05	160	↑ 64,97 ± 2,98	35,23 ± 2,98

Fonte: elaborado pelo autor

- PT1: Pré-tratamento com peróxido alcalino
 PT2: Pré-tratamento com Hipoclorito de sódio
 PT3: Pré-tratamento com NaOH 8% (m/v), a temperatura ambiente por 24 h
 PT4: Pré-tratamento com NaOH 1% (m/v) a 100°C por 1 hora.
 PT5: Pré-tratamento com NaOH 5 % (m/v) seguido de H₂O₂ 11% (v/v)
 PT6: Pré-tratamento com NaOH 1% (m/v) assistido por micro-ondas.
 PT7: Pré-tratamento com NaOH 1% (m/v) assistido por micro-ondas seguido com H₂SO₄ 1% (m/v) assistido por micro-ondas.

Outra pesquisa realizada por Zhu et al. (2006) obteve uma perda da massa da palha de trigo de 48,4%, utilizando NaOH 1% (m/v) em um procedimento assistido por micro-ondas a 700w por 25 min, razão sólido: líquido de 1:8, e tamanho de partícula de 1-2 cm, com uma perda de massa superior (48,4%). Neste trabalho (Tabela 2), as menores perdas de massa foram obtidas para frações PT6 (28,79 ± 2,45 %) e PT7 (35,23 ± 2,98 %). Esta diferença pode ser devido ao tempo superior (25 min) de pré-tratamento dos pesquisadores acima citados.

Os cálculos de rendimento e perda de massa (ou solubilidade) foram realizados utilizando as seguintes fórmulas recomendadas por Loelovich (2012):

$$R (\%) = 100 \left(\frac{M_f}{M_i} \right)$$

$$S\% = 100 \left[1 - \left(\frac{M_f}{M_i} \right) \right]$$

R%: Porcentagem de rendimento

S%: Porcentagem de perda de massa ou solubilidade

M_i: Massa do BCA antes do pré-tratamento

M_f: Massa do Fração rica em celulose ou BCA pré-tratado

Canilha et al. (2011) descrevem a composição química variável de um bagaço de cana (BCA) variando da seguinte forma: celulose entre 35,0% - 45,0%, hemicelulose entre 26,2% - 35,8%, lignina entre 11,4% - 25,2%.

Usando-se a metodologia TAPPI, a Tabela 3 permite mostrar que os rendimentos das sete frações ricas em celulose pré-tratadas aumentaram em relação às porcentagens obtidas para BCA inicial (40,18 ± 0,30%). As frações hemiceluloses foram reduzidas a valores na faixa de 15,51 ± 0,06% a 32,97 ± 0,51%, em relação ao valor de 34,98 ± 0,26% obtido para BCA. Os pré-tratamentos que originaram as frações ricas em celulose PT4 (7,51 ± 0,05 %) e PT5 (6,53 ± 0,02 %) extraíram as maiores quantidades de lignina como mostra os valores abaixo descritos. Em geral, as menores quantidades de cinzas das sete frações ricas de celulose variaram de 0,94 ± 0,01 % para a fração PT4 a 0,45 ± 0,01 % para a fração PT7. Estas variações em quantidades de cinza (tabela 3) provavelmente provém dos reagentes adicionados durante os pré-tratamentos do BCA, que não puderam ser totalmente retirados durante a etapa da lavagem. O PT5 parece ser o mais eficiente para a obtenção de celulose, por deixar menor teor de lignina e hemicelulose nas Frações ricas em celulose, mas este pré-tratamento apresentou o menor rendimento (39,00 ± 0,02 %), em relação aos demais pré-tratamentos, motivo pelo qual não foi escolhido para a próxima etapa de hidrólise.

Tabela 3. Composições químicas obtidas para o Bagaço de Cana (BCA) moído e das frações ricas de celulose por metodologia TAPPI.

Amostras	Frações da lignocelulose (%) ^(a)			
	Celulose	Hemiceluloses	Lignina	Cinzas
BCA	40,18 ± 0,30	34,98 ± 0,26	23,49 ± 0,15	1,56 ± 0,01
PT1	68,88 ± 0,78	23,12 ± 0,26	10,66 ± 0,11	4,31 ± 0,05
PT2	49,38 ± 0,75	22,61 ± 0,35	12,18 ± 0,13	4,55 ± 0,07
PT3	54,93 ± 0,85	32,97 ± 0,51	13,19 ± 0,18	5,53 ± 0,09
PT4*	64,70 ± 0,50	27,42 ± 0,21	7,51 ± 0,05	0,94 ± 0,01
PT5	80,76 ± 0,30	15,51 ± 0,06	6,53 ± 0,02	2,77 ± 0,01
PT6*	54,18 ± 0,79	30,37 ± 0,44	14,19 ± 0,19	2,07 ± 0,03
PT7 **	60,73 ± 1,24	25,30 ± 0,51	13,24 ± 0,25	0,45 ± 0,01

Fonte: elaborado pelo autor; ^(a) Análise e experimentos em triplicada

A análise da composição química do BCA moído e das sete frações ricas em celulose (Tabela 3) mostra que grande parte destas frações foi solubilizada durante os pré-tratamentos (Tabela 4). Assim, a quantia da fração das hemiceluloses encontrada para o BCA (34,98% ± 0,26 %) foi reduzida como segue (Tabela 3): 15,51 ± 0,06 % para a fração PT5; 22,61 ± 0,35 % para PT2; 23,12 ± 0,26 % para PT1; 25,30 ± 0,51 % para PT7; 27,42 ± 0,21 % para PT4; 30,37 ± 0,44 % para PT6; 32,97 ± 0,51% para PT3

A Tabela 4 mostra que as perdas por solubilização das frações hemicelulósicas do BCA durante os sete pré-tratamentos foi como segue: 82,70% para fração rica de celulose PT5; 63,30% para o PT1; 56,83 % para PT2; 53,80 % para PT4; 53,01% para PT7; e 38,17 % para PT6. Além disto, todos os pré-tratamentos estudados deste trabalho mostraram deslignificações altas quando comparadas ao BCA da seguinte forma: 89,16 % para frações ricas em celulose PT5; 74,81% para PT1; 73,06% para PT3; 63,39% para PT7; e 57,07% para PT6. Na maioria dos pré-tratamentos, estas deslignificações altas foram devidas a utilização de agentes químicos como álcali e peróxido de hidrogênio em diversas concentrações para removerem a lignina (TABIL et al., 2011). A deslignificação com álcali (NaOH 1% em m/v a 100°C por 1h) foi utilizada para pré-tratar a celulignina. Esta é proveniente de hidrólise ácida do BCA, durante o pré-tratamento por explosão a vapor, e foi reduzida de 34,3 ± 0,3 % a 5,5 ± 0,2% (OLIVEIRA et al., 2012). Por fim, a solubilização da lignina e da hemicelulose variou com o pré-tratamento, enquanto as

menores perdas de celulose foram obtidas juntamente com as frações PT7, PT6, PT4 e PT1. A obtenção de altos rendimentos de etanol de segunda geração depende das perdas tanto menores quanto possíveis da fração rica de celulose.

Tabela 4. Perdas por solubilização dos componentes macromoleculares das frações rica em celulose.

Frações ricas em celulose	Quantias das frações solubilizadas em relação ao bagaço de cana (%)		
	Celulose	Hemiceluloses	Lignina
PT1	4,80 ± 1,71	63,30 ± 0,66	74,81 ± 0,43
PT2	17,91 ± 2,39	56,83 ± 1,26	65,38 ± 0,93
PT3	34,38 ± 1,13	54,77 ± 0,78	73,06 ± 0,42
PT4	4,03 ± 1,66	53,30 ± 0,81	80,95 ± 0,32
PT5	21,60 ± 0,76	82,70 ± 0,17	89,16 ± 0,10
PT6	3,97 ± 3,66	38,17 ± 2,35	57,07 ± 1,61
PT7	1,80 ± 4,98	53,01 ± 2,38	63,39 ± 1,83

Fonte: elaborado pelo autor

A solubilidade das hemiceluloses é provavelmente devida a esse polímero estar presente principalmente na superfície exterior da estrutura lignocelulósica, de onde é extraída facilmente por diversas soluções de pré-tratamento. Por outro lado, as longas cadeias de celulose não são facilmente dissolvidas, uma vez que se encontram nas partes internas da fibra e, por conseguinte, são biopolímeros semicristalinos com regiões cristalinas ordenadas e regiões amorfas desordenadas (Liu et al., 2006).

Ainda com base nas Tabelas 3 e 4, a maior deslignificação ocorreu com a fração PT5 (89,16 %), PT4 (80,95 %) e PT1 (74,81 %). A fração PT1 foi obtida seguindo o procedimento descrito por Brienza et al. (2009). Neste contexto, podemos afirmar que as deslignificações consecutivas do PT5, ajudaram a branquear o material lignocelulósico, conforme se encontra ilustrado na Figura 24. Comparando-se a fração rica em celulose proveniente do PT4 (NaOH 1% em m/v a 100°C por 1 hora), com o fração rica em celulose do PT5, verifica-se que esses dois pré-tratamentos resultaram em deslignificação semelhantes, com base na perda de cor das frações Isto pode se confirmado por dados da Tabela 3.

O BCA moído contém 23,49 ± 0,15 % da fração lignina, enquanto uma quantia aproximada de 23 ± 1,01 % foi descrito por Irfan et al. (2011), para o BCA. Estes pesquisadores observaram que após o pré-tratamento com solução KOH 2,5 %,

ocorre uma redução no teor de lignina do BCA de até 7,32% (equivalente a deslignificação de 70,72%), enquanto que KOH 4 % reduz o teor de lignina em até 7,6 % (deslignificação de 69,6 %), em um tempo de 45 min. Na Tabela 4, obteve-se uma deslignificação de 80,95 % com uma obtenção de teor de lignina de $7,51 \pm 0,05$ % (Tabela 3) da fração PT4, esta deslignificação foi superior a encontrada por por Irfan et al (2011), possivelmente porque utilizou-se NaOH ao invés de KOH e o tempo de pré-tratamento foi maior (60 minutos) ao utilizado pelos autores acima mencionados.

A diminuição dos teores de lignina e hemicelulose durante os pré-tratamentos do BCA fez com que aumentasse os teores de celulose (Tabela 3), podendo denominar a fração rica em celulose como sendo “fração rica em celulose”, como sugere Meng et al. (2012).

Conforme se encontra representado na Figura 24, as fotografias do BCA e das diferentes frações ricas em celulose (câmera Sony modelo DSC-W570 a uma distância de 3.5 cm e zoom óptico de 2,75), demonstrou que o BCA e as diferentes frações ricas em celulose dos PT1, PT2, PT3, PT4, PT5, PT6 e PT7, apresentam diferentes cores.



Figura 24. Fotos do BCA e das Frações ricas em celulose.

- PT1: Pré-tratamento com peróxido alcalino
- PT2: Pré-tratamento com Hipoclorito de sódio
- PT3: Pré-tratamento com NaOH 8% (m/v), a temperatura ambiente por 24 h
- PT4: Pré-tratamento com NaOH 1% (m/v) a 100°C por 1 hora.
- PT5: Pré-tratamento com NaOH 5 % (m/v) seguido de H₂O₂ 11% (v/v)
- PT6: Pré-tratamento com NaOH 1% (m/v) assistido por micro-ondas.

PT7: Pré-tratamento com NaOH 1%(m/v) assistido por micro-ondas seguido com H₂SO₄ 1%(m/v) assistido por micro-ondas.

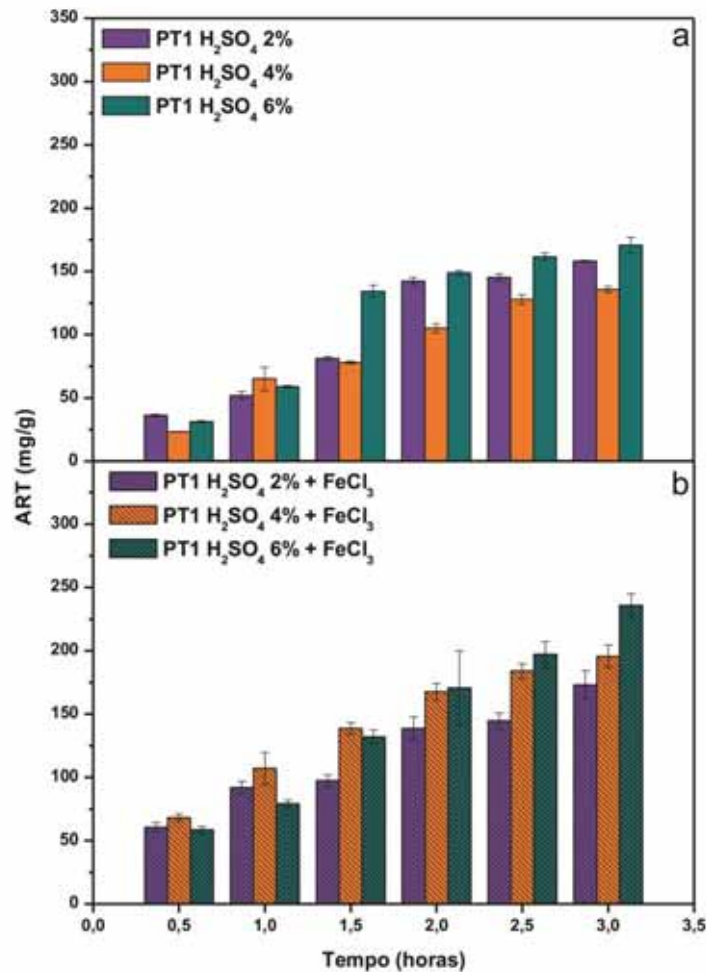
5.3. Liberação de açúcares redutores totais (ART) durante extração com ácido sulfúrico 2-6% das frações ricas em celulose (PT1, PT4, PT6 e PT7): efeito do tempo e concentração do ácido sulfúrico em ausência e presença de FeCl₃

Quatro frações ricas em celulose do PT1, PT4, PT6 e PT7 foram submetidas a extrações com H₂SO₄ 2 %, 4 % e 6 % (m/v), em presença e ausência de 100 mM FeCl₃. A quantificação de açúcares redutores foi determinada pela metodologia do ácido 3,5-dinitrosalicílico em triplicada. O aumento da liberação de ART durante as extrações ácidas á pressão atmosférica, ocorreu quando houve aumento da concentração de ácido sulfúrico durante o transcorrer do tempo, como ilustrado nas figuras 25 a 28. O ART extraído das frações ricas em celulose do PT1, PT4, PT6 e PT7 atingiu concentrações máximas que se tornaram constantes. A facilidade na liberação do ART das frações variou com o tipo de pré-tratamento utilizado.

5.3.1. Açúcares redutores liberados após extração com ácido sulfúrico 2-6% aplicada a fração rica de celulose do PT1

As Figuras 25a e 25b descrevem as concentrações de ART liberadas das frações do PT1 por soluções de diferentes concentrações de H₂SO₄, os quais mostraram um aumento de ART com o transcorrer do tempo.

Durante extração ácida da fração rica em celulose do PT1 na presença do FeCl₃, o extrato deste mostra maiores concentrações de ART do que em ausência de FeCl₃, com o tempo em todas as concentrações de ácido sulfúrico utilizadas. A maior concentração de ART foi obtida em 3 h em solução de H₂SO₄ 6 % e presença de FeCl₃ 100 mM (235,91 ± 9,15 mg/g), que representa um aumento de 27,66 % comparado com a concentração de ART do extrato obtido com H₂SO₄ 6 % na ausência de FeCl₃ (170,66 ± 6,19 mg/g), no mesmo período de tempo.



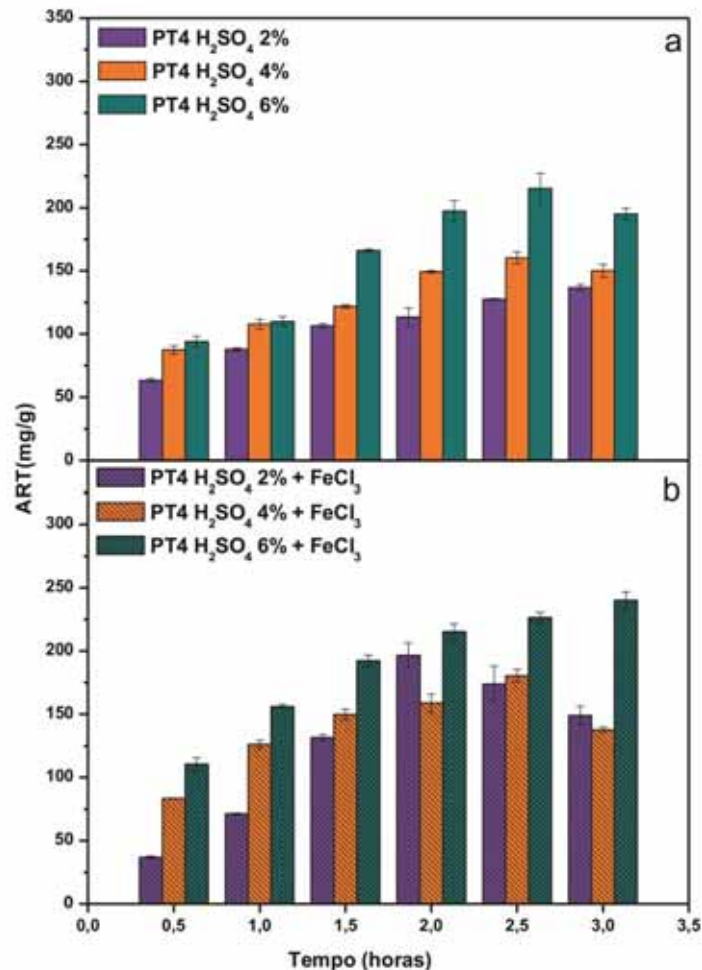
Fonte: elaborado pelo autor

Figura 25. Liberação de açúcares redutores após extração com ácido sulfúrico 2-6% aplicado a fração rica em celulose do PT1, em ausência e presença do FeCl₃

5.3.2. Açúcares redutores liberados durante extração com ácido sulfúrico 2-6% aplicada a fração rica em celulose PT4

Como se pode observar, os valores de ART descritos nas Figuras 26a e 26b, obtidos com a fração rica PT4 por extração com soluções de ácido sulfúrico (2-6%) aumentou a concentração de ART com o transcorrer do tempo, exceto durante as extrações com H₂SO₄ 4 e 6 % (m/v) na quais se observa queda na concentração de ART em 3h. Observou-se que a fração rica em celulose PT4 liberou maior quantidade de ART em presença do FeCl₃ do que na ausência de FeCl₃. A maior concentração de ART obtida da fração rica em celulose PT4 com H₂SO₄ 6 % em

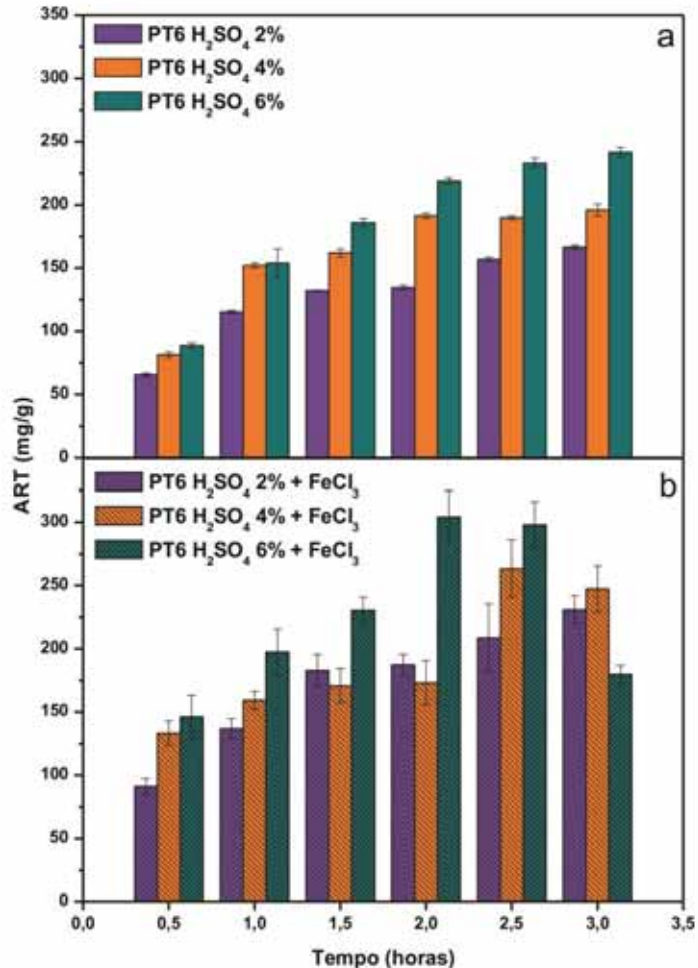
presença 100 mM FeCl_3 foi obtida em 3 horas ($240,17 \pm 6,74$ mg/g) e isto significa um aumento de 18,77 % na concentração de ART do extrato da fração rica em celulose PT4 com H_2SO_4 6 % quando comparado com o extrato da mesma fração em ausência do FeCl_3 ($195,09 \pm 9,39$ mg/g).



Fonte: elaborado pelo autor

Figura 26. Liberação de açúcares redutores por extração com solução de ácido sulfúrico 2-6% aplicadas a fração rica em celulose do PT4, em ausência e presença do FeCl_3

5.3.3. Açúcares redutores liberados durante extração com soluções de ácido sulfúrico 2-6% aplicadas a fração rica em celulose PT6



Fonte: elaborado pelo autor

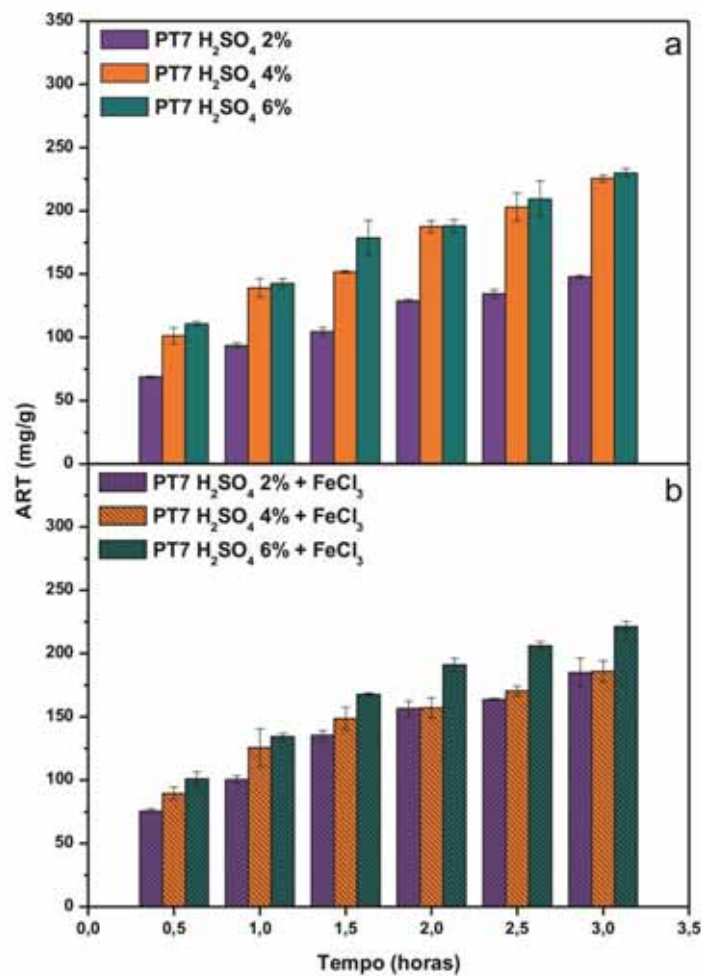
Figura 27. Liberação de açúcares redutores após hidrólise ácida diluída da fração rica em celulose do PT6, em ausência e presença do FeCl₃

A figura 27a e 27b ilustra as concentrações de ART obtidas da extração da fração rica em celulose PT6 com H₂SO₄. Aumentos crescentes de ART com o transcorrer do tempo de extração foram observados, exceto em soluções com H₂SO₄ 4 e 6 % (m/v), nas quais houve queda de ART após 3h, como observado na Figura 27b. Observa-se que na extração em presença de FeCl₃ foram liberados maiores concentrações de ART do que na ausência de FeCl₃.

