



UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA
E MUCURI
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCOMBUSTÍVEIS



RENATA VIDAL DOS SANTOS

PRÉ-TRATAMENTO ORGANOSSOLVE DO BAGAÇO
DA CANA-DE-AÇÚCAR COM GLICERINA BRUTA
PARA OBTENÇÃO DE AÇÚCARES
FERMENTESCÍVEIS

Uberlândia

2018

RENATA VIDAL DOS SANTOS

PRÉ-TRATAMENTO ORGANOSSOLVE DO BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR
COM GLICERINA BRUTA PARA OBTENÇÃO DE AÇÚCARES
FERMENTESCÍVEIS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis UFJM/UFU, da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Biocombustíveis.

Área de concentração: Processos químicos e bioquímicos aplicados à conversão de biomassas a biocombustíveis.

Orientador: Dr. Daniel Pasquini
Co-orientador: Dr. Leandro Vinicius Alves Gurgel

Uberlândia

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S237p
2018

Santos, Renata Vidal dos, 1993-
Pré-tratamento organossolve do bagaço da cana-de-açúcar com
glicerina bruta para obtenção de açúcares fermentescíveis [recurso
eletrônico] / Renata Vidal dos Santos. - 2018.

Orientador: Daniel Pasquini.

Coorientador: Leandro Vinicius Alves Gurgel.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.307>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Biocombustíveis. 2. Bagaço de cana. 3. Biomassa. 4. . I. Pasquini,
Daniel, 1974- (Orient.). II. Gurgel, Leandro Vinicius Alves (Coorient.).
III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em
Biocombustíveis. IV. Título.

CDU: 662.756

Maria Salete de Freitas Pinheiro - CRB6/1262



**Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-Graduação em
Biocombustíveis, do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia
DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO, NÚMERO 022/PPBIC.**

DATA: 21/08/2018

DISCENTE: Renata Vidal dos Santos

MATRÍCULA: 11622PGB006

TÍTULO DO TRABALHO: "PRÉ-TRATAMENTO ORGANOSSOLVE DO BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR COM GLICERINA BRUTA PARA OBTENÇÃO DE AÇÚCARES FERMENTESCÍVEIS".

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Biocombustíveis

LINHA DE PESQUISA: Processos químicos e bioquímicos aplicados à conversão de biomassas a biocombustíveis.

PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO:

Às nove horas do dia vinte e um de agosto do ano de dois mil e dezoito, no(a) Auditório Prof. Dr. Manuel Gonzalo Hernández-Terrones, piso superior do Bloco 51 no Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Harumi Otaguro, da(o) Instituto de Química, da Universidade Federal de Uberlândia, e Adilson Cândido da Silva, do(a) Universidade Federal de Ouro Preto, e Daniel Pasquini, professor(a) orientador(a) e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o(a) presidente da mesa apresentou o(a) candidato(a) e a Banca Examinadora, agradeceu a presença do público e discorreu sobre as normas e critérios para a realização desta sessão, baseadas no Regulamento do Programa PPBIC. Em seguida, o(a) presidente da mesa concedeu a palavra ao(à) candidato(a) para a exposição do seu trabalho e, em sequência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir o(a) apresentador(a). A duração da apresentação e o tempo de arguição e resposta deram-se conforme as normas do Programa. Ultimada a arguição, desenvolvida dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais e Aprovou o(a) candidato(a). Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho

será

MANTIDO

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento do estabelecido nas normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU. As correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de 30 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 11 horas e 30 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.

Prof(a). Dr(a). Harumi Otaguro

Prof(a). Dr(a). Adilson Cândido da Silva

Prof(a). Dr(a). Daniel Pasquini

*Dedico essa dissertação aos meus amados
pais Rosenilda e Adimar, aos meus
irmãos Gabriele e João Pedro e a minha
vó Mariana, pelo incentivo e apoio em
todos os momentos dessa caminhada.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** por ter sido meu refúgio nos momentos difíceis e por ter me dado forças para concluir mais essa importante etapa de minha vida.