Como se pode observar na Figura 27a, a maior concentração de ART (241,64 ± 3,62 mg/g) ocorreu quando o fração rica em celulose do PT6 foi hidrolisado com

H₂SO₄ 6 %. Na Figura 27b as maiores quantias de ART foram obtidas após 2 h e 2h 30min utilizando H₂SO₄ 6 % em presença de 100 mM FeCl₃ (304,11 ± 20,65 mg/g) e (298,05 ± 18,01 mg/g) respectivamente. Isto representa aumentos de 27,98 e 21,84 % quando comparados com o hidrolisado em ausência do FeCl₃ (219,03 ± 2,32 mg/g em 2h) e (232,97 ± 3,97 mg/g em 2,5h).

5.3.4. Açúcares redutores liberados durante extração com ácido sulfúrico da fração rica em celulose PT7



Fonte: elaborado pelo autor

Figura 28. Liberação de açúcares redutores totais extraídos com soluções de ácido sulfúrico 2-6% da fração rica em celulose do PT7, em ausência e presença do FeCl₃

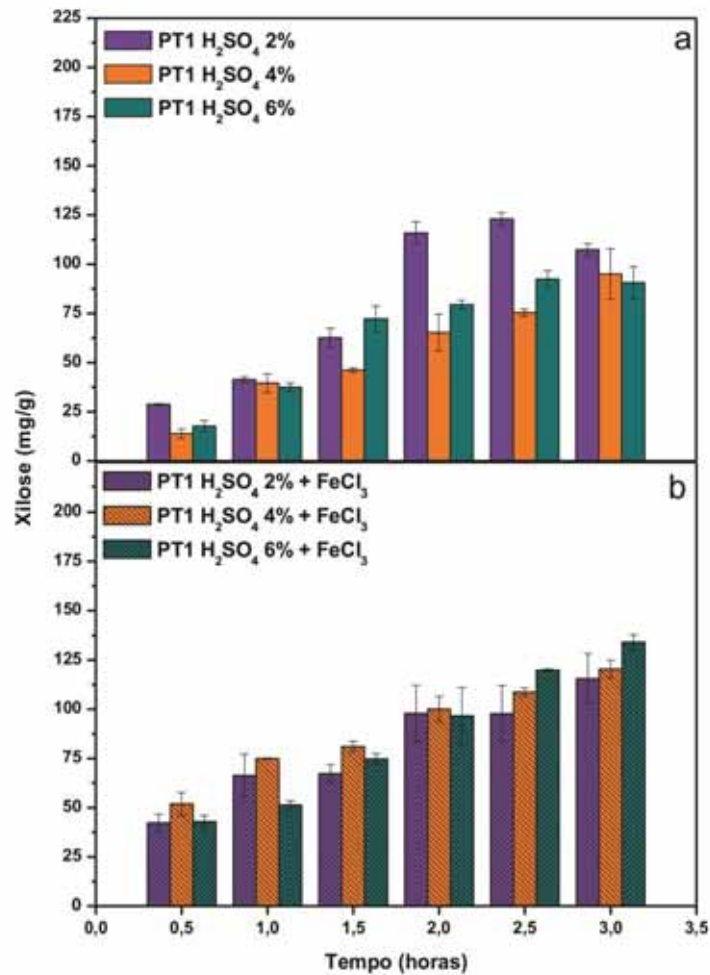
Como se pode observar nas Figuras 28a e 28b, as concentrações de ART extraídas da fração rica em celulose PT7 com soluções de ácido H_2SO_4 levaram a aumentos de ART com o tempo de extração. Em ausência de FeCl_3 , as quantias de ART liberadas não variaram significativamente com a concentração de ácido. Como se pode observar na Figura 28a, as maiores concentrações de ART estão nos extratos obtidos com a fração rica em celulose do PT7 em H_2SO_4 4 e 6 % após 3h ($225,56 \pm 2,92$ mg/g e $229,96 \pm 3,53$ mg/g). Na Figura 28b, as maiores concentrações de ART foram obtidas em 2,5 h ($206,12 \pm 3,44$ mg/g) e 3 h ($221,31 \pm 4,03$ mg/g) para as extrações com H_2SO_4 6 % em presença 100 mM FeCl_3 da fração rica em celulose PT7.

5.4. Liberação de xilose durante extrações com soluções de ácido sulfúrico 2-6% obtidas das frações ricas em celulose (PT1, PT4, PT6 e PT7): efeito do tempo e concentração do ácido sulfúrico diluído em ausência e presença de FeCl_3

Nas extrações com soluções de H_2SO_4 2 %, 4 % e 6 % (m/v), em ausência e presença do FeCl_3 100 mM, foram utilizados quatro frações ricas em celulose (PT1, PT4, PT6 e PT7). A quantificação da xilose foi determinada pela metodologia do floroglucinol em triplicada. Como se pode observar nas Figuras 29, 30, 31 e 32, as concentrações de xilose aumentaram com o tempo de extração. Assim, podemos afirmar que as soluções de ácido sulfúrico 2-6% liberam mais xilose (CARDONA et al, 2010) do que glicose da fração das hemiceluloses. Nas curvas de extração observam-se quedas das concentrações de xilose durante o tempo de extração ácida, o que nos leva a concluir que houve uma reação de decomposição da xilose, formando-se furfural (AGUILAR et al, 2002).

As curvas de extração descritas nas Figuras 29, 30, 31 e 32, vários fatores relacionados ao material pré-tratado (tamanho, forma da partícula, estrutura, acessibilidade de prótons, ligação éter heterocíclico, etc.) afetaram a extração ácida, e isto também foi observado por Cardona et al., (2010).

5.4.1. Xilose liberada por extração com solução 2-6% de ácido sulfúrico da fração rica em celulose PT1



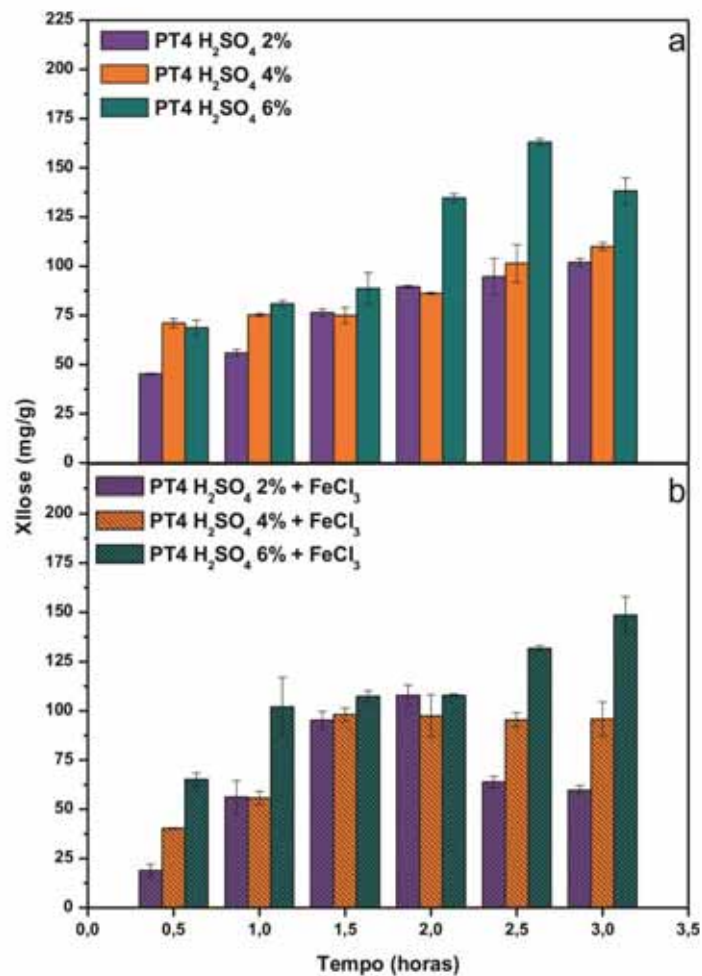
Fonte: elaborado pelo autor

Figura 29. Liberação de xilose por extração com soluções de ácido sulfúrico 2-6% da fração rica em celulose do PT1, em ausência e presença do FeCl₃

Como se pode observar nas Figuras 29a e 29b, as quantias de xilose obtidas da fração rica em celulose do PT1 aumentaram com o tempo, exceto na extração com H₂SO₄ 6 % (m/v) que mostra queda na concentração de xilose com 2h, conforme visto na Figura 29a. Por outro lado, observa-se uma queda na extração da xilose com H₂SO₄ 2 % (m/v) em 3 h. Esta Figura (Figura 29a) mostra a extração de maior quantidade de xilose (122,90 ± 3,24 mg/g) obtida da fração rica em celulose PT1 com H₂SO₄ 2 % com 2,5 h de extração. Na Figura 29b, a maior quantia de

xilose no extrato obtido com H_2SO_4 6% em presença de FeCl_3 100 mM da fração rica em celulose PT1 ($134,00 \pm 3,89$ mg/g) foi obtida com 3 h de extração, que equivale um aumento de 32,38 % quando comparado com o obtido em PT1 na ausência de FeCl_3 ($90,61 \pm 8,04$ mg/g) com 3 h de extração.

5.4.2. Xilose liberada por extração com solução 2-6% de ácido sulfúrico da fração rica em celulose PT4



Fonte: elaborado pelo autor

Figura 30. Liberação de xilose por extração com solução de ácido sulfúrico 2-6% da fração rica em celulose do PT4, em ausência e presença do FeCl_3 .

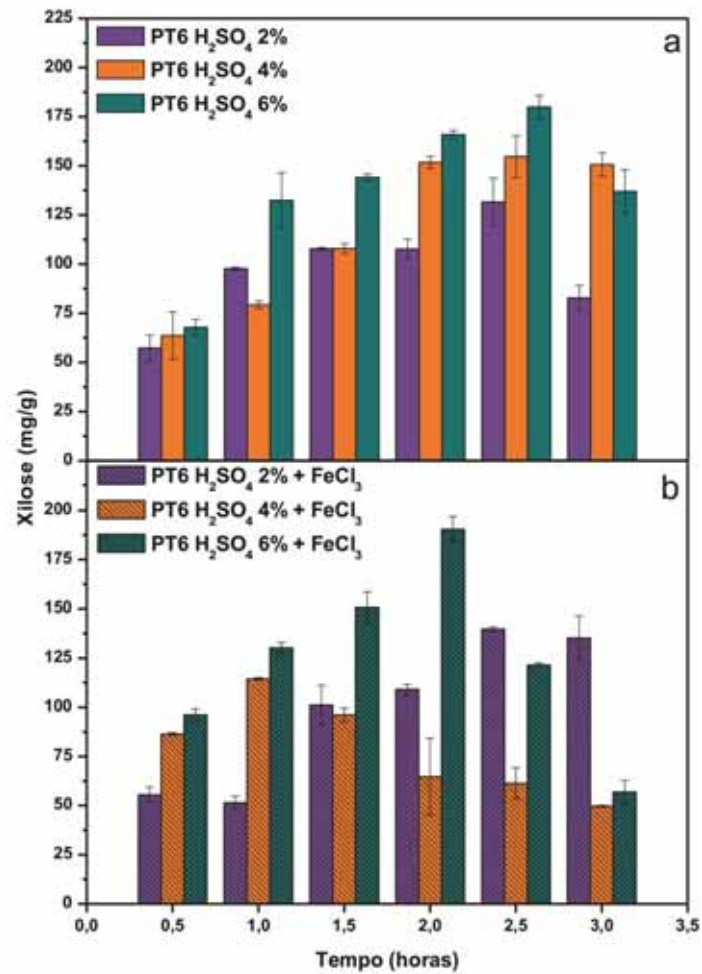
Na Figura 30a e 30b, as quantias de xilose extraídas da fração rica em celulose PT4 variou com o tempo, porém na extração com solução de H_2SO_4 6% (m/v), houve queda na concentração de xilose em 3h, conforme visto na Figura 30a. O

mesmo foi observado (Figura 30b) quando a extração foi realizada com solução de H_2SO_4 2% (m/v) com 2h de tratamento. A Figura 30a mostra a maior concentração de xilose ($163,03 \pm 1,86$ mg/g) formada durante as extrações feita com a fração rica em celulose PT4 com H_2SO_4 6 %, onde ocorre um valor máximo em 2 h30 min de extração. Na Figura 30b, a maior quantidade de xilose foi obtida com a fração PT4 ($148,66 \pm 9,39$ mg/g) em H_2SO_4 6 % e na presença de FeCl_3 100 mM após 3h. O extrato obtido com H_2SO_4 6% em ausência de FeCl_3 forneceu uma quantidade menor de xilose utilizando a fração PT4 ($138,30 \pm 6,56$ mg/g).

5.4.3. Xilose liberada por extração com solução 2-6% de ácido sulfúrico da fração rica em celulose PT6

Como se pode observar na Figura 31a e 31b, a quantia de xilose dos extratos obtidos com H_2SO_4 2 e 6 % (m/v) da fração rica em celulose PT6 aumentou com o tempo, porém, a Figura 31a mostra queda na quantia de xilose extraída em 3h, durante a extração com H_2SO_4 6 % (m/v) em ausência de FeCl_3 , enquanto que em presença de FeCl_3 (Figura 31b), a queda ocorreu em 2h30 min.

Na Figura 31a, a maior concentração de xilose ($179,90 \pm 5,89$ mg/g) resultou da extração aplicada a PT6 com H_2SO_4 6 % com 2h30 min. Na Figura 31b, a maior concentração de xilose foi obtida às 2 h com H_2SO_4 6 % em presença de FeCl_3 100 mM ($190,44 \pm 6,55$ mg/g) que equivale a um aumento de 12,89 % quando comparado com a concentração de xilose extraída em 2 h com ausência de FeCl_3 ($165,90 \pm 2,09$ mg/g).



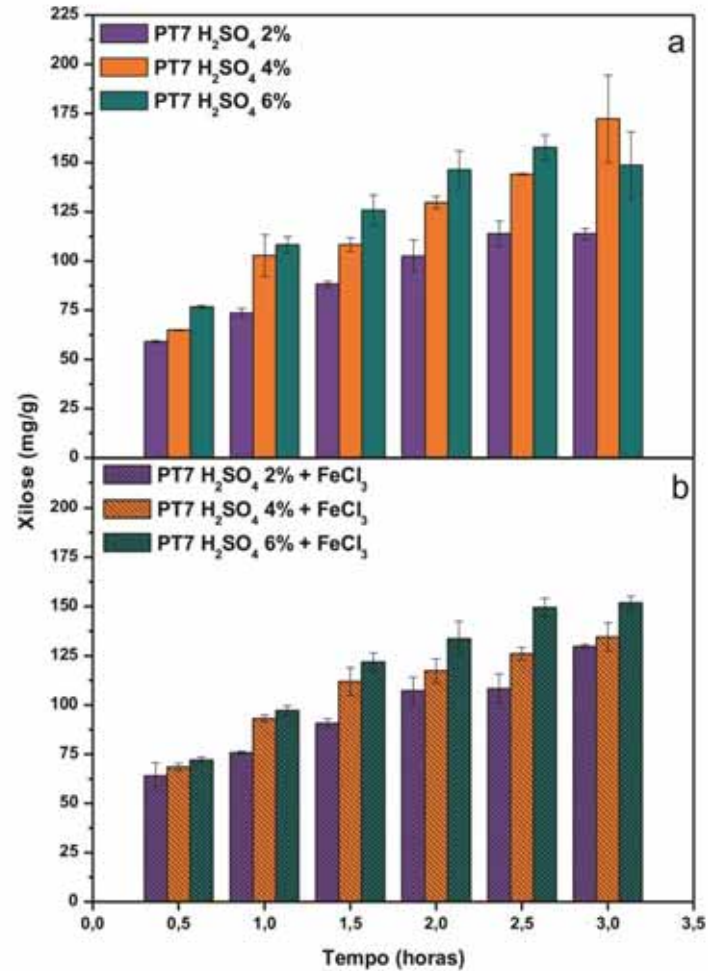
Fonte: elaborado pelo autor

Figura 31. Liberação de xilose por extração com solução de ácido sulfúrico 2-6% da fração rica em celulose do PT6, em ausência e presença do FeCl₃

5.4.4. Xilose liberada por extração com solução 2-6% de ácido sulfúrico da fração rica em celulose PT7

Conforme representa a Figura 32a e 32b, a fração rica em celulose PT7 foi extraída com soluções 2-6% de ácido sulfúrico e aumentos na quantidade de xilose extraída foram observados com o tempo de extração. Como se pode observar na Figura 32a, a maior quantidade de xilose extraída ($172,26 \pm 22,09$ mg/g) foi obtida com H₂SO₄ 4 % em 3 h. Na Figura 32b, as maiores concentrações de xilose foram obtidas em 2h30min e em 3 h em solução de H₂SO₄ 6 % contendo FeCl₃ 100mM ($149,56 \pm 4,68$ mg/g e $151,93 \pm 3,39$ mg/g respectivamente), o que equivale a

extração de $157,63 \pm 6,27$ mg/g de xilose em ausência do FeCl_3 em 2h30min e $148,70 \pm 16,87$ mg/g em 3 h.



Fonte: elaborado pelo autor

Figura 32. Liberação de xilose por extração com solução de ácido sulfúrico 2-6% da fração rica em celulose do PT7, em ausência e presença do FeCl_3

5.5. Formação de fenóis durante a extração das frações rica em celulose (PT1, PT4, PT6 e PT7): efeito do tempo, concentração de ácido sulfúrico ausência e presença de FeCl₃

Para determinar a quantidade de fenóis totais nos extratos obtidos com H₂SO₄ 2 % - 6 %(m/v), em presença e ausência FeCl₃ 100 mM, foram utilizadas frações ricas em celulose selecionadas (PT1, PT4, PT6 e PT7), utilizando-se o método espectrofotométrico baseado no uso do reagente de Folin-Ciocalteu's.

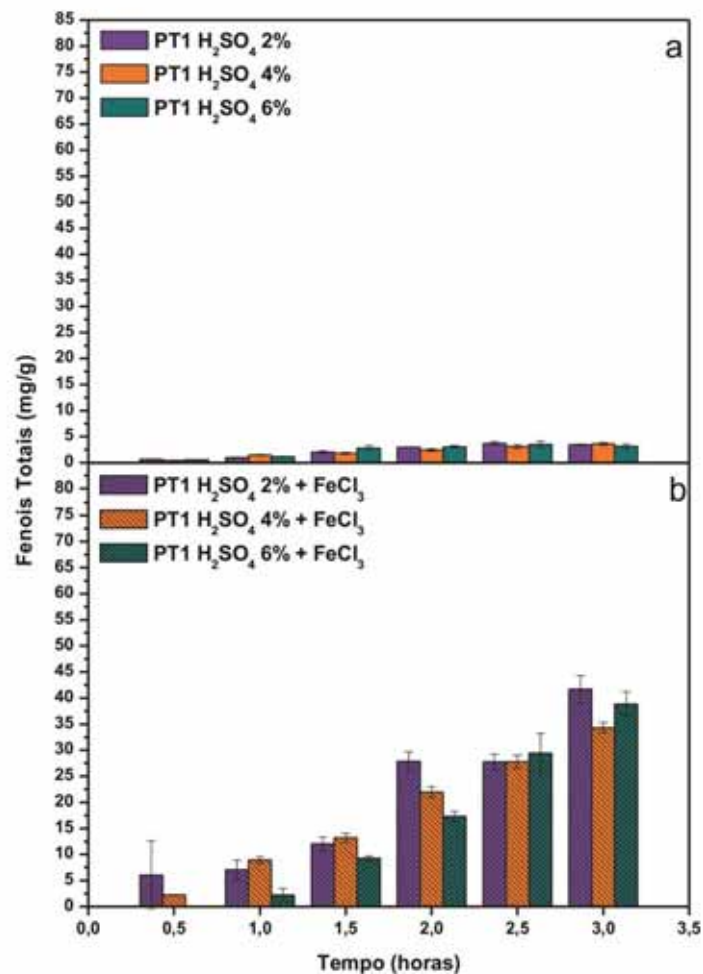
As Figuras 33, 34, 35 e 36, demonstram as concentrações de fenóis totais com aumentos do tempo das extrações ácida em presença de FeCl₃ em todos os casos. Estes aumentos de fenóis totais aconteceram porque a lignina presente nas frações ricas em celulose foram liberadas como lignina solúvel durante as extrações co-catalisada com FeCl₃ (SAKDARONNARONG e JONGLERTJUNYA, 2012). Nessa perspectiva, para que se tornasse possível a sua utilização na fermentação para produzir etanol 2G, seria necessário utilizar os hidrolisados com menos formação de fenóis totais, de forma que se pudesse evitar inibição da fermentação por parte das leveduras. (JÖNSSON et al, 2013). Além disso, é necessário eliminar o FeCl₃ dos extratos neutralizado mediante a utilização de resina de troca iônica e eliminar os fenóis totais com aplicação de carvão ativo ou resina de troca iônica (NÁPOLES et al., 2006), como uma etapa prévia do processo de fermentação que para a produção do etanol quanto de xilitol.

Os extratos das frações ricas em celulose obtidas com hidrólise com H₂SO₄ em ausência de FeCl₃ formaram as menores concentração de fenóis totais (Figuras 33, 34, 35 e 36). O contrário foi observado com os extratos obtidos em presença de FeCl₃ e ácido sulfúrico. Nas frações ricas em celulose extraídas com H₂SO₄ em presença de FeCl₃, a decomposição da lignina formou maior quantidade de fenóis totais.

5.5.1. Fenóis totais formados por extração com ácido sulfúrico 2-6% da fração rica em celulose PT1

Como se pode observar na Figura 33b, a fração rica em celulose PT1 mostrou aumentos com o tempo de extração com ácido sulfúrico 2-6%. As concentrações de fenóis totais são maiores quando as frações ricas em celulose foram submetidas a

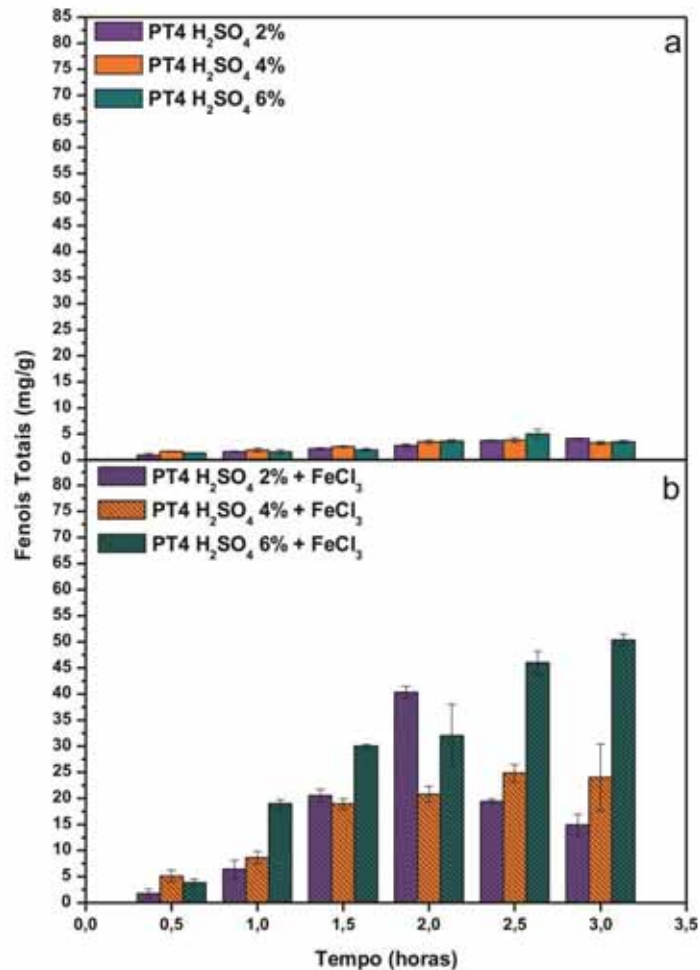
extrações em presença de FeCl_3 . As concentrações maiores de fenóis totais foram obtidas com a fração PT1 no ponto de 3 h de extração. As maiores concentrações de fenóis totais obtidas com a hidrólise da fração rica em celulose do PT1 não apresentaram diferença significativa no período de 2h30min e 3h conforme mostra a Figura 33a. Portanto, o tempo de reação contribui para maior liberação de fenóis, assim como a presença de FeCl_3 .



Fonte: elaborado pelo autor

Figura 33. Formação de fenóis totais por extração com ácido sulfúrico 2-6% da fração rica em celulose da hidrólise ácida diluída do PT1, em ausência e presença do FeCl_3

5.5.2. Fenóis totais formados por extração com ácido sulfúrico 2-6% da fração rica em celulose PT4



Fonte: elaborado pelo autor

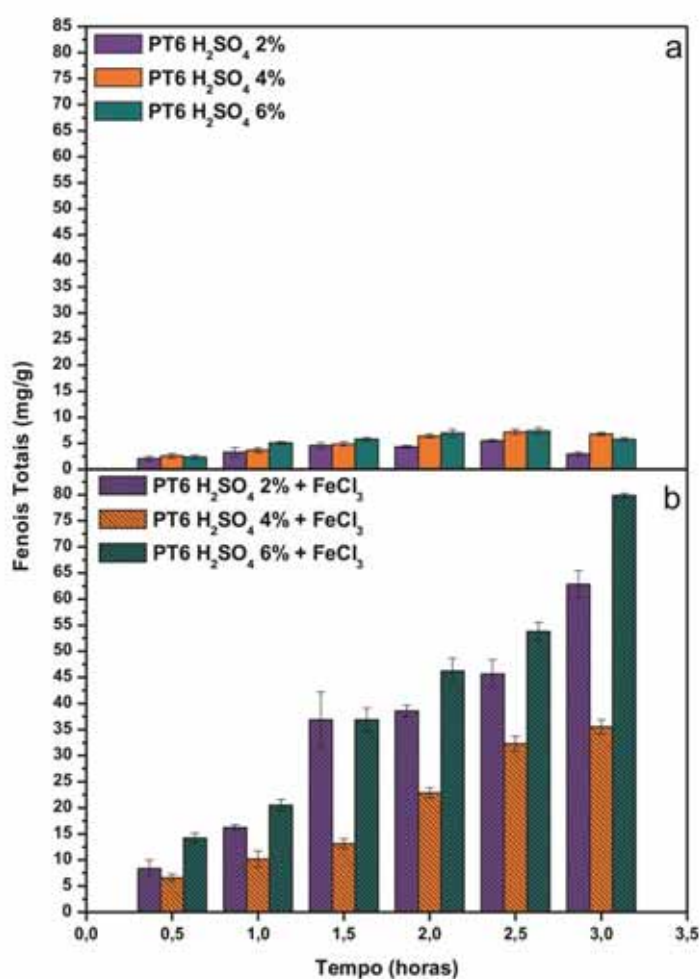
Figura 34. Formação de fenóis totais por extração com ácido sulfúrico 2-6% da fração rica em celulose do PT4, em ausência e presença do FeCl₃.

Como mostra a Figura 34a, a fração rica em celulose do PT4 mostrou um aumento com o tempo na formação de fenóis, mas em H₂SO₄ 4 e 6 % (m/v), observa-se uma queda na concentração de fenóis totais às de 3h. Em presença do FeCl₃ na solução de H₂SO₄ 2 % (m/v) também ocorreu queda em fenóis em 2h30min (Figura 34b). A maior quantidade de fenóis totais foi detectada com PT4 em ácido sulfúrico 6 % (m/v) em presença de FeCl₃ (50,38 ± 1,06 mg/g) com 3 h de extração (Figura 34b). Nesse sentido, a concentração dos fenóis totais desta fração rica em

celulose aumentou em 93,05 %, quando comparado com o extrato obtido em ausência de FeCl_3 com 3h ($3,50 \pm 0,27 \text{ mg/g}$).

Na presença de FeCl_3 , ocorreu aumento na formação de fenóis com a utilização de menor concentração de ácido até um período de reação de 2h, sendo que, após esse tempo, a curva passou a apresentar valores decrescentes de fenóis.

5.5.3. Fenóis totais formados por extração com ácido sulfúrico 2-6% da fração rica em celulose PT6



Fonte: elaborado pelo autor

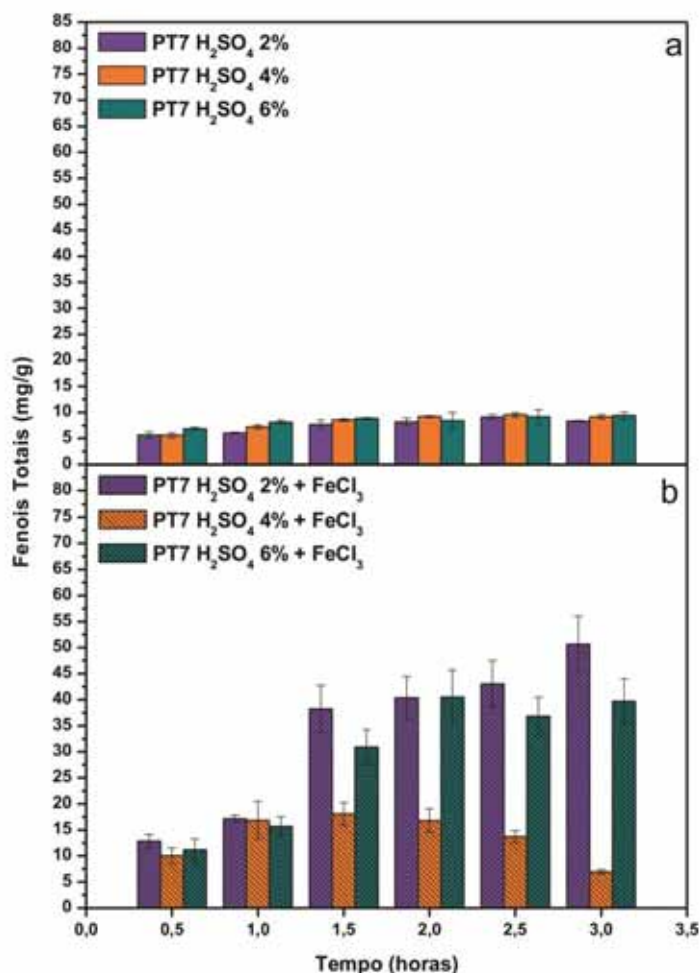
Figura 35. Formação de fenóis totais por extração com ácido sulfúrico 2-6% da fração rica em celulose do PT6, em ausência e presença do FeCl_3 .

Como mostra Figuras 35a e 35b das frações ricas de celulose do PT6, os fenóis formados aumentaram com o tempo de reação, mas no caso da fração rica

em celulose do PT6 a extração com ácido H_2SO_4 2 e 6% (m/v), mostrou decréscimos acima de 3 h em ausência de FeCl_3 (Figura 35a). As quantidades de fenóis formadas em ausência de FeCl_3 foram muito baixas (Figura 35a). A maior quantidade de fenóis foi obtida com o ácido H_2SO_4 6% (m/v) em 3h e na presença de FeCl_3 ($79,89 \pm 0,39$ mg/g), conforme mostra a Figura 35b, equivalente a um aumento de 92,78% quando comparado com o valor obtido em ausência de FeCl_3 . Em ausência de FeCl_3 obteve-se $5,77 \pm 0,39$ mg/g em 3h. A presença de FeCl_3 favoreceu a liberação de fenóis totais, com o aumento da concentração de ácido e tempo de extração.

5.5.4. Fenóis totais formados por extração com ácido sulfúrico 2-6% da fração rica em celulose PT7

As Figuras 36a e 36b, mostram aumentos na quantidade de fenóis extraído da fração PT7 com soluções de ácido sulfúrico (2, 4 e 6 % m/v) sendo valores constantes de fenóis totais observados a partir de 1h30min. A quantidades de fenóis totais obtidas em ausência do FeCl_3 foram muito menores do que na presença do FeCl_3 como mostra a Figura 36. A Figura 36b demonstra que a maior concentração de fenóis totais foi obtida com H_2SO_4 2 % (m/v) em 3 h em presença de FeCl_3 ($50,68 \pm 5,31$ mg/g) o que equivale 83,56 %, quando comparado com o obtido com ausência de fenóis totais ($8,33 \pm 0,11$ mg/g).



Fonte: elaborado pelo autor

Figura 36. Formação de fenóis totais por extração com solução de ácido sulfúrico 2-6% da fração PT7, em ausência e presença do FeCl₃

A presença de íon férrico favorece a formação de fenóis totais, enquanto que a ausência do FeCl₃ reduz a formação de fenóis totais.

5.6. Formação de furanos durante a extração das frações rica em celulose (PT1, PT4, PT6 e PT7): efeito do tempo, concentração de ácido sulfúrico ausência e presença de FeCl₃

Os furanos são inibidores da fermentação de açúcares monoméricos para obter etanol 2G, e devem ser removidos antes da fermentação (HU et al, 2010). Eles inibem o crescimento da levedura e diminuem o rendimento de etanol e a

produtividade desse biocombustível (JÖNSSON et al, 2013). Estes inibidores podem ser retirados mediante a purificação dos hidrolisados com carvão ativo ou resina de troca iônica (NÁPOLES et al., 2006).

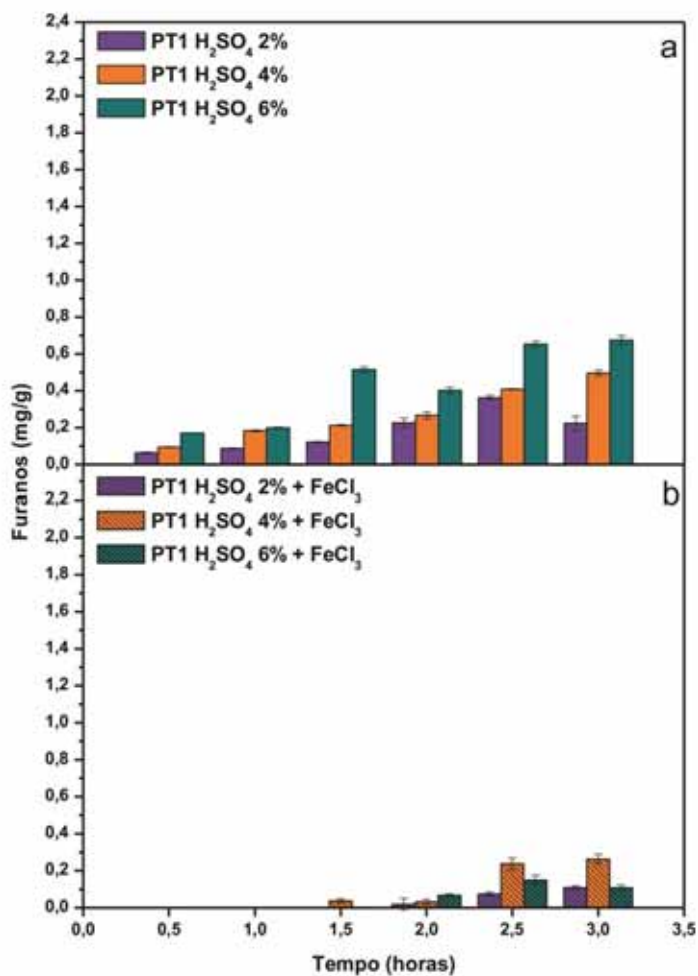
As Figuras 37, 38, 39 e 40 mostram as concentrações de furanos em função do tempo de hidrólise (PT1, PT4, PT6 e PT7) em soluções de H_2SO_4 (2 %, 4 % e 6 % , m/v), em presença e ausência do FeCl_3 100 mM. A quantificação foi determinada com o uso da metodologia descrita por Martinez et al. (2000).

As Figuras 37, 38, 39 e 40 mostram aumentos crescentes nas quantidades de furano formados durante as extrações com as soluções de ácido sulfúrico em ausência e presença de FeCl_3 , onde obteve-se quantidades maiores de furanos na ausência do que na presença do FeCl_3 durante as extrações ácidas. Como se sabe, a geração de furanos resulta da degradação de pentoses e hexoses, sendo que a maior parte desta degradação provém da xilose (AGUILAR et al, 2002, JÖNSSON et al, 2013). A diminuição de furanos na hidrólise com co-catalisador possivelmente é devido a degradação deste em ácido fórmico e levulínico (JÖNSSON et al, 2013).

5.6.1. Furanos formados durante extração com ácido sulfúrico 2-6% da fração rica em celulose PT1

Como mostram as Figuras 37a e 37b, houve aumentos crescentes nas quantidades de furanos formados durante a extração com ácido sulfúrico (2%-6%) da fração PT1. No entanto, com H_2SO_4 2 % (m/v) ocorreu decréscimo de furanos em 3 h. Outro decréscimo foi observado em 3h com H_2SO_4 6 % (m/v) e na presença de FeCl_3

A Figura 37a mostra que as maiores concentrações de furanos são encontradas nos extratos obtidos com ácido H_2SO_4 6 % (m/v) em 2h30 min ($0,65 \pm 0,02$ mg /g) com 3 h na ausência de FeCl_3 ($0,67 \pm 0,02$ mg/g), o que equivale a aumentos de 76,92 % e 83,58 % nos dois respectivos tempos, quando comparados com os furanos formados em presença de FeCl_3 , ou seja, $0,15 \pm 0,02$ mg/g formados em 2h30min e $0,11 \pm 0,02$ mg/g formados em 3 h. A presença de FeCl_3 diminuiu consideravelmente a formação de furanos.



Fonte: elaborado pelo autor

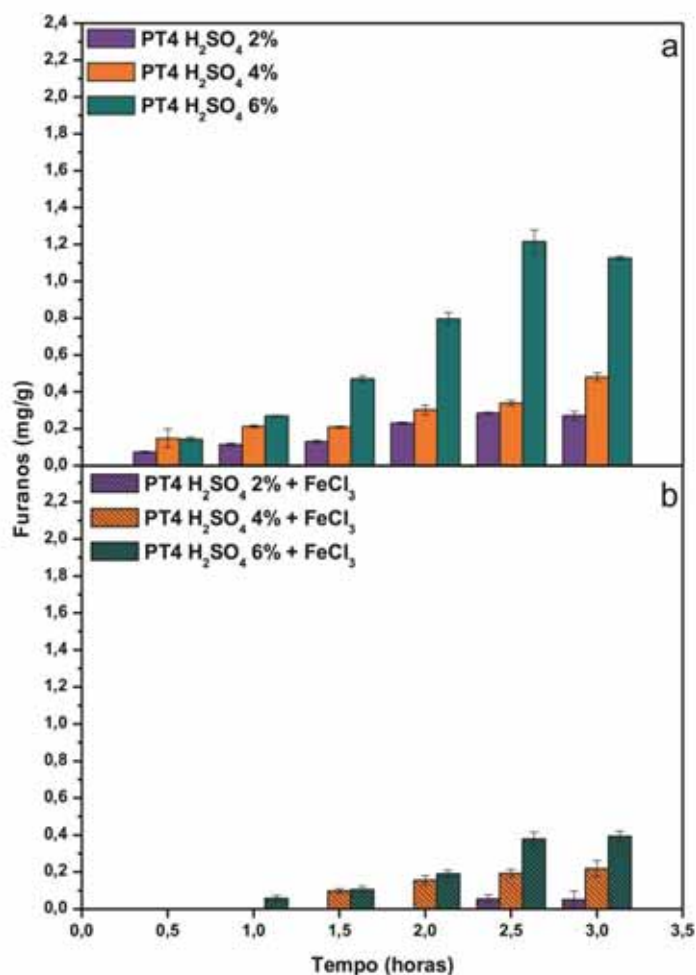
Figura 37. Formação de furanos totais por extração com ácido sulfúrico 2-6% da fração PT1, em ausência e presença do FeCl₃

Diferentemente dos outros pré-tratamentos, neste caso o favorecimento da formação de furanos ocorreu ao longo do tempo, mas apenas em ácido sulfúrico 4% na presença de FeCl₃.

5.6.2. Furanos formados durante extração com ácido sulfúrico 2-6% da fração rica em celulose PT4

As Figuras 38a e 38b, mostram a formação de fenóis durante as extrações da fração PT4 por soluções de ácido sulfúrico (2%-6%). Houve aumentos nas quantidades de furanos com o tempo de extração, porém em ácido sulfúrico 6% observa-se diminuição dos furanos no tempo de 3h

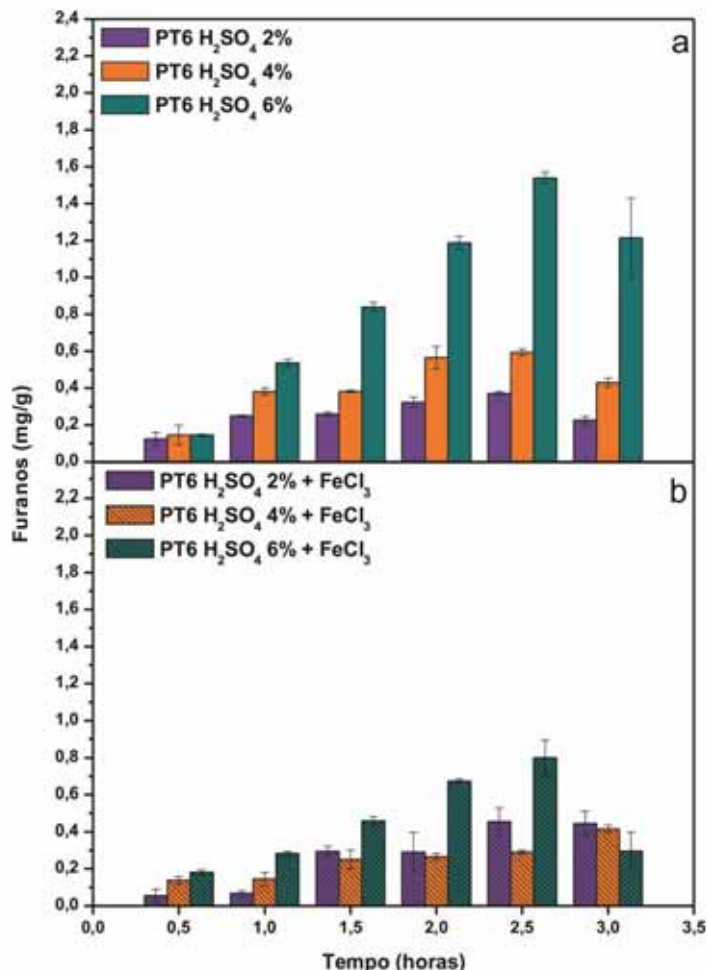
A Figura 38a mostra que a maior concentração de furanos foi detectada no hidrolisado com H_2SO_4 6 % após 2h30 min em ausência de FeCl_3 ($1,22 \pm 0,06$ mg/g) o que equivale a um rendimento de 68,03 % comparado com o rendimento obtido em 2h30 min na presença de FeCl_3 ($0,39 \pm 0,03$ mg/g).



Fonte: elaborado pelo autor

Figura 38. Formação de furanos totais por extração com ácido sulfúrico 2-6% da fração PT4, em ausência e presença do FeCl_3

5.6.3. Furanos formados durante extração com ácido sulfúrico 2-6% da fração rica em celulose PT6



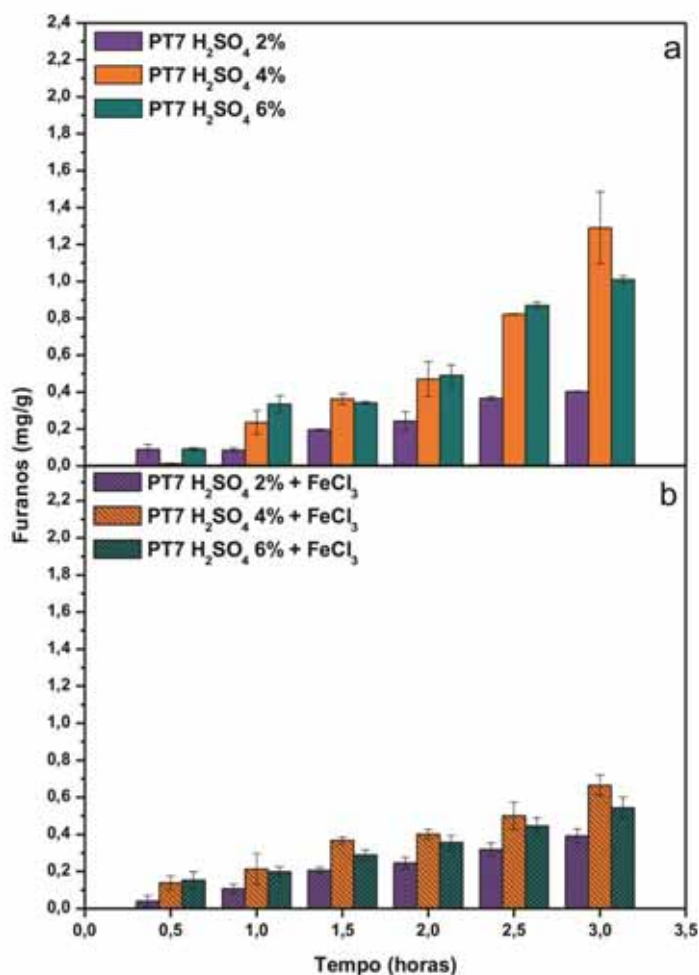
Fonte: elaborado pelo autor

Figura 39. Formação de furanos totais por extração com ácido sulfúrico 2-6% da fração PT6, em ausência e presença do FeCl₃

As Figuras 39a e 39b, mostram a formação de furanos durante as extrações da fração PT6 por soluções de ácido sulfúrico (2%-6%). Houve aumentos nas quantidades dos furanos com o tempo de extração, porém em ácido sulfúrico 2,4 e 6% observa-se diminuição dos furanos no tempo de 3h

A Figura 39a mostra que a maior concentração dos furanos foi detectada no hidrolisado com H₂SO₄ 6 % após 2h30 min em ausência de FeCl₃ (1,54 ± 0,03 mg/g) o que equivale a um rendimento de 48,05 % comparado com o rendimento obtido em 2h30 min na presença de FeCl₃ (0,80 ± 0,10 mg/g).

5.6.4. Furanos formados durante extração com ácido sulfúrico 2-6% da fração rica em celulose PT7



Fonte: elaborado pelo autor

Figura 40. Formação de furanos totais por extração com solução de ácido sulfúrico 2-6% da fração PT7, em ausência e presença do FeCl₃

As Figuras 40a e 40b, mostram que os furanos formados a partir da fração rica da celulose do PT7 aumentam com o tempo de extração. Conforme mostra a Figura 40a, a maior quantia de furanos ($1,29 \pm 0,20$ mg/g) foi obtida após 3h de extração ácida (4%) em ausência de FeCl₃, representando um aumento no rendimento de 48,06 % comparado com a extração em presença de FeCl₃ após 3 h ($0,67 \pm 0,06$ mg/g).