Aos meus pais **Rosenilda e Adimar**, pelo apoio e por sempre me incentivarem a conquistar os meus sonhos, aos meus irmãos **Gabriele e João Pedro** pelo carinho, amor e alegrias compartilhadas ao longo desses dois anos e ao meu cunhado **Luís Gustavo**, obrigada pelas risadas.

A meu orientador **Profº. Daniel Pasquini**, por toda paciência, empenho e dedicação com que sempre me orientou nesse trabalho, minha sincera gratidão e consideração.

Ao meu Co-orientador **Profº. Leandro Vinicius Alves Gurgel**, pelas contribuições e empenho que sempre teve em ajudar-me.

Aos colegas de Ouro Preto que me acolheram muito bem e me ajudaram durante minha estadia, em especial a **Elisa** que com carinho sempre me ajudou quando necessitei.

Aos amigos do Labrepol pelo carinho e em especial a **Ingrid e Michelle**, sem dúvida devo muito dessa conquista a vocês, obrigada por não medirem esforços em me ajudar.

Agradeço aos bons e velhos amigos que sempre estiveram ao meu lado **Rafaela e Djalma**, obrigada por vibrarem comigo cada conquista e por serem os melhores incentivadores que pudesse ter e por entenderem cada ausência durante esse período.

Aos amigos que ingressaram comigo no mestrado, **Marcelo, Laís, Mônica, Mirian, Ricardo, Celson, Jean, Renata, Buiatte**, obrigada pela partilha de ideias.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram e torceram para a realização desse trabalho.

A todos vocês muito obrigada!

“Em algum lugar, alguma coisa incrível
está esperando para ser descoberta”

Carl Sagan

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	3
2.1 Objetivos gerais e específicos.....	3
3. REFERENCIAL TEÓRICO	4
3.1 Cana-de-açúcar: uma fonte de energia renovável	4
3.2 Biomassa lignocelulósica	5
3.3 Características estruturais da biomassa lignocelulósica e a recalcitrância.....	6
3.4 Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica	7
3.5 Solvente orgânico: Glicerol bruto	9
3.6 Hidrólise enzimática	10
4. METODOLOGIA.....	12
4.1 Matéria prima usada para o estudo	12
4.2 Planejamento experimental	14
4.3 Pré- tratamento organossolve do bagaço de cana-de-açúcar	16
4.4 Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar bruto	17
4.4.1 Teor de umidade	17
4.4.2 Teor de extractivos	17
4.4.3 Teor de cinzas	19
4.4.4 Determinação do teor de lignina Klason insolúvel	19
4.4.5 Determinação do teor de lignina Klason solúvel	20
4.4.6 Determinação do teor de celulose e hemiceluloses	21
4.5 Caracterização do substrato após pré-tratamento organossolve	21
4.5.1 Determinação da perda de massa e rendimento após pré-tratamento	21
4.5.2 Determinação do teor de umidade	22
4.5.3 Determinação do teor de lignina Klason insolúvel e solúvel	22
4.5.4 Porcentagem de desligificação	22
4.5.5 Correção dos resultados de celulose, hemiceluloses e lignina de acordo com o rendimento	23

4.5.6 Determinação do teor de celulose e hemiceluloses	23
4.6 Caracterização morfológica.....	23
4.6.1 Difração de raio-x (DRX).....	23
4.6.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	24
4.7 Hidrólise Enzimática	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1 Aspecto físico	25
5.2 Composição química do bagaço de cana-de-açúcar	26
5.3 Pré-tratamento organossolve do bagaço de cana-de-açúcar	27
5.3.1 Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado.....	27
5.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	41
5.5 Difração de raio-x (DRX)	46
5.6 Hidrólise enzimática	50
5.7 Análise de Glicose (C6) e Xilose (C5) nos açúcares redutores totais (ART).....	54
6. CONCLUSÕES	58
7. REFERÊNCIAS	59