5.7. Liberação dos açúcares redutores xilose, glicose e formação de fenóis totais e furanos: efeito do tempo e hidrólise ácida concentrada da fração rica em celulose, em ausência e presença de FeCl₃

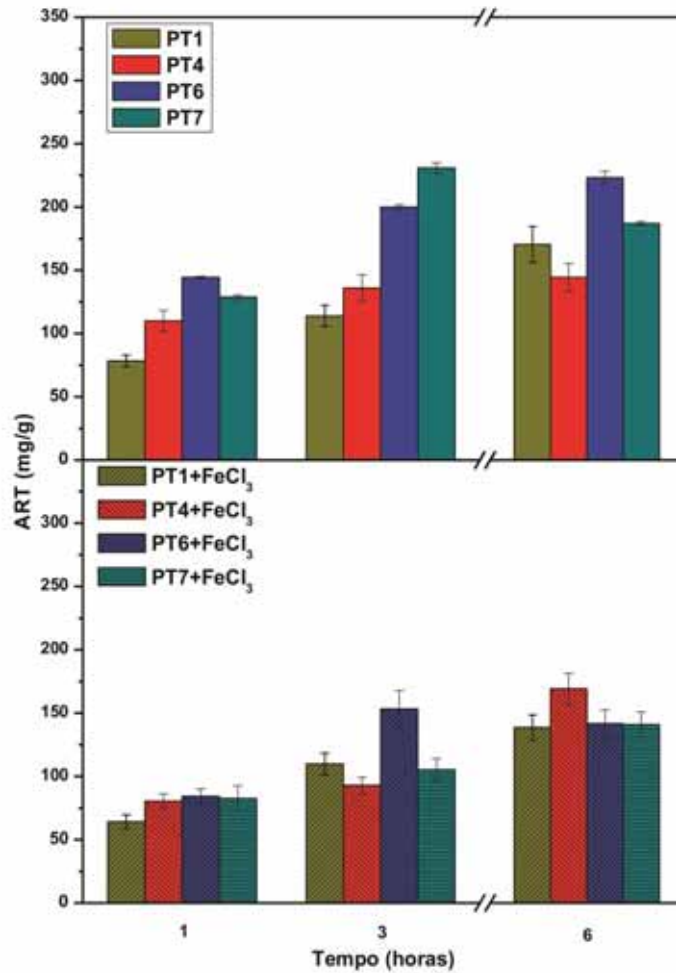
Neste presente trabalho, a hidrólise ácida com H₂SO₄ 30 % (m/v) do fração rica em celulose dos pré-tratamentos 1, 4, 6 e 7 em ausência e presença de 100 mM FeCl₃ foram realizadas em banho Maria a 80 °C.

5.7.1. Liberação de açúcares totais durante as extrações com ácido sulfúrico 30% (m/v) das frações rica em celulose (PT1, PT4, PT6 e PT7).

As Figuras 41a e 41b, mostram as quantias de ART extraídas das frações selecionadas ricas em celulose (PT1, PT4, PT6 e PT7) com H₂SO₄ 30 % (m/v) aumentaram com o tempo em ausência de FeCl₃. No entanto, a fração PT7 mostra diminuição em ART após de 3 h Enquanto a fração PT6 com H₂SO₄ 30 % (m/v) mostra decréscimo em 3 h na presença de FeCl₃. As maiores quantidades de ART foram extraídas da fração rica PT7 (230,92 ± 4,04 mg/g) com H₂SO₄ 30 % após 3 h, e da PT6 com H₂SO₄ 30 % após 6 h (223,28 ± 4,93 mg/g), conforme ilustrado na Figura 41. Estes aumentos em ART equivalem a aumentos em rendimento da ordem de 54,43% e 36,51% nos dois respectivos tempos, quando comparados com ART em presença de FeCl₃, ou seja, quando comparados a valores de 105,24 ± 8,94 mg/g obtidos com PT7 após 3h e 141,75 ± 10,67 mg/g com PT6 após 6h. O maior ART foi obtido no extrato da fração PT4 após 6 h (144,51 ± 10,87 mg/g), como mostra a Figura 41a. Comparando-se a quantia máxima de ART obtida com a fração PT7 após 3 h (230,92 ± 4,04 mg/g) com a extração com sulfúrico 6% (304,11 ± 20,65 mg/g) PT6 com H₂SO₄ 6 % após 2 h de extração em presença de FeCl₃ (Figura 41b), observando-se que ocorrem diferença significativa.

A presença de FeCl₃ teve menor concentração de ART dos extratos da fração rica (PT1, PT4, PT6 e PT7) do que a ausência do FeCl₃. Este resultado é contrário ao resultado reportado por SCHUCHARDT e DUARTE (1986). Estes pesquisadores submetem a holocelulose (celulose + hemicelulose) do BCA a ação de soluções de HCl 37 % (m/v) contendo LiCl 80 mM, ZnCl₂ e FeCl₃ o qual resultou numa

obtenção de melhores rendimentos sem diferenças significativas tanto em ausência quanto em presença FeCl_3 . No trabalho destes autores, os tempos de extração foram maiores, a concentração do ácido e da temperatura utilizada foi diferente e a extração do ART atingiu valor da ordem de 612 mg/g em presença de LiCl .

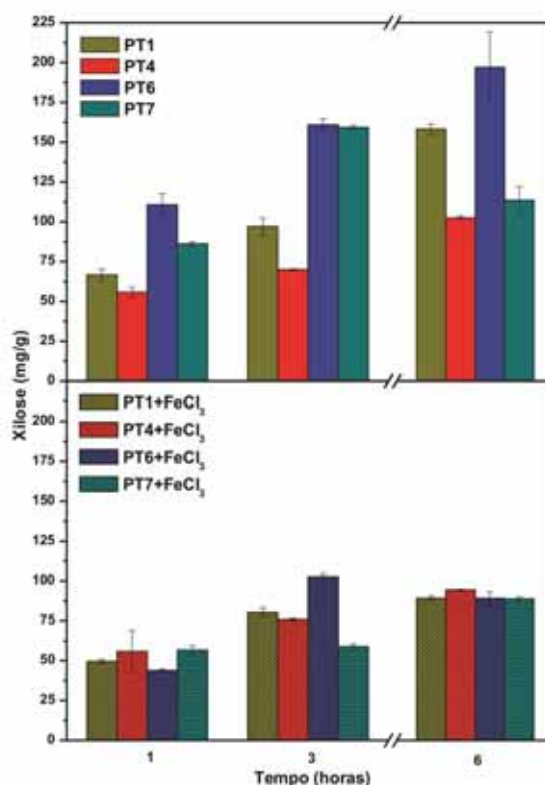


Fonte: elaborado pelo autor

Figura 41. Liberação de açúcares redutores totais após extração dos açúcares redutores totais das frações ricas em celulose (PT1, PT4, PT6 e PT7), com ácido sulfúrico 30% em ausência e presença do FeCl_3

5.7.2. Liberação da xilose durante as extrações com ácido sulfúrico 30% (m/v) das frações ricas em celulose (PT1, PT4, PT6 e PT7)

As Figuras 42a e 42b, mostram as quantias de xilose extraídas das frações ricas em celulose (PT1, P 4, PT6 e PT7) com H₂SO₄ 30 % (m/v). Observa-se aumentos na concentração de xilose, exceto no caso da fração PT6 em presença de FeCl₃, onde se observa uma queda na concentração de xilose com 6 h. A maior concentração de xilose foi obtida com o extrato da fração rica PT6 após 6 h (196, 98 ± 22,10 mg/g), conforme mostra a Figura 42a, o que representa concentração de xilose 54,76 % mais elevada do que a obtida a partir da mesma fração PT6 em presença do FeCl₃ após 6 h (89,11 ± 4,08 mg/g).



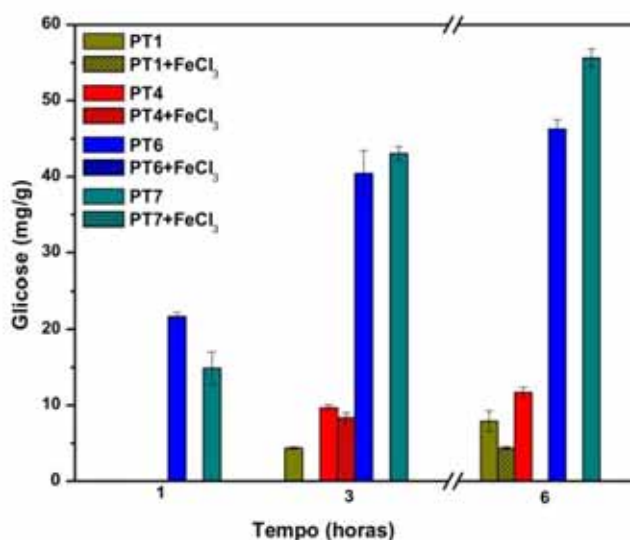
Fonte: elaborado pelo autor

Figura 42. Liberação da xilose durante as extrações com ácido sulfúrico 30% aplicadas as frações ricas em celulose (PT1, PT4, PT6 e PT7), em ausência e presença do FeCl₃

As concentrações de xilose não apresentaram diferenças significativas nos extratos obtidos com H₂SO₄ 30% das frações rica em celulose PT6 e PT7 após 3 h, bem como da fração PT1 após 6 h, como mostra a Figura 42a. Comparando-se as concentrações máximas de xilose detectadas no extrato obtido da fração rica em

celulose do PT6 após 6h ($196,98 \pm 22,10$ mg/g) com a xilose do extrato obtido com ácido sulfúrico 6% ($190,44 \pm 6,55$ mg/g) após 2 h em presença de FeCl_3 (Figura 26b) não se observa diferenças significativas.

5.7.3. Liberação da glicose durante as extrações com ácido sulfúrico 30% (m/v) das frações ricas em celulose (PT1, PT4, PT6 e PT7)



Fonte: elaborado pelo autor

Figura 43. Liberação da glicose durante as extrações com ácido sulfúrico 30% aplicadas as frações ricas em celulose (PT1, PT4, PT6 e PT7), em ausência e presença do FeCl_3

A Figura 43, mostra as concentrações de glicose nos extratos obtidos com H_2SO_4 30% (m/v) das frações ricas de celulose (PT1, PT4, PT6 e PT7) na qual aprecem aumentos da concentração com o tempo de extração em ausência de FeCl_3 . Cabe destacar que os extratos de duas frações ricas em celulose PT1 e PT4, não apresentam concentrações de glicose até 1h de extração. As maiores concentrações de glicose foram obtidas às 6 h de hidrólise ácida concentrada ($7,89 \pm 1,34$ mg/g) e ($11,66 \pm 0,68$ mg/g), respectivamente. As maiores concentrações de glicose nos pré-tratamentos hidrolisados foram obtidas nas frações ricas em celulose do PT6 ($46,25 \pm 1,23$ mg/g) e do PT7 ($55,62 \pm 1,21$ mg/g), após 6h de extração.

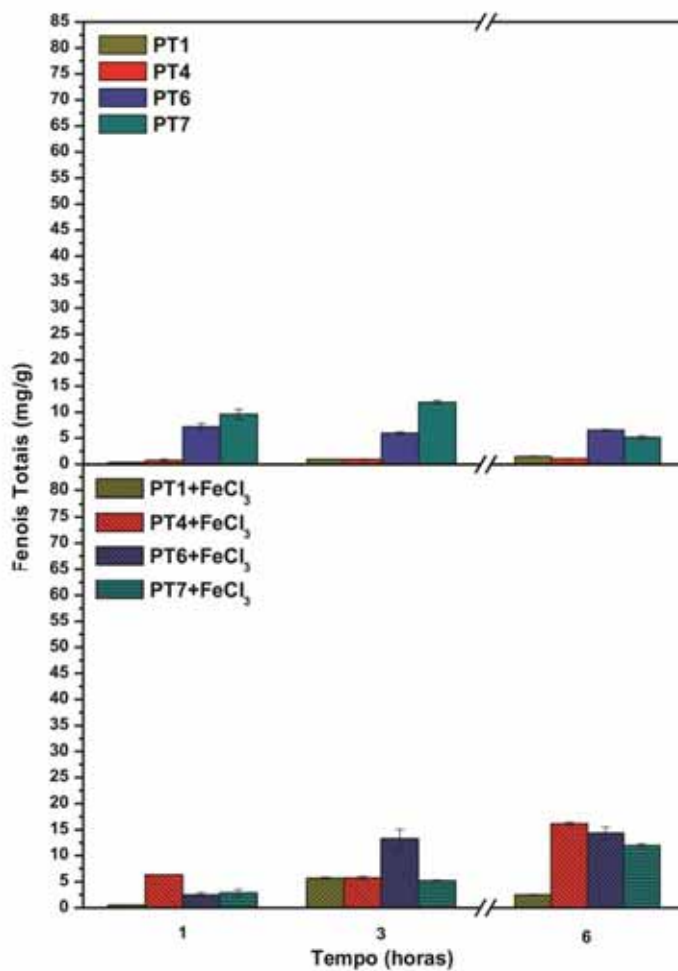
Como previsto, as concentrações de glicose, possivelmente provenientes da fração hemicelulósica, foram pequenas (AGUILAR et al, 2002). O FeCl_3 exerceu pouca influência sobre a extração de glicose das frações ricas PT1 após 6h e PT4 após 3 horas.

5.7.4. Formação de fenóis durante as extrações com ácido sulfúrico 30% (m/v) das frações rica em celulose (PT1, PT4, PT6 e PT7)

As Figuras 44a e 44b, mostram as quantias de fenóis formados durante as extrações H_2SO_4 30% (m/v) aplicadas as quatro frações ricas em celulose (PT1, PT4, PT6 e PT7). As quantias de fenóis aumentaram com o tempo de extração em ausência e presença de FeCl_3 , exceto no caso da fração PT7 com a qual se observou queda na concentração de fenóis após 6 h. Durante a extração com a fração rica em celulose PT1 em presença de FeCl_3 se observa uma queda na concentração de fenóis totais após 6 h.

A maior concentração de fenóis totais foi obtida com o extrato da fração PT7 após 3 h ($11,92 \pm 0,36$ mg/g), conforme mostra a Figura 44a. As maiores concentrações de fenóis totais foram detectadas nos extratos das fração ricas PT4 e do PT6 em presença de FeCl_3 após 6 h ($16,8 \pm 0,22$ mg/g e $14,37 \pm 1,13$ mg/g), conforme retrata a Figura 44b, que indica as concentrações de fenóis totais de 93,88% para PT4 e 54,41 % para PT6 quando comparados as quantidades de furanos dos mesmo extratos PT4 ($1,03 \pm 0,03$ mg/g) e PT6 ($6,55 \pm 0,12$ mg/g) após 6 h.

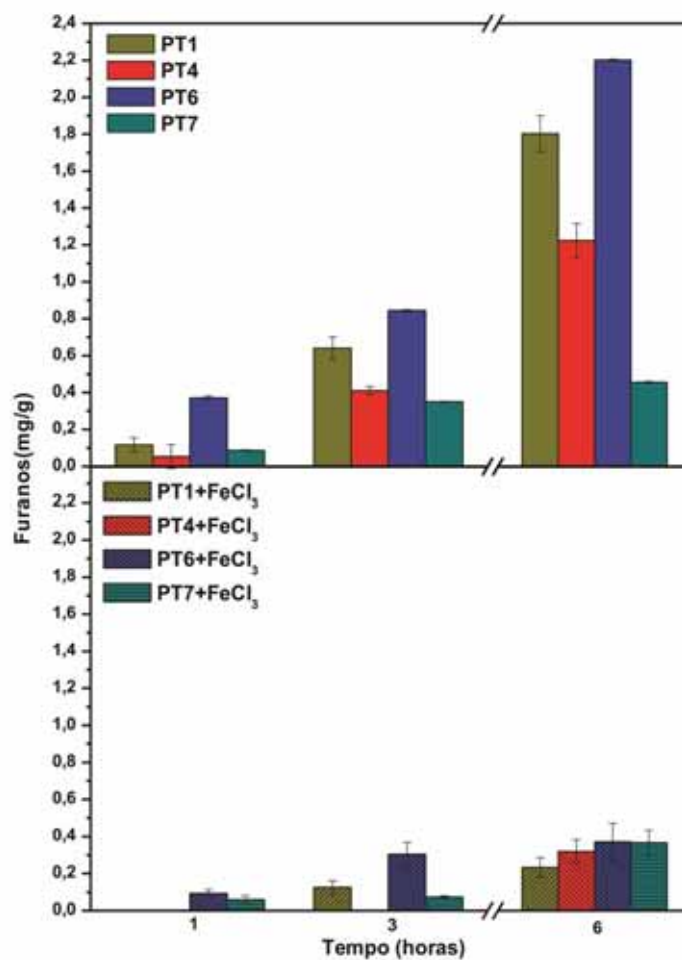
Uma explicação para as diferentes concentrações de fenóis totais obtidos após 1 hora de extração das quatro frações ricas (PT1, PT4, PT6 e PT7) poderia estar relacionada com o conteúdo de lignina desta fração rica em celulose, porém a liberação do heteropolímero amorfo em forma de compostos fenólicos vai depender das ligações covalentes aos polissacarídeos através de ligações ésteres, e entre outros componentes da lignina por ligações éster e éter (XU et al, 2005), quando modificadas pelos diferentes pré-tratamentos oxidativos com, NaOH, H_2O_2 alcalino, observado na Figura 48 nas modificações relativas aos diversos picos nas bandas mostrados nestas frações ricas.



Fonte: elaborado pelo autor

Figura 44. Formação de fenóis durante as extrações com ácido sulfúrico 30% aplicadas as fração rica em celulose das quatro frações selecionadas (PT1, PT4, PT6 e PT7), em ausência e presença do FeCl₃

5.7.5. Formação de furanos durante as extrações com ácido sulfúrico 30% (m/v) das frações rica em celulose (PT1, PT4, PT6 e PT7)



Fonte: elaborado pelo autor

Figura 45. Formação de furanos durante as extrações com ácido sulfúrico 30% (m/v) das frações ricas em celulose (PT1, PT4, PT6 e PT7), em ausência e presença do FeCl₃

As Figuras 45a e 45b, mostram as concentrações de furanos nos extratos das frações ricas em celulose (PT1, PT4, PT6 e PT7) as quais aumentaram com o tempo de reação tanto na ausência quanto na presença, portanto, a presença de FeCl₃ não exerceu efeito co-catalítico como observado anteriormente.

As maiores concentrações de furanos totais foram observadas nos extratos da fração rica em celulose do PT6 ($2,20 \pm 0,01$ mg/g) e do PT1 ($1,80 \pm 0,10$ mg/g) após

6h. A presença destes compostos nos hidrolisados afetam a fermentação das leveduras, com redução na produção de etanol.

5.8. Comparação dos extratos quanto as maiores concentrações dos produtos extraídos

A Tabela 5 reúne as maiores concentrações obtidas de açúcares redutores, tais como, xilose e glicose liberadas dos extratos das frações ricas com ácido sulfúrico 6% e 30% (m/v). Os açúcares redutores totais máximos foram obtidos nos extratos com ácido sulfúrico 6% aplicado a fração rica em celulose do PT6 após 2 h de extração na presença de FeCl_3 e nos extratos com ácido sulfúrico 30% aplicado a fração PT7 após 2 h.

A concentração de glicose elevou-se na extração com ácido sulfúrico concentrado 30% após 2 h 30 min com a fração rica em celulose PT4, e após 6 h com a fração PT7. A concentração de xilose da fração rica em celulose PT6 atingiu a concentração máxima após 2 h em ácido sulfúrico diluído 6% (m/v). A obtenção da concentração máxima de glicose dependeu da elevação da concentração do ácido sulfúrico. Comparando-se os valores dos açúcares redutores totais dos extratos da fração rica do PT6, o ART máximo de glicose foi obtido após 6 h com ácido sulfúrico 6%, enquanto a concentração de xilose máxima foi independente do ácido usado (diluído ou concentrado) Os valores de xilose foram liberados do extrato da fração rica em celulose do PT6, indicando que degradações semelhantes em ART e xilose ocorreram nas duas concentrações de ácido. Pode-se afirmar que as maiores quantias de xilose foram obtidas com a fração PT6 após 2 h de extração com ácido sulfúrico diluído 6% e após 6 h em ácido sulfúrico concentrado 30%, enquanto que a maior concentração de glicose foi obtida com ácido sulfúrico concentrado 30% utilizando-se a fração PT7.

Tabela 5. Concentração dos valores máximos de açúcares redutores totais, xilose e glicose encontradas nos extratos das frações ricas em celulose durante extrações com soluções de ácido sulfúrico 6% e 30% (m/v)


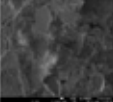
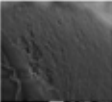
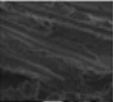

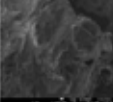
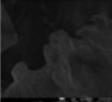
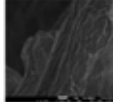
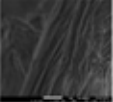

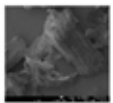
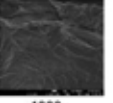
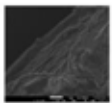
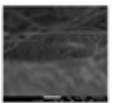

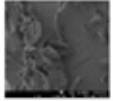
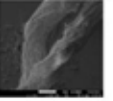
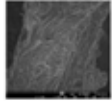
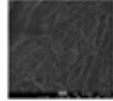
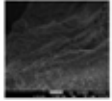
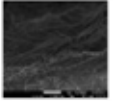

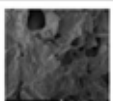
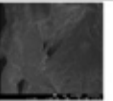
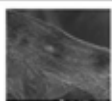

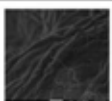
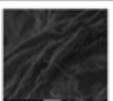

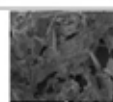
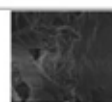



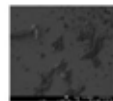
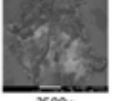
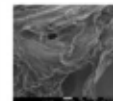
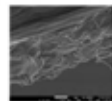

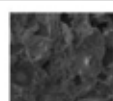
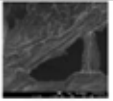
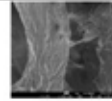
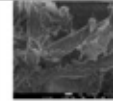

Produtos de extração com ácido sulfúrico 6%				
Produtos	Frações ricas em celulose	Tempo (h)	FeCl₃ (100mM)	Produto (mg/g)
ART	PT6	2	Presente	304,11 ± 20,65
Xilose	PT6	2	Presente	190,44 ± 6,55
Glicose	PT4	2,5	Ausente	13,87 ± 0,69
Fenóis	PT6	2	Presente	46,25 ± 2,40
Furanos	PT6	2	Presente	0,67 ± 0,01
Produtos de extração com ácido sulfúrico 30%				
Produtos	Frações ricas em celulose	Tempo (h)	FeCl₃ (100mM)	Produto (mg/g)
ART	PT7	3	Ausente	230,92 ± 4,04
	PT7	6		186,88 ± 1,61
Xilose	PT6	6		196,98 ± 1,10
Glicose	PT7	6		55,62 ± 22,10
Fenóis	PT7	6		5,15 ± 0,31
Furanos	PT7	6		0,46 ± 0,00

Fonte: elaborado pelo autor

5.9. Características físicas e morfológicas do bagaço de cana-de-açúcar (BCA) e das frações ricas em celulose

5.9.1. Microscopia eletrônica de varredura

A Figura 46 mostra as imagens da microscopia eletrônica de varredura (MEV) do BCA e das sete frações ricas em celulose. Para análise simplificada decidiu-se destacar na Figura 47 apenas as imagens obtidas com amplificação de 330x.

AMOSTRAS	FOTOS	330x	2000x	5000x	10000x	15000x	20000x
BCA			-	-	-		
PT1			-			-	
PT2			 1000x	-	-		
PT3							
PT4			 3000x				
PT5			-		-		
PT6			 2500x	-			-
PT7			 4000x	 6000x	 8000x		-

Fonte: elaborado pelo autor

Figura 46. Fotografias e imagens de MEV do BCA e das frações ricas em celulose (com aumentos de 330x a 2000x)

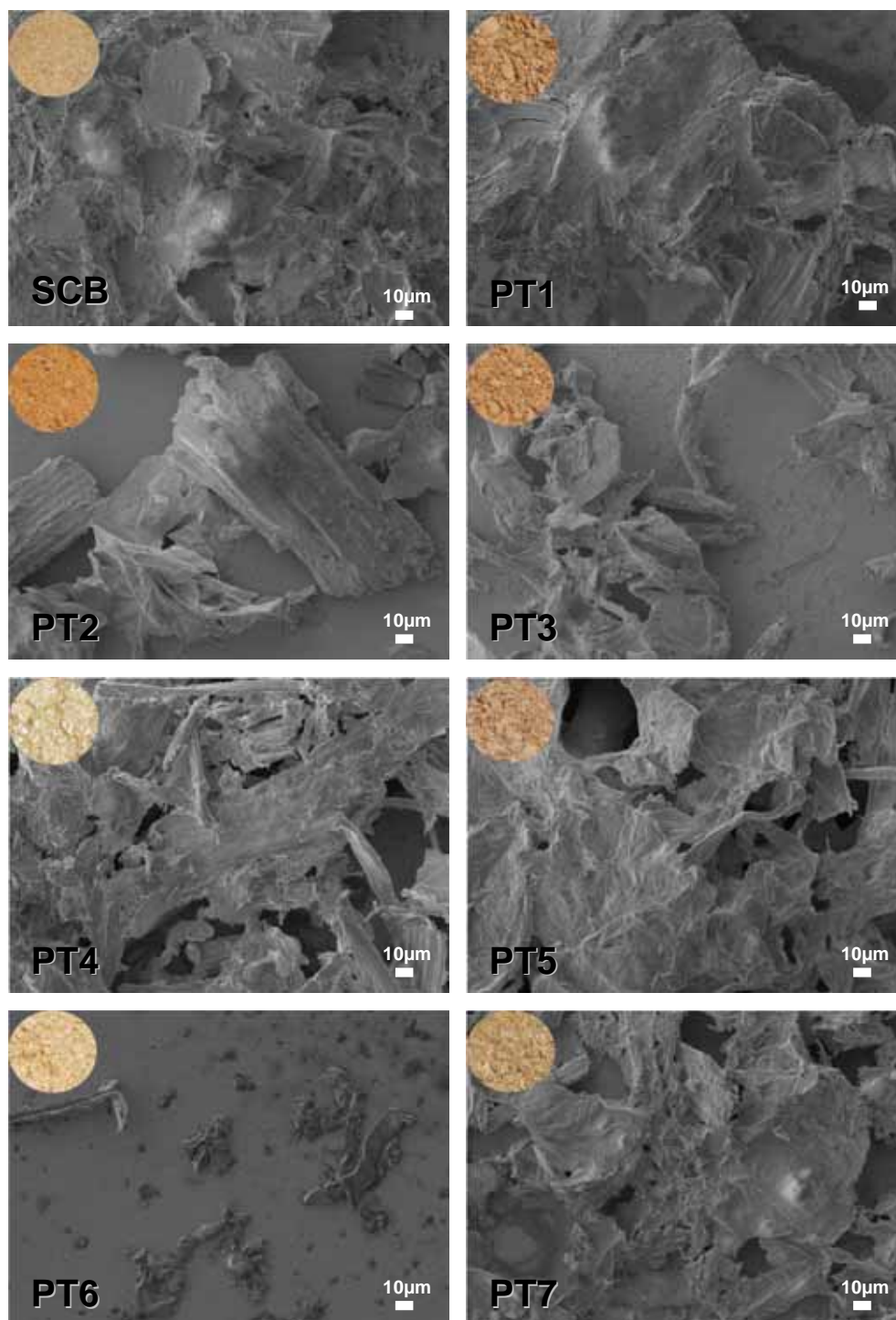


Figura 47. Imagens de MEV das amostras do BCA e das frações ricas em celulose ampliadas 330x

- | | |
|-----|---|
| PT1 | Pré-tratamento com peróxido alcalino |
| PT2 | Pré-tratamento com Hipoclorito de sódio |
| PT3 | Pré-tratamento com NaOH 8% (m/v), a temperatura ambiente por 24 h |
| PT4 | Pré-tratamento com NaOH 1% (m/v) a 100°C por 1 hora. |
| PT5 | Pré-tratamento com NaOH 5% (m/v) seguido de H ₂ O ₂ 11% (v/v) |
| PT6 | Pré-tratamento com NaOH 1% (m/v) assistido por micro-ondas. |
| PT7 | Pré-tratamento com NaOH 1% (m/v) assistido por micro-ondas seguido com H ₂ SO ₄ 1% (m/v) assistido por micro-ondas. |

As imagens de microscopia eletrônica de varredura (Figuras 46 e 47) demonstraram que as fibras originais do BCA passaram por alterações morfológicas. Os agrupamentos de fibras de celulose parecem ser conectados como uma espécie de 'cimento', fato que pode ser explicado pela presença de lignina entre as fibras isoladas. Por outro lado, as fibras das amostras das frações ricas em celulose apresentam-se mais desestruturadas que a imagem do bagaço de cana. Isto já era esperado, uma vez que a lignina remanescente das fibras quando removida, libera fibras livres (FENGEL e WENER, 1989).

5.9.2. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

A espectroscopia por Infravermelho tem sido extensivamente utilizada em pesquisas da celulose, por tratar-se de um método relativamente fácil de obtenção de informações diretas sobre mudanças químicas que ocorrem durante vários pré-tratamentos (SUN et al., 2004b). A Figura 48 representa os espectros do BCA moído e das frações ricas em celulose formadas principalmente por celulose, hemicelulose e lignina. A partir da análise de cada espectro, observou-se o seguinte:

1º) as intensidades de absorção das bandas localizadas em $3420,60\text{ cm}^{-1}$ e $2918,26\text{ cm}^{-1}$ são devidas ao estiramento das ligações OH (SUN et al., 2004b; ROSA et al., 2010, IRFAN et al., 2011);

2º) a banda de absorção em $1736,19\text{ cm}^{-1}$ está relacionada com a vibração C=O dos grupos acetil e carbonil da hemicelulose e/ou da lignina (SUN et al., 2004b; ROSA et al., 2010). Esta desaparece nos espectros das frações ricas em celulose com exceção do espectro do fração rica em celulose do PT2, onde, o pico existente indica a banda referente a ligação éster. O resultado indicaria que os pré-tratamentos poderiam romper quase todas as ligações éster entre lignina e carboidratos, exceto no caso de PT2;

3º) a banda de absorção em $1638,72\text{ cm}^{-1}$ corresponde a deformação angular das ligações H-O-H da água absorvida (SUN et al., 2004b, LIU et al., 2006);

4º) as bandas de absorção em $1606,06$ e $1515,91\text{ cm}^{-1}$ são atribuídas ao estiramento C=C dos anéis aromáticos da lignina (EMMEL et al., 2003; SUN et al., 2005), onde as frações rica em celulose PT3, PT6 e PT7 apresentam picos

levemente pronunciados. Esta banda desaparece nas outras frações ricas em celulose, o que pode estar associado à remoção considerável de lignina como mostra a análise química descrito na Tabela 3;

5º) a banda de absorção em $1427,07\text{ cm}^{-1}$ é atribuída à deformação do ângulo de ligação C-H presente na celulose e lignina, enquanto que a banda localizada em $1376,93\text{ cm}^{-1}$ é atribuída à deformação da ligação C-H da hemicelulose, celulose e lignina (ROSA et al., 2010);

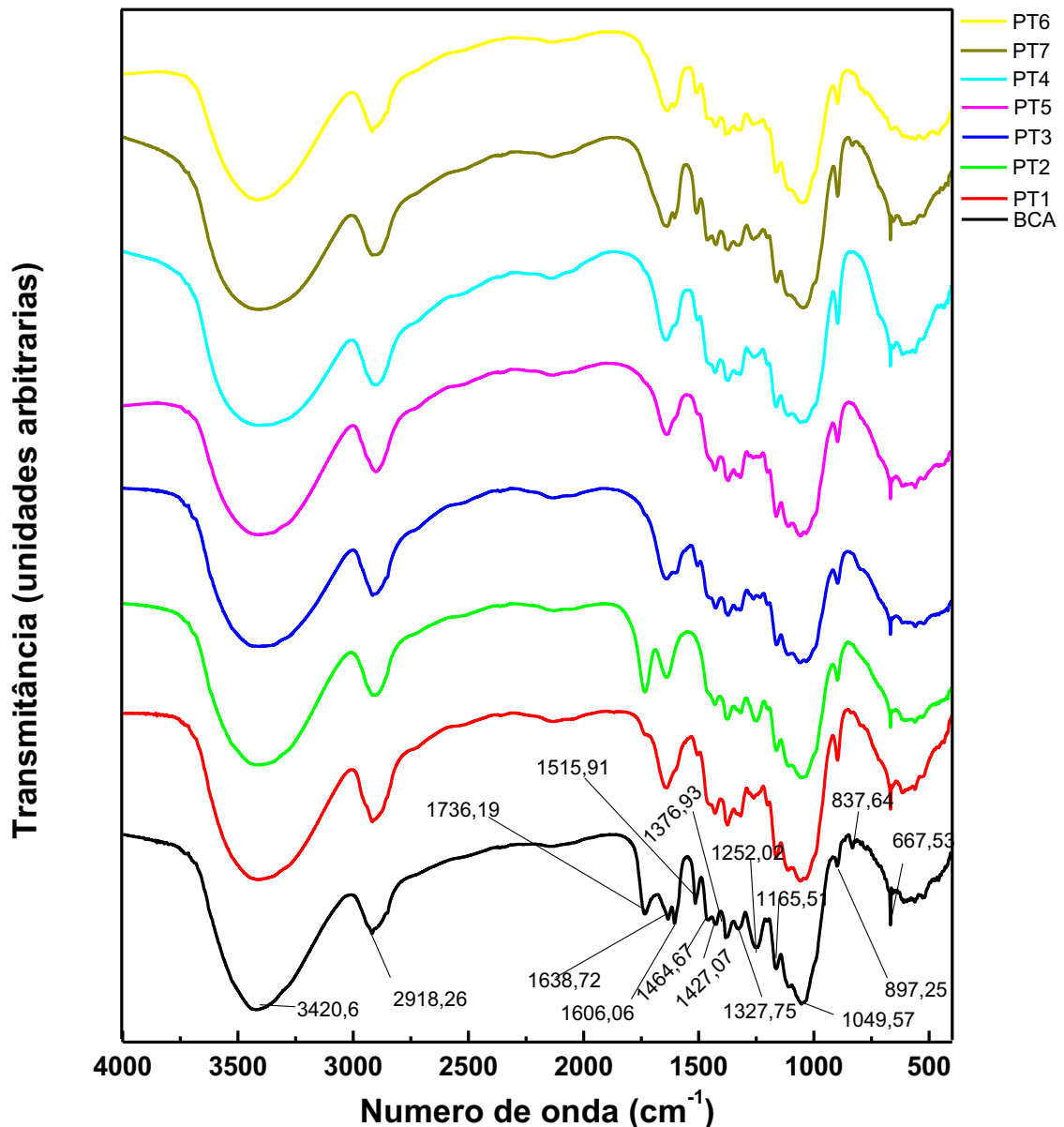
6º) outro importante aspecto observado nos espectros da Figura 41 é a banda localizada por volta de $1252,02\text{ cm}^{-1}$ correspondente à deformação assimétrica axial do grupo =C-O-C, a qual é frequentemente observada quando grupos tais como, éter, éster e fenóis da lignina e/ou da hemicelulose estão presentes (EMMEL et al., 2003). A diminuição da intensidade de absorção desta banda ocorreu na fração rica em celulose, exceto no espectro do BCA e da fração rica em celulose do PT2. É importante ressaltar que na fração rica em celulose do PT2, esta banda mantém uma intensidade menor em relação ao observado para o BCA moído. Isto indica que os diferentes pré-tratamentos, excetuando o aplicado para obter a fração PT2 (pré-tratamento com NaClO), poderia remover ligações éter entre lignina e carboidratos. Resultados semelhantes a estes foram obtidos por Liu et al, (2009) com uma fração rica em celulose de palha de milho em presença de FeCl_3 ;

7º) a absorção de grupos hidroxilas ocorre principalmente em duas bandas localizadas em $1049,57\text{ cm}^{-1}$ e em $1376,93\text{ cm}^{-1}$ referentes à vibração do grupo OH da lignina ou na dobra do grupo C-OH da hemicelulose, e da vibração do grupo hidroxila fenólico (LIU et al, 2009), respectivamente;

8º) a banda localizada em $1165,5\text{ cm}^{-1}$ no espectro do BCA e nas frações rica em celulose é atribuída ao um estiramento C-O das estrutura da celulose, hemicelulose e lignina e/ou estiramento C-O-C nas estruturas da celulose e hemicelulose (LIU et al., 2009; ROSA et al., 2009; IRFAN et al., 2011) e;

9º) um último aspecto observado nos espectros é a presença da banda localizada em $897,15\text{ cm}^{-1}$, originado das ligações β -glicosídicas entre unidades de glicose para formar a celulose (SUN et al., 2004b; ALEMDART e SAIN, 2008; CHEN et al, 2011; IRFAN et al., 2011), o que demonstra a presença predominante de ligações β -glicosídicas entre as unidades de açúcar da celulose e hemicelulose (ROSA et al., 2010; LIU et al, 2009).

Em geral, quando se compara os espectros de FTIR das frações ricas em PT1, PT2, PT3, PT4, PT5, PT6 e PT7 com o espectro da amostra de partida (BCA moído), observou-se que houve uma redução de pico $1736,19\text{ cm}^{-1}$, $1515,91\text{ cm}^{-1}$ e a da banda localizada em $1252,02\text{ cm}^{-1}$. Isto pode ser explicado por uma redução significativa dos teores das hemiceluloses e da lignina, principalmente, pelos processos dos pré-tratamentos utilizados. Além disso, pode-se observar um aumento na intensidade de absorção da banda localizada $897,15\text{ cm}^{-1}$, o que indica que houve um aumento na porcentagem de celulose após os pré-tratamentos. É importante salientar que para a amostra PT2 foi observado um aumento no pico a $1736,19\text{ cm}^{-1}$, sendo que isto pode ser atribuído ao caráter oxidativo do processo de pré-tratamento que deu origem a fração PT2, que levou à formação de grupos carbonila, principalmente na estrutura da lignina ainda presente no material resultante. As variações observadas nos espectros FTIR são consistentes com os valores das composições químicas do BCA moído e das frações ricas em celulose descritas na Tabela 3.



Fonte: elaborado pelo autor

Figura 48. Espectros FTIR do BCA moído e das frações ricas em celulose.

5.9.3. Termogravimetria

A Termogravimetria é uma técnica amplamente utilizada para monitorar os polímeros e a dependência estrutural da degradação térmica de fibras da celulose natural. Isto porque os diferentes polímeros e estruturas supramoleculares da celulose se comportam de forma diferente quando submetidos à degradação térmica (LIU et al., 2006; SALDARRIAGA et al., 2012).

5.9.3.1. TG (análise termogravimétrica) e DTG (derivadas das curvas de termogravimétricas)

Como se pode observar nas Figuras 49, 50, 51 e 52, em todas as amostras, os perfis de perda passam basicamente três eventos quando se encontram em atmosfera de O₂ e apenas dois eventos quando se encontram em atmosfera de N₂. Independentemente de as amostras se encontrarem em atmosfera de oxigênio ou nitrogênio, o primeiro evento relaciona-se com a evaporação de água adsorvida nos materiais ou compostos de baixo peso molecular. Em todas as amostras deste evento ocorreu uma pequena perda de massa, entre as temperaturas de 35 e 150 °C. Já o segundo evento, corresponde basicamente ao processo de degradação da celulose, que é constituído por vários processos simultâneos: despolimerização, desidratação e decomposição das unidades glicosídicas (ARAKI et al, 1998). O terceiro evento foi atribuído à oxidação e à degradação da fração rica em celulose carbonizados e à formação dos produtos gasosos de baixo peso molecular (ROMAN e WINTER, 2004).

5.9.3.1.A. TG e DTG em atmosfera de nitrogênio

A Figura 49 correlaciona as perdas de massa em porcentagem com as elevações de temperatura em atmosfera de nitrogênio enquanto a Figura 50 mostra as derivadas das massas em função da temperatura. A taxa máxima de decomposição para o BCA moído ocorre a 369 °C, que é maior do que a taxas obtidas para a fração rica em celulose (Tabela 6), devido ao fato de que a composição química destes últimos variou, sendo que esta variação resultou dos diversos pré-tratamentos que deram origem as frações ricas em celulose.

As temperaturas iniciais de degradação térmica (Tinicial) das amostras representadas na Tabela 6 foram atribuídas à decomposição das hemiceluloses e da celulose, conforme mostra a Figura 49. O BCA moído apresenta um valor menor de Tinicial, mas semelhante ao da fração rica em celulose do PT2. Quando a TG das amostras atinge 50 % de perda de massa, a temperatura correspondente à decomposição do BCA moído e da fração rica em celulose (Tabela 6) mostra que a fração rica em celulose do PT2 apresenta o menor valor de Tinicial (330 °C), seguido pela fração rica em celulose PT3 (342 °C) e PT7 (344 °C). A fração rica em celulose restante dos pré-tratamentos mostram valores próximos de Tinicial ao mostrado pelo

BCA moído. Isto nos leva a afirmar que a estabilidade térmica da fração rica em celulose aumenta com o grau de pureza da celulose. A razão para que este aumento seja relativamente maior quanto a estabilidade térmica da celulose é, provavelmente, devido à remoção substancial da hemicelulose, visto que as hemiceluloses é menos estável do que o BCA e a fração rica em celulose obtidas durante diferentes pré-tratamentos (SUN et al., 2004b) com perda de lignina.

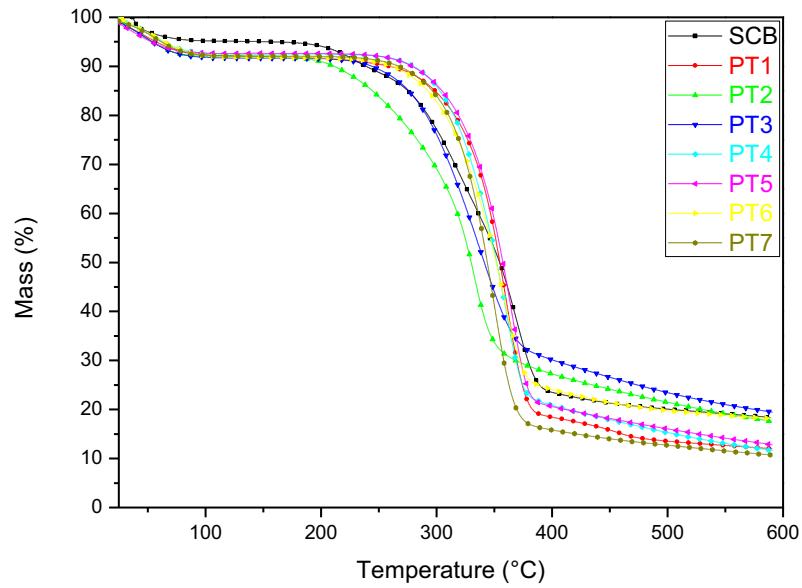
Como se pode observar nas Tabelas 6 e 7, as quais representam PT4 e PT7 apresentam diferenças em relação a outras frações rica em celulose bem como em relação ao BCA moído. Em atmosfera de oxigênio, uma porcentagem deste material carbonizado é cinza. Esta é encontrada em menor quantidade na fração rica em celulose PT4 e PT7 do que nas outras frações ricas em celulose, conforme mostra a Tabela 3. Em atmosfera de nitrogênio, os valores do material carbonizado são maiores do que em atmosfera de O₂ devido à condensação dos componentes da lignina e da sua aromatização em atmosfera de N₂ a altas temperaturas, além da presença do conteúdo de cinza nas frações ricas em celulose e no BCA moído (MARTIN et al, 2009).

Liu et al. (2006) estudaram a análise térmica de uma fração rica em celulose em atmosfera de N₂, o qual foi obtido por pré-tratamento com KOH/NaOH 8 % (m/v) seguido de outro tratamento com álcali a uma concentração maior (10 %, m/v) em etapas de 12 h a 23 °C. Os resultados obtidos evidenciaram três zonas de perda de massa, sendo a primeira entre 260 - 320 °C, o que pode corresponder a uma perda de massa de decomposição da hemicelulose; enquanto a segunda zona esteve entre 320 – 360 °C, podendo ser associada à despolimerização térmica da celulose; e, a terceira zona variou entre 360 - 600 °C, a qual pode ser devido a rupturas na celulose e nos compostos inorgânicos juntamente com os sais formados durante a extração e os processos de purificação.

Como se mostra na Figura 50, as análises das derivadas termogravimétricas (DTG) nos permitiram descobrir a reatividade do BCA moído e das frações ricas em celulose. Nos experimentos, o peso da cada amostra, a taxa de fluxo volumétrico de N₂ e a taxa de aquecimento da TG foram controlados com cerca de 5 mg, 100 cc min⁻¹ e 20 °C/min, respectivamente. Na distribuição DTG do BCA, os picos de hemicelulose e celulose podem ser identificados em 231, 326 e 369 °C (Figura 50). Os dados obtidos nesta presente pesquisa são próximos aos apresentados por Chen et al (2010), autores que afirmam terem encontrado resultados de picos das

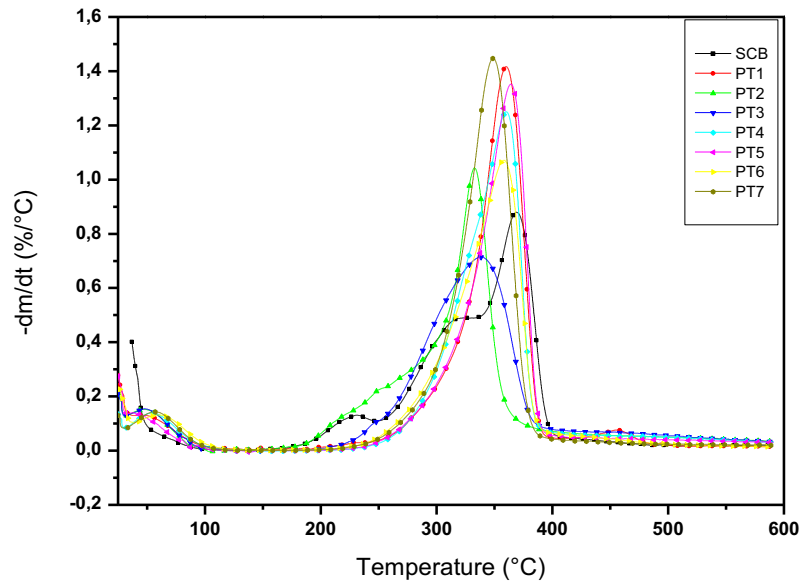
DTG (ou taxas máximas de pirólises) de glicose, hemicelulose e celulose de 232, 321 e 360 °C respectivamente. Neste sentido, o pico da glicose dos experimentos por nós realizados representaria a decomposição de unidades de glicose que estão contidas na hemicelulose e a na celulose.

Após submeter o BCA a diferentes pré-tratamentos (PT1 - PT7), observamos que apenas o pico de celulose é exibido, revelando que a hemicelulose é solubilizada consideravelmente durante os pré-tratamentos (Tabela 4), bem como aumenta a porcentagem de celulose (Tabela 3). Por outro lado, o pico de celulose (com atmosfera de N₂ ou O₂) decai com os diferentes pré-tratamentos, exceto os picos das frações ricas em celulose dos pré-tratamentos 1, 4 e 5, os quais têm menor conteúdo de lignina, como se pode observar na Tabela 3. Segundo Chen et al (2010), a DTG da lignina (de marca TCI) teve duas zonas de reação identificadas com o aumento da temperatura de aquecimento. A primeira zona abrange uma região de temperatura mais ampla, aproximadamente entre 180 e 500 °C, enquanto a reação da segunda zona é provocada quando a temperatura de aquecimento varia 750 - 800 °C. Os picos da primeira e segunda zonas de reação apareceram a 360 e 778 °C, respectivamente. Os resultados dos picos das caudas pra a lignina das frações ricas em celulose em diferentes tempos (10,0 – 17,5 min) são caracterizados por uma deterioração progressiva em que a temperatura está entre 320 e 380 °C, devido a um aumento do conteúdo de lignina. Em nossa pesquisa a quantidade de lignina das frações ricas em celulose sofreram diminuições com respeito ao BCA (Tabela 3), por isso as DTGs não apresentam picos para lignina, embora a decomposição da lignina mencionada anteriormente esteja dentro dessa zona.



Fonte: elaborado pelo autor

Figura 49. Curvas de TG em atmosfera de N_2 para BCA moído e das frações ricas em celulose.



Fonte: elaborado pelo autor

Figura 50. Curvas de DTG em atmosfera de N_2 para BCA e das frações ricas em celulose.