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Estrutura da Microfibrila Celulósica	7
FIGURA 2. Efeito do Pré-tratamento sob a biomassa	8
FIGURA 3. Representação da reação de transesterificação	10
FIGURA 4. Fluxograma representando as etapas realizadas no trabalho	13
FIGURA 5. Sistema usado na deslignificação organossolve: A) Reator de aço inoxidável B) Banho termostático contendo glicerina como fluido de aquecimento	16
FIGURA 6. Amostra do bagaço de cana <i>in natura</i> e pré-tratado	26
FIGURA 7. Diagrama de Pareto para o pré-tratamento organossolve do bagaço de cana-de-açúcar considerando as variáveis, temperatura (°C), tempo (min) e RSL em função da resposta rendimento e perda de massa	30
FIGURA 8. Gráfico de superfície com resposta perda de massa relacionado com tempo e temperatura	31
FIGURA 9. Gráfico de superfície com resposta perda de massa relacionado com temperatura e RSL	31
FIGURA 10. Diagrama de Pareto considerando os efeitos das variáveis T (°C), t (min) e RSL sobre a Celulose (%)	33
FIGURA 11. Gráfico de superfície considerando o teor de celulose em função do t (min) e T(°C) de pré-tratamento	34
FIGURA 12. Gráfico de superfície considerando t(min) x RSL e T(°C) x RSL	35
FIGURA 13. Diagrama de Pareto para hemiceluloses	36
FIGURA 14. Gráfico de superfície considerando teor de hemiceluloses em função do t (min) x T (°C)	37
FIGURA 15. Gráfico de superfície considerando o teor de hemiceluloses em função da RSL x T(°C)	37
FIGURA 16. Gráfico de superfície considerando o teor de lignina em função da T (°C) x t(min)	38
FIGURA 17. Gráfico de superfície considerando o teor de lignina em função da	

T (°C) e RSL	39
FIGURA 18. Diagrama de Pareto para porcentagem de deslignificação	40
FIGURA 19. Gráfico de superfície relacionando T(°C) x t (min) em função da porcentagem de deslignificação	40
FIGURA 20. Microscopia eletrônica de varredura do bagaço sem tratamento e pré-tratado	42
FIGURA 21. Difratogramas obtidos para a amostra <i>in natura</i> e após o pré-tratamento	46
FIGURA 22. Diagrama de Pareto para o índice de cristalinidade (ICr)	49
FIGURA 23. Gráfico de superfície relacionando a cristalinidade com a T (°C) x t (min)	50
FIGURA 24. Diagrama de Pareto para a concentração de ART considerando os efeitos de temperatura e tempo de pré-tratamento	51
FIGURA 25. Superfícies de resposta geradas a partir do modelo quadrático apresentando a relação da temperatura e tempo com a concentração de ART.....	52
FIGURA 26. Diagrama de Pareto considerando as variáveis temperatura (°C), tempo (min) e RSL em função da resposta concentração de glicose	55
FIGURA 27. Gráfico de superfícies relacionando concentração de glicose com tempo (min) x T (°C)	56
FIGURA 28. Diagrama de Pareto considerando as variáveis temperatura (°C), tempo (min) e RSL em função da resposta xilose	57

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Composição química da biomassa lignocelulósica	6
TABELA 2. Variáveis independentes estudadas	15
TABELA 3. Matriz de experimentos utilizada no Planejamento Doehlert (condições experimentais usadas no pré-tratamento organossolve do BC)	15
TABELA 4. Composição química do bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> (%)	26
TABELA 5. Composição do bagaço pré-tratado e dados obtidos após pré-tratamento	28
TABELA 6. Valores da caracterização química do bagaço pré-tratado corrigidos pelo rendimento do pré-tratamento	29
TABELA 7. Índice de Cristalinidade (ICr).....	48
TABELA 8. Concentração de ART (mg/mL) obtida após 72 h de hidrólise	50
TABELA 9. Concentração obtida de glicose e xilose após hidrólise enzimática	54