Tabela 6. Dados de temperaturas iniciais de degradação (T inicial), de degradação máxima (T Max), Temperatura com 50 % de perda de massa e rendimento de carvão residual do BCA e das frações ricas em celulose obtidos em análises TG em atmosfera de N₂.

Amostras N ₂	Temp. com 50% perda de massa (°C)*	Degradação térmica da hemicelulose/lignina/celulose				Rendimento de carvão residual
		T inicial (°C)*	T Max (°C)**	T Max (°C)**	T Max (°C)**	(%)*
BCA	356	203	231	325	369	18,4
PT1	354	256	-	-	360	12,0
PT2	330	205	-	-	333	17,7
PT3	342	246	-	-	339	19,5
PT4	353	271	-	-	360	11,7
PT5	356	271	-	-	364	12,8
PT6	352	260	-	-	358	18,2
PT7	344	267	-	-	349	10,7

*Dados da Figura 49, **dados da Figura 50

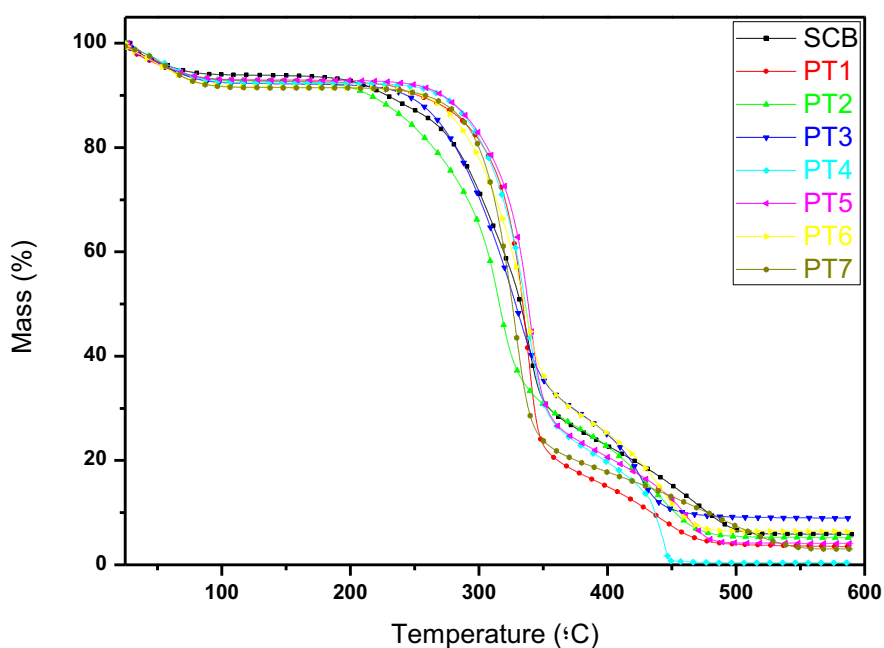
Fonte: elaborado pelo autor

4.9.3.1.B. TG e DTG em atmosfera de oxigênio

Nas curvas TG (Figura 51) e DTG (Figura 52) obtidas em atmosfera de O₂ para o BCA moído e da fração rica em celulose, os picos das hemiceluloses, celulose e lignina podem ser identificados em 311, 339 e 472 °C, respectivamente. Essas temperaturas representam valores menores quando comparadas com a TG e DTG em atmosfera de nitrogênio (Figura 52) para os picos das hemiceluloses e celulose devido o oxigênio que acelera a pirólise dos compostos, com exceção para o caso da lignina.

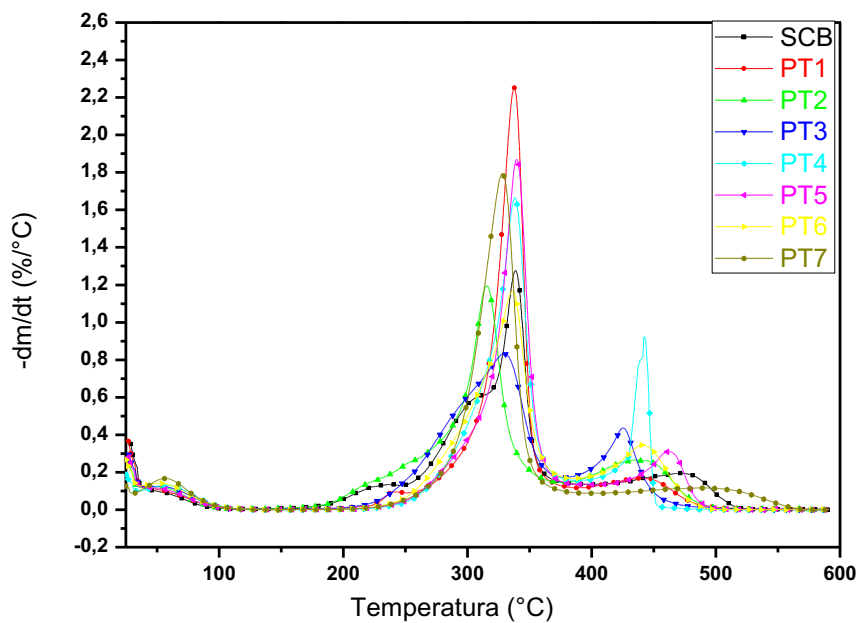
Conforme são representados na Figura 52, os dois primeiros picos da DTG do BCA moído atingem temperatura de 238 e 331°C, respectivamente. Esses picos podem ser atribuídos à decomposição das hemiceluloses, sendo que os valores da temperatura estão próximos aos descritos por Raad et al (2006) para hemicelulose que estão a 200 e 300 °C. Já a fração rica em celulose do PT1 apresenta um pico levemente pronunciado com um valor de 243 °C que corresponde ao pico da lignina, enquanto que nos outros a fração rica em celulose dos pré-tratamentos desaparece

o pico da hemicelulose. Isto vai ao encontro dos dados representado na Tabela 4, dos diversos pré-tratamentos que solubilizaram a hemicelulose entre 38,17 e 82,70 %. Os picos da celulose e da lignina do BCA e das frações ricas em celulose (Tabela 7) estão no intervalo do reportado por Raad et al (2006), autores que afirmam ter encontrado intervalos da TG da celulose entre 240 e 350 °C e da TG da lignina entre 350 e 500 °C. Já Santos et al (2011) apresenta um intervalo para a lignina do BCA recém moído de 374 e 490 °C.



Fonte: elaborado pelo autor

Figura 51. Curvas de TG em atmosfera de O₂ para BCA e as frações ricas em celulose



Fonte: elaborado pelo autor

Figura 52. Curvas de DTG em atmosfera de O_2 para BCA e as frações ricas em celulose

Tabela 7. Dados de temperaturas iniciais de degradação (T inicial), de degradação máxima (T Max), Temperatura com 50 % de perda de massa e rendimento de carvão residual do BCA e das frações ricas em celulose obtidos em análises TG em atmosfera de O₂

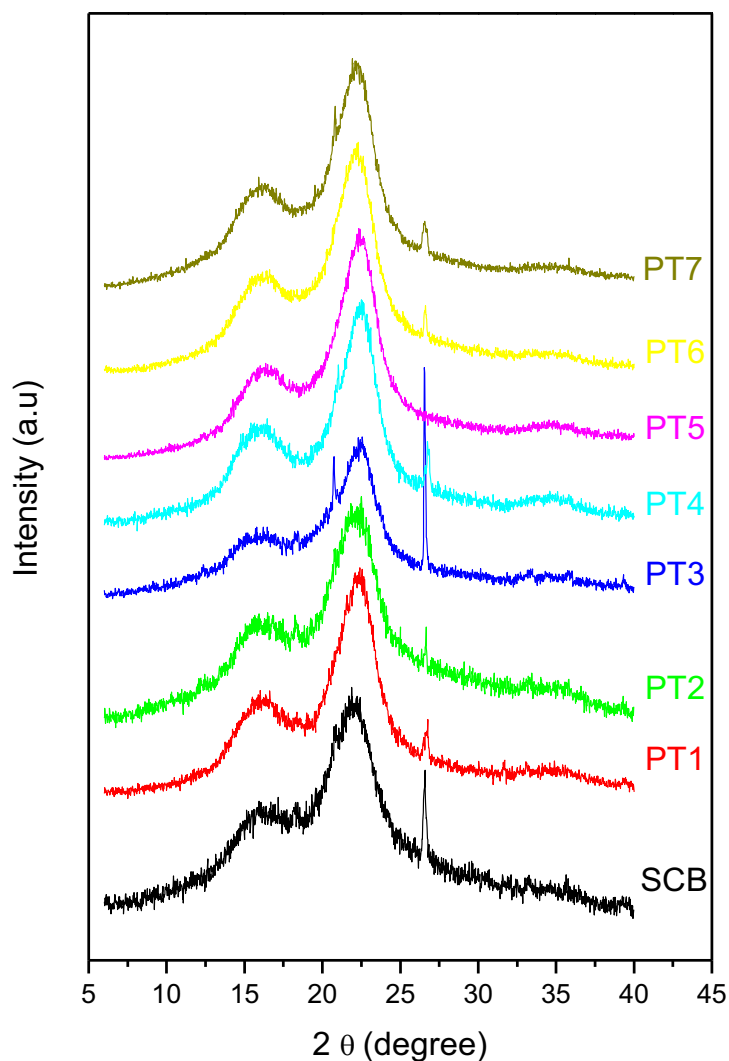
Amostras em O ₂	Temp. com 50% perda de massa (°C)*	Degradação térmica da hemicelulose/lignina/celulose				Degradação da fração rica em celulose carbônico	Rendimento de carvão residual
		T inicial (°C)*	T Max (°C)**	T Max (°C)**	T Max (°C)**	T Max (°C)**	(%)*
BCA	332	199	238	311	339	472	5,9
PT1	334	240	243		338	441	3,5
PT2	316	202	-	-	316	437	5,2
PT3	328	232	-	-	330	425	8,9
PT4	336	263	-	-	338	443	0,4
PT5	338	263	-	-	340	462	4,1
PT6	334	257	-	-	336	442	6,4
PT7	326	260	-	-	329	489	3,0

*Dados da Figura 51, **dados da Figura 52

Fonte: elaborado pelo autor

5.9.4. Difração dos Raios-X

Na Figura 53, os difratogramas do BCA moído e da fração rica em celulose dos pré-tratamentos 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7, conforme se encontram apresentados, são típicos dos materiais semicristalinos devido às bandas amorfas amplas e picos de cristalinidade. No BCA e na fração rica em celulose dos pré-tratamentos 2, 3 e 5, há uma presença de celulose do tipo I, verificado pelos picos em $2\theta \sim 15^\circ$ (plano 101), 21° (plano 021), 23° (plano 002), e na fração rica em celulose dos pré-tratamentos 3, 5 e 6 verifica-se a presença de celulose do tipo II, que se pode observar nos picos em $2\theta = 20^\circ$ (plano 10 $\bar{1}$) e 22° (plano 002) como descrito por BORYSIK e GARBARCZYK (2003) e FLAUZINO NETO et al. (2013). A presença da celulose amorfa na fração rica em celulose dos pré-tratamentos 3, 5 e 6 acontece devido ao pré-tratamento efetuado com NaOH em diferentes concentrações, tempo e temperatura.



Fonte: elaborado pelo autor

Figura 53. Difratoformas de raios-X do BCA e das frações ricas em celulose

Como podemos observar na Tabela 8, os índices de cristalinidade (ICr) determinados foram de cerca de 32,42; 41,45; 27,43; 46,12; 45,08; 46,94; 51,60; e, 46,31 % para o BCA moído e para os pré-tratamentos 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7, respectivamente. Estes dados dependem do método de raios X e do modo experimental usado para medir a celulose (TERINTE et al., 2011), pelo qual foi medida a celulose em pó de Avicel PH-101, chegando-se a valores de ICr % entre 37-93 %.

O ICr do BCA obtido é baixa, se comparada com o BCA que Binod et al, (2012) afirma ter encontrado, de 68,23 %, possivelmente por ser diferente a procedência da cana-de-açúcar, que é de origem indiana.

Os valores de ICr mais elevados dos materiais pré-tratados, em comparação com o BCA moído podem ser explicados pela redução e remoção dos componentes não celulósicos (que são essencialmente amorfos) durante os processos de purificação química para a deslignificação e branqueamento do material de partida (BCA) (BINOD et al., 2012; VANI et al, 2012). Na Figura 53, com exceção para o fração rica em celulose do PT2, pode se observar que os pré-tratamentos realizados resultou em picos mais estreitos e mais nítidos para os materiais obtidos. Isso pode ser explicado devido ao aumento da cristalinidade dos picos, em comparação com o material de partida (BCA), tal como é sugerido por TEIXEIRA et al., 2010. Apenas a amostra do PT2 , na qual foi usado hipoclorito de sódio, resultou em menor ICr quando comparado com o material de partida (BCA) , isto é , o material tornou-se mais amorfo. Apesar de ter sido removida parte dos constituintes não celulósicos (lignina e hemiceluloses) das frações ricas em celulose do PT2 o ICr diminuiu. Este tratamento alterou a compressão das fibras, a nível molecular, no entanto, no nível estrutural não foi observada nenhuma alteração do tipo de estrutura de celulose, fazendo com que o mesmo se torne mais amorfo e assim, com as cadeias de celulose mais acessível (MANSFIELD et al., 1999).

A cristalinidade da celulose afeta as absorções químicas de uma fibra, sendo que a baixa cristalinidade significa maiores regiões amorfas (Tabela 8), as quais são mais acessíveis aos produtos químicos e água. A cristalinidade também está relacionada com a resistência, e em geral, quanto maior é a cristalinidade, maior é a força das fibras, se as estruturas dos polímeros são as mesmas (LIU et al., 2006).

Tabela 8. Os índices de cristalinidade do BCA e das frações ricas em celulose

AMOSTRAS	Unidades de áreas		ICr (%)
	CRISTALINO	AMORFO	
BCA	3269,03	1568,58	32,42
PT1	4117,26	2914,62	41,45
PT2	4006,02	1513,97	27,43
PT3	3126,27	2676,08	46,12
PT4	4690,51	3850,80	45,08
PT5	3334,50	2949,38	46,94
PT6	6203,52	6612,62	51,60
PT7	5762,90	4970,53	46,31

Fonte: elaborado pelo autor

5.10. Determinação da massa molecular média viscosimétrica da α -celulose do BCA e das frações ricas em celulose

Esta degradação se reflete na massa molar (MM) das cadeias de celulose e pode ser verificada por meio de GP e MM, valores determinados para as frações de α -celulose das amostras estudadas (BCA e fração rica em celulose) e que são apresentados na Tabela 9. Observa-se que todas as amostras pré-tratadas apresentaram redução dos valores de GP e MM, que são o resultado das condições experimentais de cada processo. Os menores valores foram encontrados nas amostras do PT2 e do PT3. particularmente, o pré-tratamento 2 é um processo que utiliza reagentes ácidos, por isso as condições utilizadas são muito agressivas levando a fração rica em celulose do BCA do PT2 à degradação da celulose por hidrólise ácida (SUN et al., 2004b).

Tabela 9. Correlação entre composição química e o grau de polimerização (GP) e massa molecular (MM) das frações α -Celulose do BCA moído e das frações ricas em celulose.

Amostras	α -Celulose		
	(%)	GP	Massa molecular
			MM (g.mol ⁻¹)
SCB	40,18±0,30	1044	169132
PT1	68,88±0,78	582	94287
PT2	49,38±0,75	457	74081
PT3	54,93±0,85	403	65396
PT4	64,70±0,50	799	129543
PT5	80,76±0,30	704	114133
PT6	54,18±0,79	789	127831
PT7	60,73±1,24	776	125796

Fonte: elaborado pelo autor

6. CONCLUSÕES

Os aspectos mais importantes do presente trabalho formam os seguintes:

1. Os diferentes tipos de pré-tratamento aplicados ao bagaço de cana-de-açúcar resultante influenciaram na variação da composição química das frações ricas em celuloses que foi evidenciado na caracterização morfológica e física das frações ricas em celuloses obtidas.
2. Os maiores rendimentos do pré-tratamento foram obtidas para as frações ricas em celuloses PT7 (64,97%), PT6 (71,21%), PT2 (66,80%), PT4(59,59%), PT1(55,53%), devido às condições escolhidas nos pré-tratamentos.
3. Para analisar as deslignificações dos pré-tratamentos se caracterizaram quimicamente pela metodologia TAPPI que resultaram em menores teores de lignina presentes nas frações ricas em celulose dos PT4 (7,51%), PT5 (6,53%) e PT1 (10,66%) enquanto que os menores teores das hemiceluloses foram PT5 (15,51%), PT2 (22,61%), PT1 (23,12%).
4. Os espectros infravermelhos do BCA moído e das frações ricas em celuloses têm uma diminuição considerável da intensidade da absorção no número de ondas, de 1606,06 e de 1515,91 cm^{-1} , exceto na fração rica em celulose do PT2 onde desaparecem estes números de ondas indicados, que está associado à remoção de lignina e que se pode confirmar com análise química.
5. A presença da celulose alomorfa nas frações ricas em celuloses dos PT3, PT5 e PT6 aconteceu devido ao pré-tratamento ter sido efetuado com NaOH em diferentes concentrações, tempo e temperatura.
- 6- O Efeito do co-catalizador FeCl_3 sobre a ação catalítica do ácido sulfúrico depende do pré-tratamento e da concentração do ácido sulfúrico. Assim, aumentos em ART foram obtidos em presença do FeCl_3 para as frações ricas em celulose PT1, PT4, PT6 e PT7 selecionadas.

7. O melhor procedimento de extração consiste no uso de uma solução de ácido sulfúrico 6% em presença de FeCl_3 100mM da fração PT6, pelo fato de extrair as maiores quantidades de ART ($304,11 \pm 20,65$ mg/g em 2h) contaminada por uma quantidade de xilose ($190,44 \pm 6,55$ mg/g /em 2h). Nestas condições as quantidades de fenóis totais (46,25mg/g em 2h, mas 3,05 mg/g a partir de PT1 em ácido sulfúrico 6% em ausência de FeCl_3 com ART máximo de 148,96mg/g) e furanos (0,67 mg/g em 2h mas 0,07 mg/g a partir de PT1 em ácido sulfúrico 6% e em presença de FeCl_3 com ART e da ordem de 170,70 mg/g) foram bastantes elevadas Assim, as menores concentrações furanos e fenóis são formadas quando a concentração de ART é ainda baixa o que não é de interesse para a produção de etanol.
- 8- As concentrações de ART resultantes das extrações com ácido sulfúrico 30 % (m/v) das frações ricas em celuloses dos PT1, PT4, PT6 e PT7 com ácido sulfúrico, mostram que os ART aumentaram com o tempo, mas as quantidade foram menores que as obtidas em ácido sulfúrico 6% tanto em ausência quanto em presença de FeCl_3 , As quantidades de fenóis e furanos formados foram menores em ácido sulfúrico 30%(m/v) tanto na ausência quanto em presença do FeCl_3 , mas as quantidades de fenóis foram maiores que as dos furanos em presença de FeCl_3 .

REFERÊNCIAS

- AGUILAR, R.; RAMÍREZ, J. A.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M. Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. **Journal of Food Engineering**, v. 55, p. 309-318, 2002.
- ALEMDAR, A.; SAIN, M. Isolation and characterization of nanofibers from agricultural residues - wheat straw and soy hulls. **Bioresource Technology**, v. 99, p.1664-1671, 2008.
- ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4851-4861, 2010.
- ARAKI, J.; WADA, M.; KUGA, S.; OKANO, T. Flow properties of microcrystalline cellulose suspension prepared by acid treatment of native cellulose. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 142, p. 75-82, 1998.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR7730**: pasta celulósica – determinação da viscosidade em solução de cuproetilenodiamina (Cuen) com viscosímetro do tipo capilar. Rio de Janeiro, 1998. 8 p.
- BANERJEE, S.; MUDLIAR, S.; SEN, R.; GIRI, B.; SATPUTE, D.; CHAKRABARTI, T.; PANDEY, R. A. Commercializing lignocellulosic bioethanol: technology bottlenecks and possible remedies. **Biofuels Bioproducts. Biorefining**, v. 4, p. 77-93, 2010.
- BINDER, J. B.; RAINES, R.T. Fermentable sugars by chemical hydrolysis of biomass. **Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States of America**, v. 107, p. 4516-4521, 2010.
- BINOD, P.; SATYANAGALAKSHMI, K.; SINDHU, R.; JANU, K. U.; SUKUMARAN, R. K.; PANDEY, A. Short duration microwave assisted pretreatment enhances the enzymatic saccharification and fermentable sugar yield from sugarcane bagasse. **Renewable Energy**, v. 37, p. 109-116, 2012.
- BOARD OF SUPERVISORS OF LOUISIANA STATE UNIVERSITY AND AGRICULTURAL AND MECHANICAL COLLEGE THROUGH THE LSU AGCENTER (US). F. D. Day. **Biocide compositions and related methods**. US6866870 B2, 10 Sept. 2003, 15 Mar. 2005.
- BORYSIK, S.; GARBARCZYK, J. Applying the WAXS method to estimate the supermolecular structure of cellulose fibers after mercerization. **Fibres & Textiles in Eastern Europe**, v. 11, n. 5, p. 104-106, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Companhia Nacional de Abastecimento. (National Supply Company), 2014. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar. Safra 2014/2015 N. 1- Primeiro levantamento Abril 2014**. v. 1 Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: 17 abr. 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Companhia Nacional de Abastecimento. (National Supply Company), 2013. **Perfil do setor do açúcar e do álcool no Brasil. Safra 2011/2012**. v. 5 Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: 17 abr. 2014.

BRIENZO, M.; SIQUEIRA, A. F.; MILAGRES, A. M. F. Search for optimum conditions of sugarcane bagasse hemicellulose extraction. **Biochemical Engineering Journal**, v. 46, p.199-204, 2009.

BROWNING, B. L. **Methods of wood chemistry**. New York: Interscience Publishers, 1967. v. 2, 406 p.

BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, W. D.; SOUZA, A. P. As rotas para o etanol celulósico no Brasil. In: CORTEZ, L. A. B. (Org.). **Bioetanol da cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade**. São Paulo: Edgard Blücher, 2010. Cap. 7, parte 3, p. 365-380.

CAMACHO, F.; GONZÁLEZ-TELLO, P.; JURADO, E.; ROBLES, A. Microcrystalline-cellulose hydrolysis with concentrated sulphuric acid. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 67, n. 4, p. 350-356, 1996.

CANEVAROLO, S. V. **Técnicas de caracterização de polímeros**. São Carlos: Artliber, 2004. 448 p.

CANILHA, L. ; CHANDEL, A. K.; MILESSI, T. S. S.; ANTUNES, F. A. F.; FREITAS, W. L. C.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, S. S. Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: an overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1-15, 2012.

CANILHA, L.; SANTOS, V. T.; ALMEIDA, G. J.; SILVA, J. B.; GIULIETTI, M.; SILVA, S. S.; FELIPE, M. G.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M.; CARVALHO W. A study on the pretreatment of a sugarcane bagasse sample with dilute sulfuric acid. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 9, p. 1467-1475, 2011.

CARDONA, C. A.; QUINTERO, J. A.; PAZ, I. C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4754-4766, 2010.

CARVALHO, R. J.; MARTON, J. M.; FELIPE, M. G. A. Avaliação do sistema combinado de tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar com carvão ativo e resinas de troca iônica para sua utilização como meio de fermentação. **Revista Analytica**, v.18, p. 48-55, 2005.

- CARVALHO, R. N. L. **Dilute acid and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse for biogás production**. 2009. 98 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biológica) - Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2009.
- CHEN, W. H.; TU, Y. J.; SHEEN, H. K. Disruption of sugarcane bagasse lignocellulosic structure by means of dilute sulfuric acid pretreatment with microwave-assisted heating. **Applied Energy**, v. 88, p. 2726-2734, 2011.
- CHEN, W. H.; TU, Y. J.; SHEEN, H. K. Impact of dilute acid pretreatment on the structure of bagasse for bioethanol production. **International Journal of Energy Research**, v. 34, p. 265-274, 2010.
- CHUNDAWAT, S. P. S.; BECKHAM, G. T.; HIMMEL, M. E.; DALE, B. E. Deconstruction of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 2, p. 121-145, 2011.
- COUNCIL OF SCIENTIFIC & INDUSTRIAL RESEARCH (INDIA). A. Kumar; D. Kumar; S. Dutt; D. C. Chand. **Novel strain and a novel process for ethanol production from lignocellulosic biomass at high temperature**. US20090226993 A1, 23 Feb. 2009, 10 Sept. 2009.
- DEEJING, S.; KETKORN, W. Comparison of hydrolysis conditions to recover reducing sugar from various lignocellulosic materials. **Chiang Mai Journal of Science**, v. 36, n. 3, p. 384-394, 2009.
- DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores**. Porto Alegre: Ed. PUCRS, 2007. 60 p.
- DHEPE P. L.; FUKUOKA, A. Cellulose conversion under heterogeneous catalysis. **ChemSusChem**, v. 1, n. 12, p. 969-975, 2008.
- DIAS, M. O. S.; ENSINAS, A. V.; NEBRA, S. A.; MACIEL FILHO, R.; ROSSELL, C. E. V.; MACIEL, M. R. W. Production of bioethanol and other bio-based materials from sugarcane bagasse: integration to conventional bioethanol production process. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 87, p. 1206-1216, 2009.
- EBERTS, T. J.; SAMPLE, R. H. B.; GLICK, M. R.; ELLIS, G. H. A simplified, colorimetric micromethod for xylose in serum or Urine, with Phioroglucinol. **Clinical Chemistry**, v. 25, n. 8, p. 1440-1443, 1979.
- EMMEL, A.; MATHIAS, A. L.; WYPYCH, F.; RAMOS, L. P. Fractionation of *Eucalyptus grandis* chips by dilute acid-catalysed steam explosion. **Bioresource Technology**, v. 86, p. 105-115, 2003.
- EVANS, R.; WALLIS, A. F. A. Cellulose molecular weights determined by viscosity. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 37, p. 2331-2340, 1989.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood**: chemistry, ultrastructure, reactions. New York: Walter de Gruyter, 1989. 613 p.

FLAUZINO NETO, W. P.; SILVÉRIO, H. A.; DANTAS, N. O.; PASQUINI, D. Extraction and characterization of cellulose nanocrystals from agro-industrial residue - soy hulls. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 480-488, 2013.

GALLARDO, J. C. M.; SOUZA, C. S.; CICARELLI, R. M. B.; OLIVEIRA, K. F.; MORAIS, M. R.; LALUCE, C. Enrichment of a continuous culture of *Saccharomyces cerevisiae* with the yeast *Issatchenkia orientalis* in the production of ethanol at increasing temperatures. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, p. 405-414, 2011.

GIERER, J. The interplay between oxygen-derived radical species in the delignification during oxygen and hydrogen peroxide bleaching. In: SCULTZ, T. P. (Ed.). **Lignin, properties and materials**. Washington, DC: American Chemical Society, 2000. Cap. 21, p. 422-446.

GOSSELINK, R. J. A.; ABÄCHERLI, A.; SEMKE, H.; MALHERBE, R.; KÄUPER, P.; NADIF, A.; VAN DAM, J. E. G. Analytical protocols for characterization of sulphur-free lignin. **Industrial Crops and Products**, v.19, n. 3, p. 271-281, 2004.

HAMES, B. R.; THOMAS, S. R.; SLUITER, A. D.; ROTH, C. J.; TEMPLETON, D. W. Rapid biomass analysis: new tools for compositional analysis of corn stover feed stocks and process intermediates from ethanol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 105, p. 5-16, 2003.

HENRIQUE NETO, S. **A defesa do etanol**: as estratégias da União da Indústria de Cana-de-açúcar (UNICA) frente a US Environmental Protection Agency (EPA), de 2002 A 2010. 2013. 103 f. Dissertação (Mestrado em Relações Internacionais) - Instituto de Filosofia e Ciências Humanas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

HILGEMBERG, E. M.; BACHA, C. J. C. As pressões ambientais e as alterações na demanda e oferta mundial de celulose. **Pesquisa & Debate**, v. 11, n. 2, p. 67-92, 2000.

HU, R.; LIN, L.; LIU, T.; LIU, S. Dilute sulfuric acid hydrolysis of sugar maple wood extract at atmospheric pressure. **Bioresource Technology**. v. 101, p. 3856-3594, 2010.

IOELOVICH, M. Study of cellulose interaction with concentrated solutions of sulfuric acid. **International Scholarly Research Network Chemical Engineering**, v. 2012, p. 1-7, 2012.

IRFAN, M.; SYED, Q.; ABBAS, S.; GULSHER, M.; BAIG, S.; NADEEM, M. FTIR and SEM analysis of thermo-chemical fractionated of sugarcane bagasse. **Turk Journal Biochemistry**, v. 36, n. 4, p. 322-328, 2011.

- JÖNSSON, L. J.; ALRIKSSON, B.; NILVEBRANT, N-O. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 16, p. 1-10, 2013.
- KESHWANI, D. R.; CHENG, J. J.; BURNS, J. C.; LI, L.; CHIANG, V. **Microwave pretreatment of switchgrass to enhance enzymatic hydrolysis**. 2007. Disponível em: <<http://digitalcommons.unl.edu/biosysengpres/35>>. Acesso em: 01 mar. 2014.
- LACHKE, A. H.; SEETA, L. R. Bioethanol from lignocellulosic biomass. Part I. Pretreatment of the substrates. In: PANDEY, A. (Ed.). **Handbook of plant-based biofuels**. 16th ed. Boca Raton: CRC Press, 2009. Cap. 9, p. 121-139.
- LEE, Y. J.; CHUNG, C. H.; DAY, D. F. Sugarcane bagasse oxidation using a combination of hypochlorite and peroxide. **Bioresource Technology**, v.100, p. 935-941, 2009.
- LIU, C. F.; REN, J. L.; XU, F.; LIU, J. J.; SUN, J. X.; SUN, R. C. Isolation and characterization of cellulose obtained from ultrasonic irradiated sugarcane bagasse. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 5742-5748, 2006.
- LIU, L.; SUN, J.; LI, M.; WANG, S.; PEI, H.; ZHANG, J. Enhanced enzymatic hydrolysis and structural features of corn stover by FeCl₃ pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5853-5858, 2009.
- MANSFIELD, S. D.; MOONEY, C.; SADDLER, J. N. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. **Biotechnology Progress**, v. 15, p. 804-816, 1999.
- MARTIN, A. R.; MARTINS, M. A.; MATTOSO, L. H. C.; SILVA, O. R. R. F. Caracterização química e estrutural de fibra de sisal da variedade *Agave sisalana*. **Polímeros Ciência e Tecnologia**, v.19, n.1, p.40-46, 2009.
- MARTIN, S. **Catálise heterogênea**. Rio de Janeiro: Synergia, 2011. 376 p.
- MARTINEZ, A.; RODRIGUEZ, M. E.; YORK, S. W.; PRESTON, J. F.; INGRAM, L. O. Use of UV absorbance to monitor furans in dilute acid hydrolysates of biomass. **Biotechnology Progress**, v.16, p. 637-641, 2000.
- McCLEARY, B. V.; SHAMEER, I.; GLENNIE-HOLMES, M. Measurement of (1 → 3),(1 → 4)-β-D-Glucan. **Methods in Enzymology**, v. 160. p. 545-551, 1988.
- MENG, L. Y. ; KANG, S. M. ; ZHANG, X. M. ; WU, Y. Y. ; XU, F. ; SUN, R. C. Fractional pretreatment of hybrid poplar for accelerated enzymatic hydrolysis: Characterization of cellulose-enriched fraction. **Bioresource Technology**, v.110, p. 308-313, 2012.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

- MORAIS, J. P. S.; ROSA, M. F.; MARCONCINI, J. M. **Procedimentos para análise lignocelulósica**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2010. 54 p.
- NÁPOLES, A. I.; ORTIZ, Y.; VIÑALS, M.; MANGANELLY, E.; ACOSTA, E. Purificación de hidrolizado de bagazo de caña de azúcar con carbón activado y s de intercambio iónico. **Ciencia y Tecnología Alimentaria**, v. 5, n. 2, p. 124-128, 2006.
- NIGAM, J. N. Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. **Journal of Biotechnology**, v. 87, p. 17-27, 2001.
- OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010.
- OLIVEIRA, L. R. M. **Estudo de alternativas de pré-tratamento e hidrólise do bagaço e palha de cana-de-açúcar para obtenção de etanol a partir de celulose**. 2012. 109 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial, Universidade de São Paulo, Lorena, 2012.
- OLIVEIRA, R. L. **Preparação e caracterização de derivados celulósicos obtidos a partir da celulose bacteriana e obtenção de filmes para aplicações óticas**. 2013. 176 f. Tese (Doutorado em Química)- Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.
- PAIVA, J. E.; MALDONADE, I. R.; SCAMPARINI, A. R. P. Xylose production from sugarcane bagasse by surface response methodology. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 13, n.1, p.75-80, 2009.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 69-80, 2000.
- PARK, S.; BAKER, J. O.; HIMMEL, M. E.; PARILLA, P. A.; JOHNSON, D. K. Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n. 10, p. 1-10, 2010.
- PENG, F.; PENG, P.; XU, F.; SUN, R. C. Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 4, p. 879-903, 2012.
- POLETTO, M.; PISTOR, V.; ZATTERA, A. J. Structural characteristics and thermal properties of native cellulose. In: VEN, T. V.; GODBOUT, L. (Ed.). **Cellulose: fundamental aspects**. Rijeka: In Tech, 2013. Cap. 2, p. 45-68.
- PU, Y.; KOSA, M.; KALLURI, U. C.; TUSKAN, G. A.; RAGAUSKAS, A. J. Challenges of the utilization of wood polymers: how can they be overcome? **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, p.1525-1536, 2011.
- RAAD, T. J.; PINHEIRO, P. C. da C.; YOSHIDA, M. I. Equação geral de mecanismos cinéticos da carbonização do *Eucalyptus* spp. **Cerne**, v. 12, n. 2, p. 93-106, 2006.

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

RODRIGUES, R. C. L. B.; ROCHA, G. J. M.; RODRIGUES JUNIOR, D.; IZÁRIO FILHO, H. J.; FELIPE, M. G. A.; PESSOA JUNIOR, A. Scale-up of diluted sulfuric acid hydrolysis for producing sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate (SBHH). **Bioresouruce Technology**, v. 101, p.1247-1253, 2010.

ROMAN, M.; WINTER, W. T. Effect of sulfate groups from sulfuric acid hydrolysis on the thermal degradation behavior of bacterial cellulose. **Biomacromolecules**, v. 5, p. 1671-1677, 2004.

ROSA, M. F.; MEDEIROS, E. S.; MALMONGE, J. A.; GREGORSKI, K. S.; WOOD, D. F.; MATTOSO, L. H. C.; GLENN, G.; ORTS, W. J.; IMAM, S. H. Cellulose nanowhiskers from coconut husk fibers: effect of preparation conditions on their thermal and morphological behavior. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, p. 83-92, 2010.

SAAVEDRA, F.; KARÁCSONYI, Š.; ALFÖLDI, J. Studies of the polysaccharides of sugar cane (*Saccharum officinarum*): structural features of the water-insoluble D-xylans. **Carbohydrate Research**, v. 180, p. 61-71, 1988.

SALDARRIAGA, J. F.; PABLOS, A.; AGUADO, R.; AMUTIO, V.; OLAZA, M. Characterization of lignocellulosic biofuels by TGA. **International Review of Chemical Engineering**, v. 4, n. 6, p. 585-58, 2012.

SANTOS, J. R. A.; GOUVEIA, E. R. Produção de bioetanol de bagaço de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.11, n.1, p. 27-33, 2009.

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

SANTOS, M. L.; LIMA, O. J.; NASSAR, E. J.; CIUFFI, K. J.; CALEFI, P. S. Estudo das condições de estocagem do bagaço de cana-de-açúcar por análise térmica. **Química Nova**, v. 34, n. 3, p. 507-511, 2011.

SAKDARONNARONG, C.; JONGLERTJUNYA, W. Rice straw and sugarcane bagasse degradation mimicking lignocellulose decay in nature: an alternative approach to biorefinery. **Science Asia**, v. 38, p. 364-372, 2012.

SARROUH, B. F.; SILVA, S. S.; SANTOS, D. T.; CONVERTI, A. Technical/economical evaluation of sugarcane bagasse hydrolysis for bioethanol production. **Chemical Engineering Technology**, v. 30, n. 2, p. 270-275, 2007.

SCHUCHARDT, U.; DUARTE, H. C. Hydrolysis of sugar cane bagasse with hydrochloric acid, promoted by metallic cations. **Journal of Chemical Technology Biotechnology**, v. 36, p. 329-334, 1986.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods In Enzymology**, v. 299, p.152-178, 1999.

SILVA, R. N.; MONTEIRO, V. N.; ALCANFOR, J. D. X.; ASSIS, E. M.; ASQUIER, E. R. Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 3, p. 337-341, 2003.

STAMBUK, B. U.; ELEUTHERIO, E. C. A.; FLOREZ-PARDO, L. M.; SOUTO-MAIOR, A. M.; BOM, E. P. S. Brazilian potential for biomass ethanol: challenge of using hexose and pentose co-fermenting yeast strains. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 67, p. 918-926, 2008.

SUN, J. X.; SUN, X. F.; SUN, R. C.; SU, Y. Q. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, p.195-204, 2004a.

SUN, J. X.; SUN, X. F.; ZHAO, H.; SUN, R. C. Isolation and characterization of cellulose from sugarcane bagasse. **Polymer Degradation and Stability**, v. 84, p. 331-339, 2004b.

SUN, X. F.; XU, F.; SUN, R. C.; FOWLER, P.; BAIRD, M. S. Characteristics of degraded cellulose obtained from steam-exploded wheat straw. **Carbohydrate Research**, v.340, p. 97-106, 2005.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, n. 1, p. 1-11, 2002.

TABIL, L.; ADAPA P.; KASHANINEJAD, M. Biomass feedstock pre-processing. Part 1. Pre-treatment. In: BERNARDES, M. A. S. (Ed.). **Biofuel's engineering process technology**. Rijeka: In Tech, 2011. Cap. 18, p. 418-430.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. **BioResources**, v. 2, p. 472-499, 2007.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, n. 9, p. 1621-1651, 2008.

TAN, H.; YANG, R.; SUN, W.; WANG, S. Peroxide-acetic acid pretreatment to remove bagasse lignin prior to enzymatic hydrolysis. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 49, p.1473-1479, 2010.

TEIXEIRA, E. M.; CORRÊA, A. C.; MANZOLI, A.; LEITE, F. L.; OLIVEIRA, C. R.; MATTOSO, L. H. C. Cellulose nanofibers from white and naturally colored cotton fibers. **Cellulose**, v. 17, p. 595-606, 2010.

TEIXEIRA, E. M.; BONDANCIA, T. J.; TEODORO, K. B. R.; CORRÊA, A. C.; MARCONCINI, J. M.; MATTOSO, L. H. C. Sugarcane bagasse whiskers: extraction and characterizations. **Industrial Crops and Products**, v. 33, p. 63-66, 2011.

TERINTE, N.; IBBETT, R.; SCHUSTER, K. C. Overview on native cellulose and microcrystalline cellulose I structure studied by X-ray diffraction (WAXD): comparison between measurement techniques. **Lenzinger Berichte**, v. 89, p. 118-131, 2011.

THALAGALA, T. A. T. P.; KODAMA, S.; MISHIMA, T; ISONO, N.; FURUJYO, A.; KAWASAKI, Y.; HISAMATSU, M. Study on a new preparation of D-glucose rich fractions from various lignocelluloses through a two-step extraction with sulfuric acid. **Journal of Applied Glycoscience**, v. 56, p. 1-6, 2009a.

THALAGALA, T. A. T. P.; KODAMA, S.; MISHIMA, T; ISONO, N.; FURUJYO, A.; KAWASAKI, Y.; HISAMATSU, M. Study on ethanol fermentation using D-glucose rich fractions obtained from lignocelluloses by a two-step extraction with sulfuric acid and *Issatchenkia orientalis* MF 121. **Journal of Applied Glycoscience**, v. 56, p. 7-11, 2009b.

VANI, S.; BINOD, P.; KUTTIRAJA, M.; SINDHU, R.; SANDHYA, S. V.; PREETI, V. E.; SUKUMARAN, R. K.; PANDEY, A. Energy requirement for alkali assisted microwave and high pressure reactor pretreatments of cotton plant residue and its hydrolysis for fermentable sugar production for biofuel application. **Bioresource Technology**, v. 112, p. 300-307, 2012.

WATERHOUSE, A. L. Determination of total phenolics. In: R. E. Wrolstad (Ed.). **Current protocols in food analytical chemistry**. New York: John Wiley & Sons, 2002. p. I1.1/1-I1.1/8.

WERTZ, J. L.; BÉDUÉ, O.; MERCIER, J. P. **Cellulose science and technology**. Boca Raton: EPFL Press, 2010. 364 p.

XU, F.; SUN, R. C.; SUN, J-X.; LIU, C-F.; HE, B-H.; FAN, J-S. Determination of cell wall ferulic and *p*-coumaric acids in sugarcane bagasse. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, p. 207-217, 2005.

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

YAN, Y.; LI, T.; REN, Z.; LI, G. A study on catalytic hydrolysis of peat. **Bioresource Technology**, v. 57, p. 269-273, 1996.

ZHA, Y.; PUNT, P. J. Exometabolomics approaches in studying the application of lignocellulosic biomass as fermentation feedstock. **Metabolites**, v. 3, p. 119-143, 2013.

ZHAO, X-B; WANG, L.; LIU, D-H. Effect of several factors on peracetic acid pretreatment of sugarcane bagasse for enzymatic hydrolysis. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 82, p. 1115-1121, 2007.

ZHU, S.; WU, Y.; YU, Z.; CHENG, Q.; WU, G.; YU, F.; WAG, C.; JIN, S. Microwave-assisted alkali pre-treatment of wheat straw and its enzymatic hydrolysis. **Biosystems Engineering**, v. 94, n. 3, p. 437-442, 2006.

Apêndice 1.
Curvas de dosagem de produtos de hidrólise

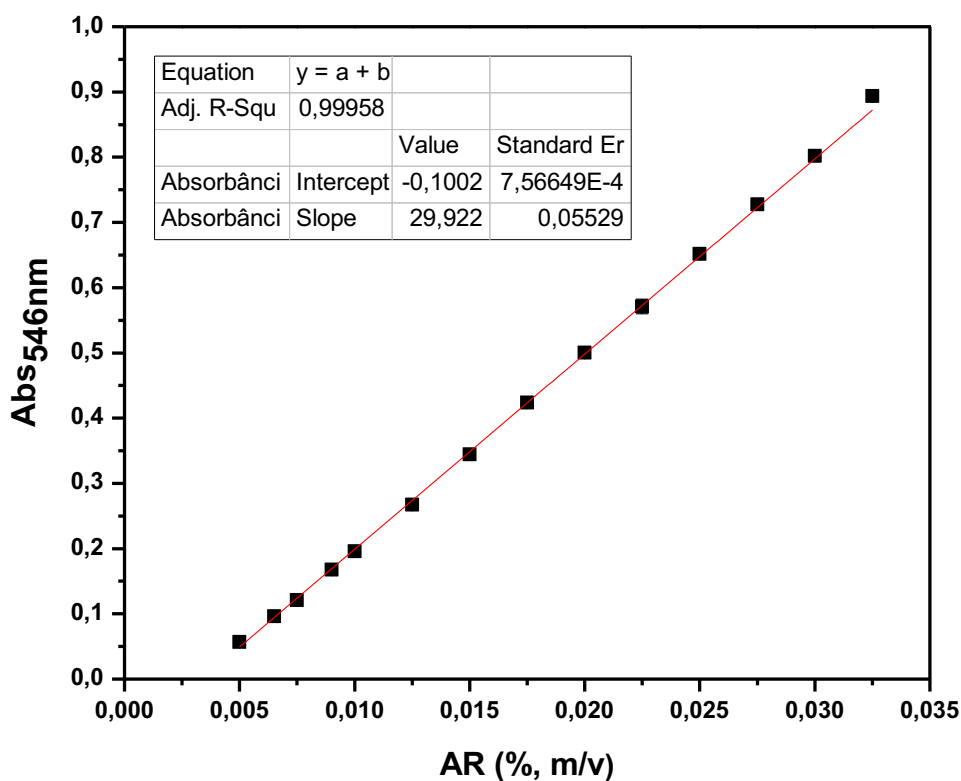


Figura 54. Curva padrão de calibração de glicose 0,1% (m/v) para dosagens de açúcares redutores pelo método DNS (MILLER, 1959). A equação da reta mostrou o seguinte: coeficiente angular $b=29,922$, intercepto da reta $a=-0,1002$ e fator de correlação ($R^2 m=0,99958$), faixa de 0,005 a 0,0325 % de glicose (m/v), equivalente a absorbâncias y de 0,057 a 0,8935 a 570 nm no o espectrofotômetro Bioespectro modelo SP-22.

$$AR\% = (0,0334 * Abs + 0,0033) * diluição$$

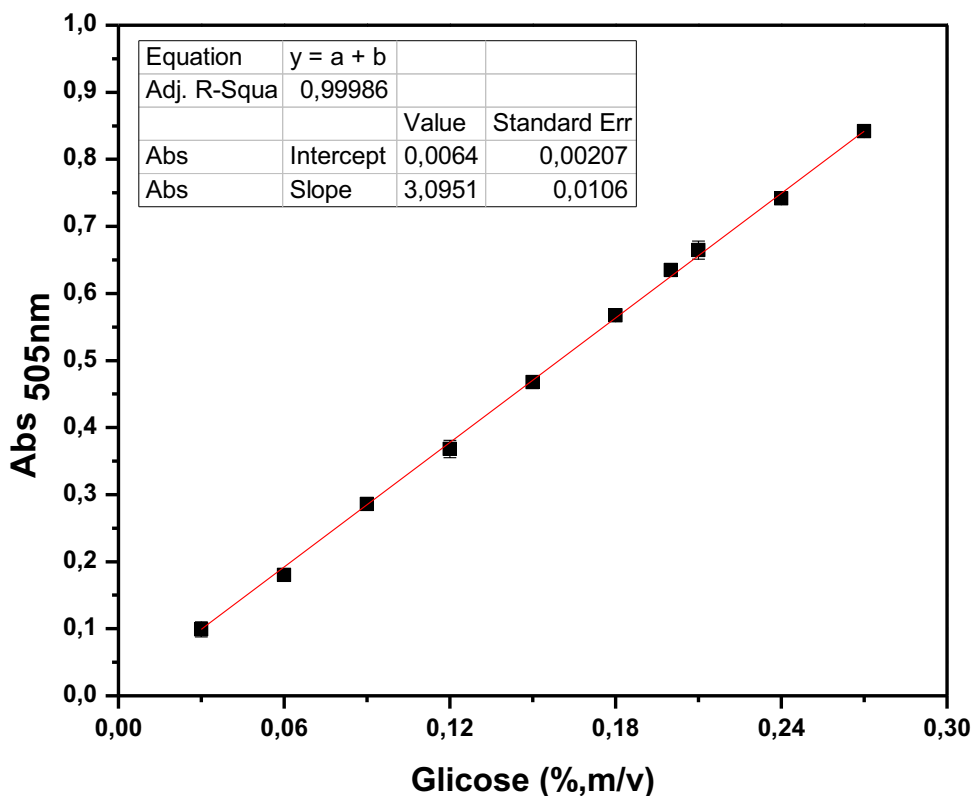


Figura 55. Curva padrão de calibração de glicose 0,1% (m/v) para dosagens de glicose pelo método enzimático da glicose oxidase (McCleary et al., 1988). A equação da reta mostrou o seguinte: coeficiente angular $b=3,09514$, intercepto da reta $a=0,00641$ e fator de correlação (R^2 $m=0,99986$) para o espectrofotômetro Bioespectro modelo SP-22.