LISTA DE ABREVIACÕES

2G – Segunda Geração

ART - açúcares redutores totais

BC – Bagaço de cana-de-açúcar

BB – Bagaço de cana-de-açúcar bruto

DNS - ácido 3,5-dinitrosalicílico

DRX - Difração de Raio-X

eq - equação

FPU - Filter paper unit

IC – índice de Cristalinidade

NaOH – Hidróxido de Sódio

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

PTFC - Politetrafluoretileno

RSL – Razão sólido-líquido

T – Temperatura (°C)

t – Tempo (min)

RESUMO

Em decorrência da diminuição da dependência de combustíveis fósseis, a biomassa lignocelulósica é uma das principais alternativas para diversificação da matriz energética mundial. Dentre as biomassas, o bagaço da cana-de-açúcar tem se tornado atraente em virtude do cenário cada vez mais crescente de produção de cana-de-açúcar e do seu potencial de ser convertido em açúcares fermentescíveis para a produção de etanol de segunda geração (2G). Neste trabalho, avaliou-se o pré-tratamento organossolve com glicerol bruto, como solvente de deslignificação do bagaço de cana e a obtenção de açúcares fermentescíveis por hidrólise enzimática, visando a produção de etanol de 2G. As condições experimentais foram definidas por um planejamento experimental do tipo Doehlert (2³), com três variáveis independentes: temperatura (°C), tempo (min) e razão sólido-líquido (RSL) (mL/g). No total 15 experimentos foram realizados, sendo três repetições do ponto central. As reações de pré-tratamento foram realizadas utilizando como solvente uma mistura de água-glicerol bruto na proporção de 80:20 (80 mL glicerol/ 20mL de água), em um reator tubular (tipo autoclave) de aço inox sob diferentes temperaturas (150, 160, 170, 180, 190, 200 e 210°C), tempo (30, 60, 90, 120 e 150 min) e razão sólido-líquida (6, 8 e 10). A eficiência do pré-tratamento foi avaliada através de caracterização morfológica e química da fração sólida obtida, hidrólise enzimática pela quantificação de açúcares redutores totais (ART), além da quantificação de açúcares fermentescíveis como a xilose e a glicose via Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). A fração sólida foi caracterizada quanto ao rendimento final após pré-tratamento e em relação ao teor de deslignificação, remoção de hemiceluloses e obtenção de celulose. A melhor condição de deslignificação 210°C/60 min/8 (mL/g) foi para a amostra 9 que teve 79,02 % de deslignificação e concentração de glicose de 59,49 g/L. A condição de pré-tratamento que obteve o maior percentual de celulose, 82,49%, foi para a amostra 1, pré-tratada nas seguintes condições: 180°C/150 min/8 (mL/g), sendo essa, a amostra que alcançou a maior conversão enzimática, 412,35 (mg/mL) de açúcares redutores totais (ART), com a utilização de carga de enzimas relativamente baixa 10FPU/g de celulose. Outras amostras pré-tratadas em condições diferentes estabelecidas no planejamento também alcançaram conversão satisfatória de açúcares redutores totais. Quando analisado os açúcares fermentescíveis como a glicose, a amostras 9 e 10 foram as que apresentaram melhores concentrações de glicose correspondendo as 59,49 g/L e 59,75g/L respectivamente. De modo geral, o pré-tratamento organossolve com glicerol bruto favoreceu a hidrólise enzimática do substrato pré-tratado, as análises de MEV e Raio-x (DRX) mostraram que o pré-tratamento removeu lignina e hemiceluloses da fibra vegetal do bagaço de cana, abrindo a estrutura altamente recalcitrante da biomassa.

PALAVRAS-CHAVE: Bagaço de cana-de-açúcar, pré-tratamento, glicerol-bruto.

ABSTRACT

As a result of the decrease in dependence on fossil fuels, lignocellulosic biomass is one of the main alternatives for the diversification of the world energy matrix. Among biomasses, sugarcane bagasse has become attractive due to the growing scenario of sugarcane production and its potential to be converted into fermentable sugars for the production of second generation ethanol (2G). In this work, the organosolve pretreatment with crude glycerol, as a solvent for the delignification of the sugarcane bagasse and the obtaining of fermentable sugars by enzymatic hydrolysis, aiming at the production of 2G ethanol was evaluated. Experimental conditions were defined by Doehlert (23) experimental design, with three independent variables: temperature (°C), time (min) and solid-liquid ratio (RSL) (mL/g). A total of 15 experiments were performed, with three replicates of the central point. Pretreatment reactions were performed using a 80:20 crude water-glycerol mixture (80 mL glycerol / 20 mL water) as solvent in a stainless steel tubular reactor (autoclave type) under different temperatures (150, 160, 170, 180, 190, 200 and 210° C), time (30, 60, 90, 120 and 150 min) and solid-liquid ratio (6, 8 and 10). The efficiency of the pretreatment was evaluated through the morphological and chemical characterization of the solid fraction obtained, enzymatic hydrolysis by the quantification of total reducing sugars (ART), as well as the quantification of fermentable sugars such as xylose and glucose via High Efficiency Liquid Chromatography (CLAE). The solid fraction was characterized as the final yield after pretreatment and in relation to the delignification content, removal of hemicelluloses and obtaining cellulose. The best delignification condition 210°C/60 min/8(mL/g) was for sample 9 which had 79.02% of delignification and glucose concentration of 59.49 g/L. The pretreatment condition that obtained the highest percentage of cellulose, 82.49%, was for sample 1, pretreated under the following conditions: 180 ° C/150 min / 8 (mL / g), sample that achieved the highest enzymatic conversion, 412.35 (mg / mL) of total reducing sugars (ART), using the relatively low enzyme loading 10FPU / g cellulose. Other samples pre-treated under different conditions established in the planning also achieved satisfactory conversion of total reducing sugars. When analyzed fermentable sugars such as glucose, samples 9 and 10 presented the best glucose concentration corresponding to 59.49 g/L and 59.75 g/L, respectively. In general, pre-treatment with crude glycerol favored the enzymatic hydrolysis of the pretreated substrate, the SEM and X-ray (XRD) analyzes showed that pretreatment removed lignin and hemicelluloses from the plant fiber of sugarcane bagasse, opening up the highly recalcitrant structure of biomass.

KEY WORDS: Sugarcane bagasse, pre-treatment, crude glycerol.

1. Introdução

Com a crescente preocupação envolvendo o esgotamento das reservas naturais de petróleo e carvão mineral, seja por motivos econômicos, geopolíticos ou ambientais, todo o mundo tem incentivado a busca por fontes alternativas de energia, como os combustíveis renováveis (BASTOS, 2007).

Dentre os combustíveis renováveis que ganharam maior destaque mundial, tem-se o etanol de 1^a geração (1G), que pode ser obtido a partir do processamento e fermentação de cana-de-açúcar (sacarose), milho (amido), beterraba (sacarose), batata (amido), dentre outros. O etanol, até o momento mostrou-se um combustível com capacidade para atender à crescente demanda por energia renovável de baixo custo e com baixo poder poluente (SANTOS *et al.*, 2012). Os EUA é o maior produtor de etanol de milho, em seguida vem o Brasil que é o segundo maior produtor, no entanto a matéria prima utilizada é a cana-de-açúcar, juntos produzindo 75% do bioetanol do mundo (IEA, 2010).