$$Gli\% = (0,3231 * Abs + 0,0021) * diluição$$

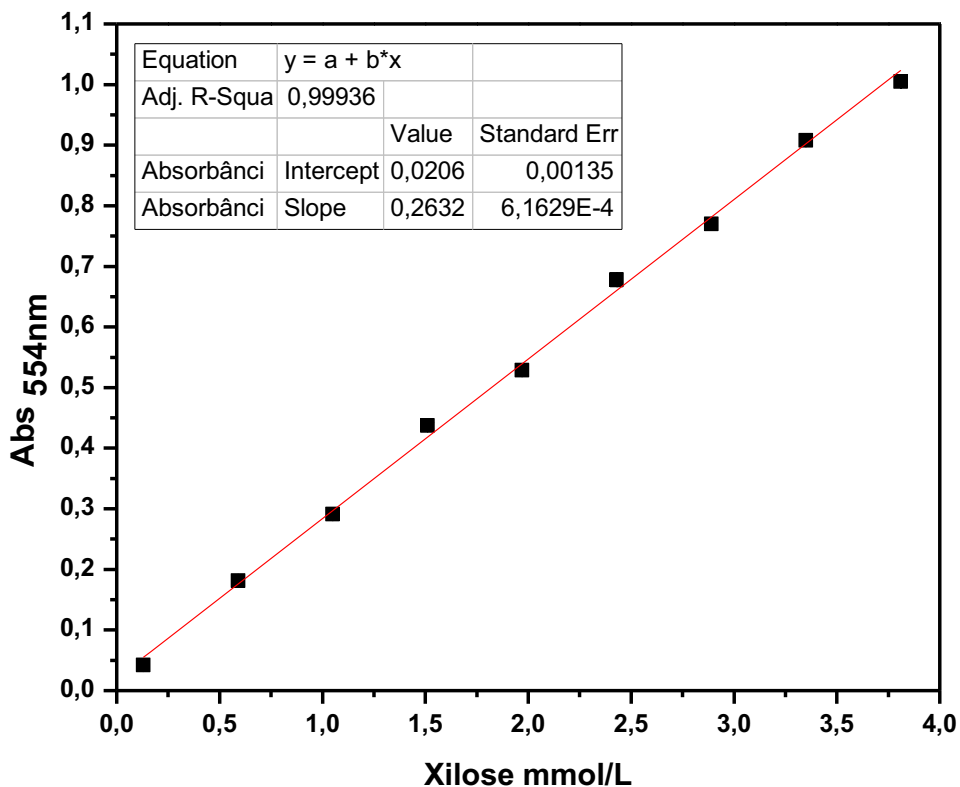


Figura 56. Curva padrão de calibração de xilose (mmol/L) para dosagens de xilose pelo método Floroglucinol (Eberts et al, 1979). A equação da reta mostrou o seguinte: coeficiente angular $b=0,2632$, intercepto da reta $a=0,0206$ e fator de correlação ($R^2 m = 0,99936$) para o espectrofotômetro Bioespectro modelo SP-22.

$$Xilose(mmol / L) = (3,799 * Abs - 0,078) * diluição$$

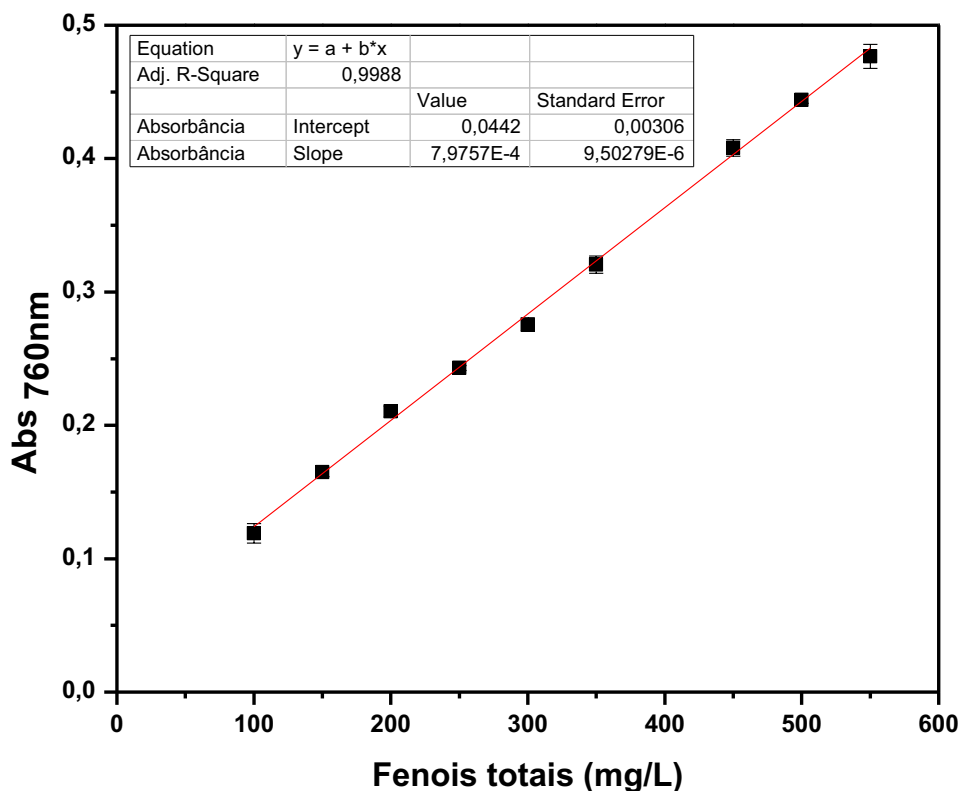


Figura 57. Curva padrão de calibração de fenóis totais (mg/L) para dosagens de Fenóis totais pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteau (Singleton et al., 1999). A equação da reta mostrou o seguinte: coeficiente angular $b=7,9757 \cdot 10^{-4}$, intercepto da reta $a=0,0442$ e fator de correlação ($R^2 = 0,9988$) para o espectrofotômetro Bioespectro modelo SP-22.

$$Fenóis (mg / L) = (1253,80 * Abs - 55,42) * diluição$$

Apêndice 2. Gráficos de Deconvoluções e ajustes de curvas do BCA e BCA pré-tratados

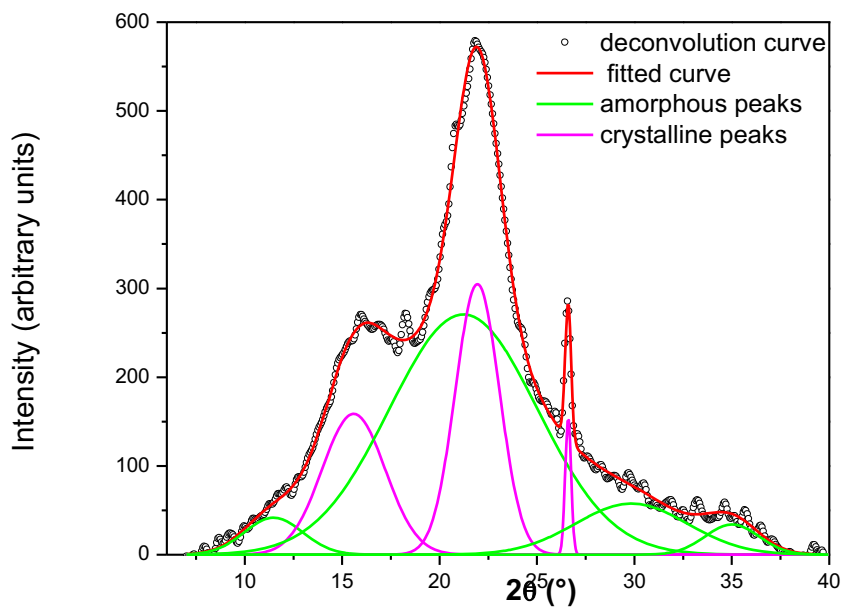


Figura 58. Deconvolução do BCA (Bagaço de cana-de-açúcar)

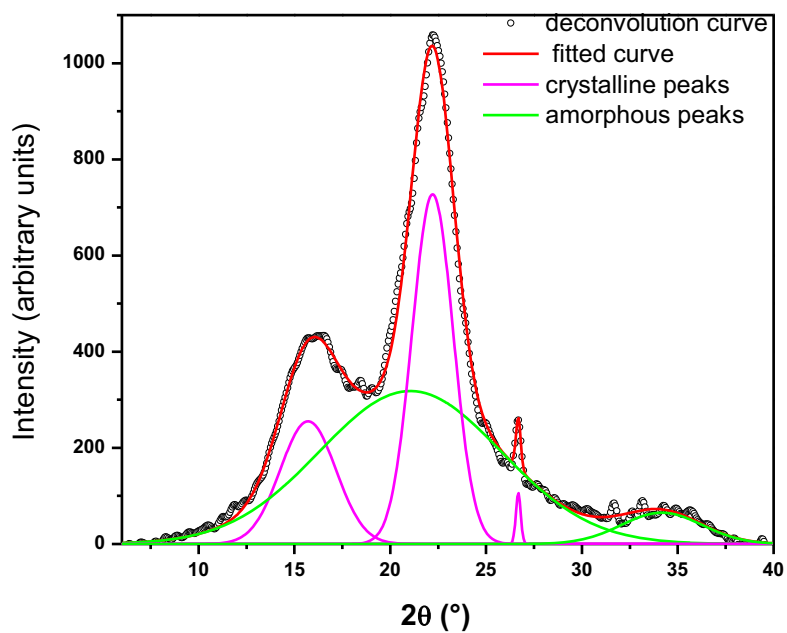


Figura 59. Deconvolução do resíduo do PT1 (Pré-tratamento com peróxido alcalino)

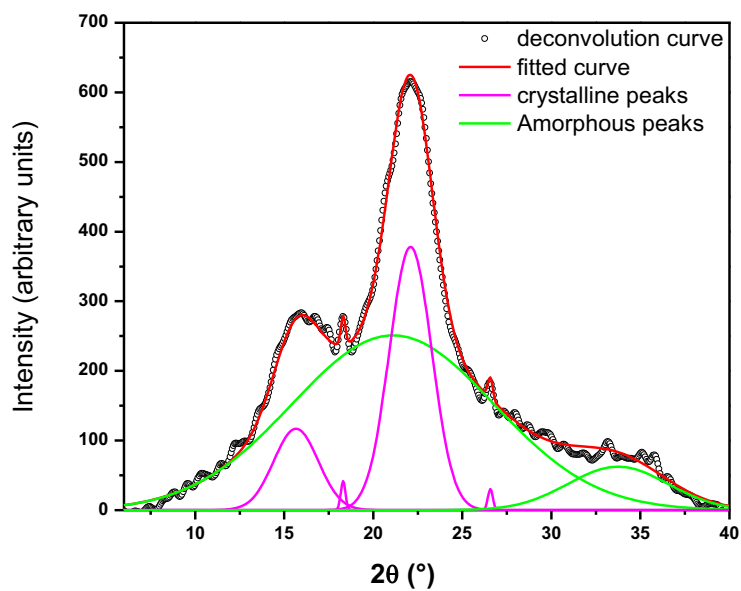


Figura 60. Deconvolução do resíduo do PT2 (Pré-tratamento com hipoclorito de sódio)

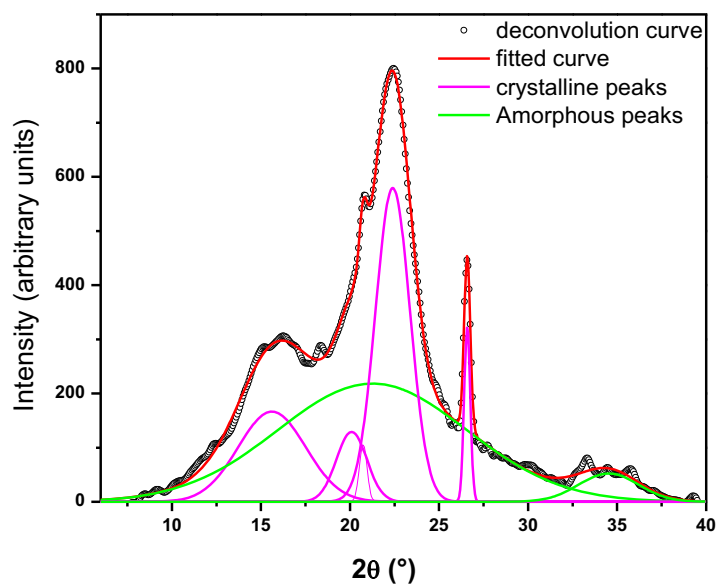


Figura 61. Deconvolução do resíduo do PT3 (pré-tratamento alcalino a temperatura ambiente)

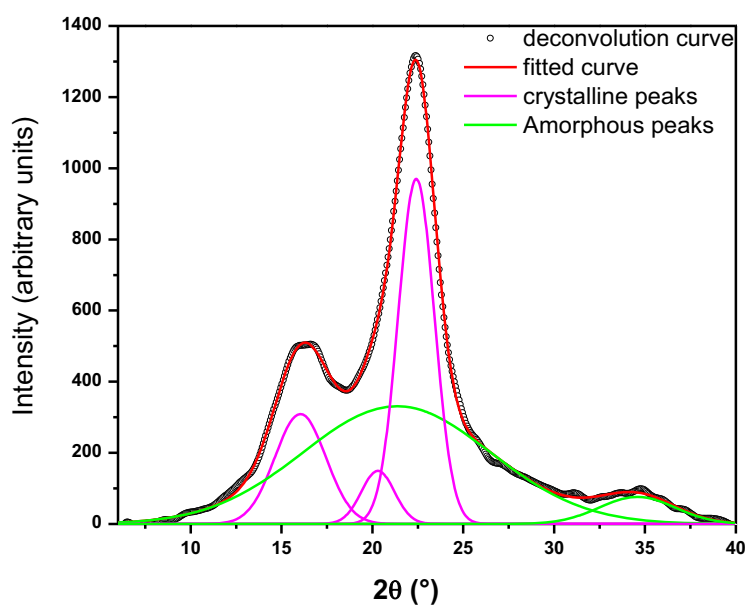


Figura 62. Deconvolução do resíduo do PT4 (pré-tratamento alcalino a 100°C)

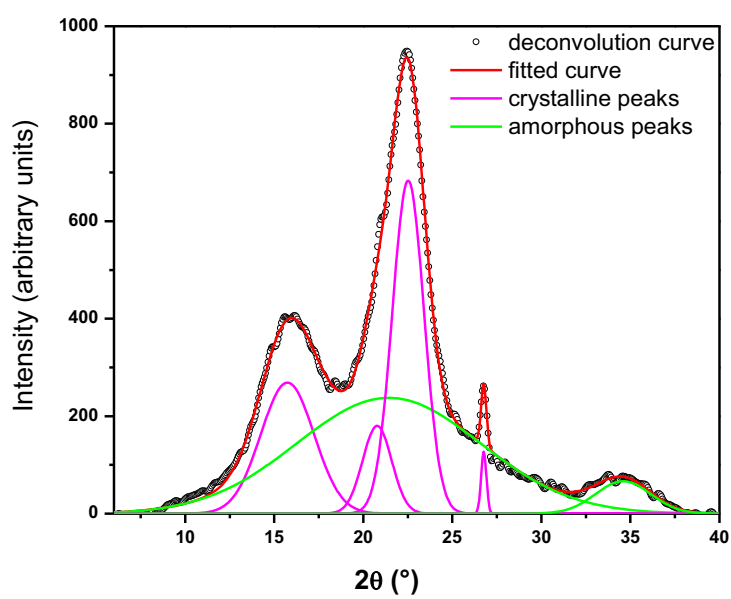


Figura 63. Deconvolução do resíduo do PT5 (pré-tratamento com NaOH seguido de H₂O₂)

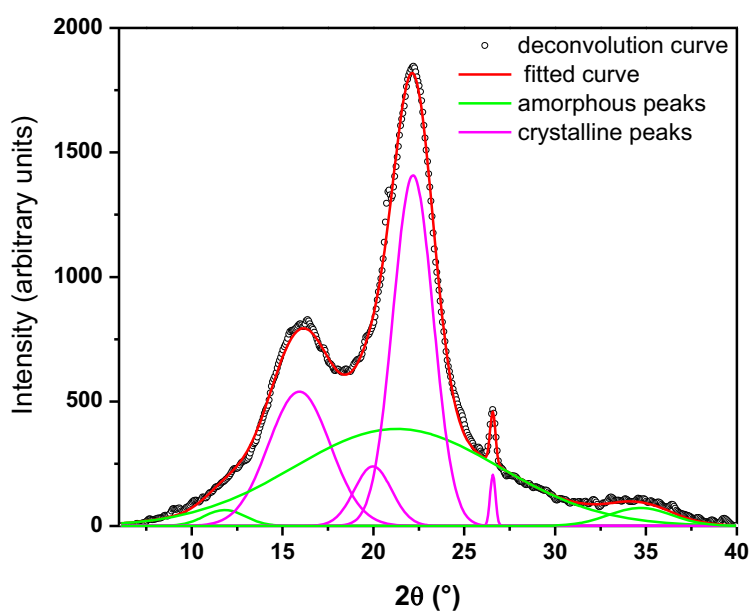


Figura 64. Deconvolução do resíduo do PT6 (Pré-tratamento com álcali assistido com micro-ondas)

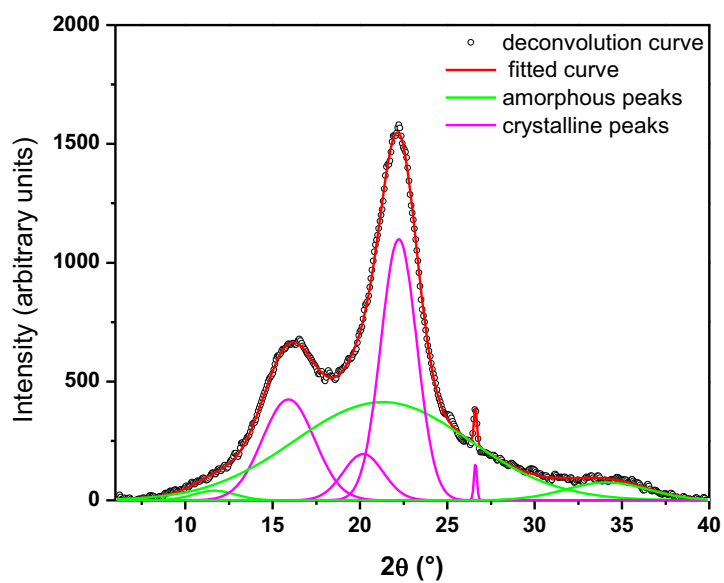


Figura 65. Deconvolução do resíduo do PT7 (Pré-tratamento com álcali assistido com micro-ondas seguido de pré-tratamento com ácido assistido com micro-ondas)

Apêndice 3.

Tabela 10. Liberação de glicose nas frações ricas em celulose dos pré-tratamentos 1, 4, 6 e 7 pela hidrólise ácida com ácido sulfúrico 6% (m/v) em ausência e na presença do co-catalizador FeCl₃.

Frações ricas em celulose	Acido (%)	Tempo (min)	Glicose (mg/g) ^(a)		
			Ácido sulfúrico 6% (m/v)		Ácido sulfúrico 30% (m/v)
			Sem FeCl ₃	Sem FeCl ₃	Com FeCl ₃
PT1	6	180	10,81 ± 0,47	-	-
	30	360	-	7,89 ± 1,34	4,35 ± 0,20
PT4	6	150	13,87 ± 0,69	-	-
		180	11,28 ± 0,74	-	-
	30	180	-	9,64 ± 0,43	8,33 ± 0,68
		360	-	11,66 ± 0,68	ND
PT6	6	150	12,01 ± 0,38	-	-
		180	10,49 ± 1,26	-	-
	30	180	-	40,40 ± 3,04	ND
		360	-	46,25 ± 1,22	ND
PT7	6	180	10,77 ± 0,47	-	-
	30	180	-	43,03 ± 0,91	ND
		360	-	55,62 ± 1,21	ND

^(a) Media determinada em triplicada, determinação estandar (\pm SD), glicose determinada por análises enzimática e expressado em mg/g; ND não detetado.

Tabela 11. Formação de Inibidores da fermentação das frações ricas em celulose dos pré-tratamentos 1, 4, 6 e 7 pela hidrólise ácida com ácido sulfúrico 4 e 6% (m/v) em ausência e na presença do co-catalizador FeCl₃.

Frações ricas em celulose	Tempo (min)	Ácido diluído (% m/v)	Inibidores da fermentação (mg/g) ^(a)			
			Sem FeCl ₃		Com FeCl ₃	
			Fenóis T.	Furanos	Fenóis T.	Furanos
PT1	150	4	3,08 ± 0,39	0,41 ± 0,00	27,79 ± 1,22	0,24 ± 0,03
		6	3,51 ± 0,66	0,65 ± 0,02	29,41 ± 3,87	0,15 ± 0,02
	180	4	3,60 ± 0,26	0,50 ± 0,02	34,28 ± 0,98	0,26 ± 0,02
		6	3,14 ± 0,47	0,68 ± 0,02	38,87 ± 2,29	0,11 ± 0,02
PT4	150	4	3,84 ± 0,46	0,34 ± 0,02	24,86 ± 1,62	0,19 ± 0,02
		6	5,04 ± 0,84	1,21 ± 0,06	46,06 ± 2,16	0,38 ± 0,04
	180	4	3,28 ± 0,32	0,48 ± 0,02	24,03 ± 6,32	0,22 ± 0,04
		6	3,50 ± 0,27	1,13 ± 0,01	50,38 ± 1,06	0,39 ± 0,03
PT6	150	4	7,19 ± 0,51	0,59 ± 0,02	32,29 ± 1,41	0,29 ± 0,01
		6	7,35 ± 0,68	1,54 ± 0,03	53,79 ± 1,75	0,80 ± 0,10
	180	4	6,78 ± 0,28	0,43 ± 0,02	35,53 ± 1,32	0,42 ± 0,02
		6	5,77 ± 0,39	1,21 ± 0,22	79,89 ± 0,39	0,30 ± 0,10
PT7	150	4	9,53 ± 0,42	0,82 ± 0,00	16,81 ± 2,24	0,50 ± 0,07
		6	9,16 ± 1,38	0,87 ± 0,02	36,85 ± 3,63	0,44 ± 0,04
	180	4	9,16 ± 0,43	1,29 ± 0,20	13,72 ± 1,14	0,67 ± 0,06
		6	9,38 ± 0,65	1,01 ± 0,02	39,71 ± 4,29	0,54 ± 0,06

^(a) Média determinada em triplicada, determinação estandar (\pm SD) dos análises químicos para determinar fenóis totais (Martinez et al., 2000) e furanos (Singleton et al., 1999)

Tabela 12. Formação dos Inibidores da fermentação das frações ricas em celulose dos pré-tratamentos 1, 4, 6 e 7 pela hidrólise ácida com ácido sulfúrico 30% (m/v) em ausência e presença do co-catalizador FeCl₃.

Frações ricas em celulose	Tempo (min)	Inibidores (mg/g) ^(a)			
		Sem FeCl ₃		Com FeCl ₃	
		Fenóis totais	Furanos	Fenóis totais	Furanos
PT1	180	0,93 ± 0,05	0,64 ± 0,06	5,72 ± 0,16	0,13 ± 0,04
	360	1,46 ± 0,10	1,80 ± 0,10	2,52 ± 0,10	0,23 ± 0,05
PT4	180	0,93 ± 0,07	0,41 ± 0,02	5,76 ± 0,28	ND
	360	1,03 ± 0,03	1,22 ± 0,09	16,18 ± 0,29	0,32 ± 0,06
PT6	180	5,96 ± 0,23	0,84 ± 0,01	13,28 ± 1,77	0,80 ± 0,06
	360	6,55 ± 0,12	2,20 ± 0,01	14,37 ± 1,13	0,37 ± 0,10
PT7	180	11,92 ± 0,36	0,35 ± 0,00	5,22 ± 0,12	0,07 ± 0,01
	360	5,15 ± 0,31	0,46 ± 0,00	12,01 ± 0,32	0,37 ± 0,06

^(a) Media determinada em triplicada, determinação estandar (\pm SD) dos análises químicos para determinar fenóis totais e furanos; ND não detetado.