O Brasil, tem sido o pioneiro na produção de etanol a partir da cana-de-açúcar e novos desenvolvimentos surgiram principalmente com a criação de variedades genéticas que permitem uma maior produtividade por hectare, técnicas de moagem e extração do caldo da cana-de-açúcar mais eficiente, além de leveduras com maior capacidade de fermentação alcóolica(CANILHA *et al.*, 2012).

Segundo a Conab (Companhia Nacional de Abastecimento), a produção de cana-de-açúcar na safra 2016/17, foi de 694,54 milhões de toneladas, sendo que a área colhida foi de 9,1 milhões de hectares, o que representa um aumento de 5,3% quando comparada com a safra 2015/2016 (CONAB, 2016). Para cada tonelada de cana-de-açúcar esmagada nas usinas de álcool e açúcar, estima-se que cerca de 250-280 kg de bagaço de cana contendo 50% de umidade sejam produzidos (MEIGHAN *et al.*, 2017). Dessa forma, em virtude do cenário crescente de produção de cana-de-açúcar, novas tecnologias de processamento do bagaço para sua transformação em açúcares fermentescíveis para a produção de etanol de segunda geração (etanol 2G) devem ser desenvolvidas e otimizadas, a fim de explorar o potencial que essa biomassa apresenta para produção de energia.

A biomassa lignocelulósica é quimicamente constituída, em média, de 35-50% de celulose, 20-35% de hemiceluloses e 10-25% de lignina, além de apresentar uma pequena quantidade de cinzas e extractivos, sendo que essa composição varia conforme

o tipo de biomassa (SANTOS *et al.*, 2012). Apesar de existirem tecnologias de extração da celulose, a maioria delas apresenta dificuldades técnicas ou econômicas. Nesse sentido, um dos grandes desafios que envolve a produção de bioetanol celulósico é desestruturação da parede celular da biomassa, visando a liberação dos polissacarídeos como fonte de açúcares fermentescíveis de forma eficiente e que seja economicamente viável (SANTOS *et al.*, 2012).

Para o isolamento dos principais componentes da biomassa é necessário um pré-tratamento, a fim de separar os componentes e facilitar o acesso a celulose, hemiceluloses e lignina, que deve ser removida, pois interfere no processo de fermentação devido a sua complexidade estrutural e resistência a degradação biológica e química. Existem várias opções disponíveis de pré-tratamento, e dois dos principais mais utilizados são o hidrotérmico – conhecido também como autohidrólise, que é usado para a remoção das hemiceluloses e fragmentação da lignina, permitindo que a celulose se torne mais acessível para a hidrólise enzimática, e a deslignificação, usada para a remoção da lignina (MEIGHAN *et al.*, 2017).

Dentro do contexto e da motivação apresentada, o foco do presente trabalho foi investigar um processo vantajoso e mais utilizado para a deslignificação da biomassa lignocelulósica, o processo organossolve. Nesse processo uma mistura de solventes orgânicos e água é usada para decompor e solubilizar os constituintes da biomassa, em especial a lignina e parte das hemiceluloses e frações de celulose. Em geral, os solventes mais utilizados nesse processo são as misturas metanol-água, etanol-água, acetona-água, etilenoglicol-água, em elevadas temperaturas (CHIARAMONTI *et al.*, 2012). O glicerol subproduto da produção de biodiesel tem se mostrado um solvente em potencial para o pré-tratamento organossolve.

O Brasil se destaca na cadeia de produção de biodiesel, chegando a ser o segundo maior produtor e consumidor do mundo. O biodiesel é considerado um combustível verde, obtido principalmente da transesterificação de óleos vegetais catalisada por bases como o hidróxido de potássio ou de sódio, na presença de metanol ou etanol formando ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos (PEITER *et al.*, 2016). De acordo com a ANP em março de 2018 o Conselho Nacional de Política Energética (CNPE) aprovou a mistura de 10 % de biodiesel (B10) ao óleo diesel vendido ao consumidor final, o que gerou a expectativa de crescimento de produção e consumo de biodiesel em 1 bilhão de litros neste ano (MME, 2018).

Portanto, o principal subproduto da produção do biodiesel é o glicerol, sendo que a geração desse corresponde cerca de 10% da produção total de biodiesel.

O glicerol puro, conhecido popularmente como glicerina, encontra muitas aplicações na indústria farmacêutica, cosmética, alimentícia e química (VASCONCELOS, 2012). O processo de purificação é considerado caro, enquanto que o glicerol bruto tem baixo valor agregado e poucas aplicações (MEIGHAN *et al.*, 2017).

No processo organossolve para deslignificação da biomassa, a utilização de glicerol puro se faz pouco atrativo devido ao elevado valor que esse produto adquire depois de purificado, e poucos estudos são encontrados empregando-se glicerol bruto. Portanto, o propósito do trabalho foi investigar a utilização de glicerol bruto no processo de pré-tratamento organossolve da biomassa de cana-de-açúcar e verificar a influência das variáveis: temperatura, tempo de reação, razão sólido-líquido (RSL) no processo de pré-tratamento e hidrólise enzimática da biomassa.

2. Objetivos

2.1 Objetivos gerais

O objetivo geral do presente trabalho foi utilizar glicerol bruto - subproduto oriundo da produção de biodiesel, como solvente para deslignificação do bagaço da cana-de-açúcar pelo processo organossolve e investigar o efeito dessa deslignificação na obtenção de açúcares fermentescíveis após hidrólise enzimática visando a produção de etanol 2G.

Objetivos específicos:

- Verificar a influência de condições experimentais, tais como, temperatura, tempo de reação, razão sólido-líquido no pré-tratamento organossolve;
- Caracterizar o substrato obtido após processo organossolve em relação ao teor de lignina, celulose, hemiceluloses e alterações nas fibras;
- Verificar se o processo de deslignificação, usando como solvente orgânico a mistura glicerol bruto/água, favorece a hidrólise enzimática.
- Quantificar o teor de açúcares redutores totais (ART) após a hidrólise enzimática do bagaço de cana deslignificado e posteriormente quantificar os açúcares fermentescíveis xilose e glicose.

3. Referencial Teórico

3.1 Cana-de-açúcar: uma fonte de energia renovável

Em decorrência da diminuição da dependência de combustíveis fósseis, a biomassa lignocelulósica é uma das principais alternativas para diversificação da matriz energética mundial. Do ponto de vista energético, a biomassa é considerada como sendo todo recurso renovável proveniente de matéria orgânica (de origem animal ou vegetal) que pode ser utilizada na produção de energia (ANEEL, 2008).

Nos últimos anos as pessoas têm tomado uma maior conscientização sobre os danos que a utilização de combustíveis fosseis trazem para o meio ambiente. Em decorrência de efeitos indesejáveis, estudos voltados para a área de combustíveis renováveis têm ganhado destaque, principalmente na área de biocombustíveis. Nesse contexto, a indústria sucroalcooleira torna-se favorável, pois o álcool é um combustível ecologicamente correto não afetando a camada de ozônio, além de ser um combustível renovável (CONAB, 2017).

Aspectos históricos sobre a produção de etanol no Brasil, mostram que o ponto mais alto de incentivo à produção foi em meados da década 1970, com a criação do Programa Nacional do Álcool (Proálcool) pelo governo brasileiro. Um dos objetivos principais do programa foi minimizar a dependência do Brasil em relação ao petróleo importado, pois o país importava aproximadamente 80% do petróleo consumido, o que representava 50% da balança comercial na época (LEITE e CORTEZ, 2008). Assim, a liderança mundial na produção de álcool foi conquistada pelo Brasil, que teve na primeira fase do programa um aumento na produção anual de álcool de 600 milhões de litros por ano em 1975-1976 para 3,4 bilhões de litros nos anos de 1979-1980 (CORTEZ *et al.*, 2016).

Atualmente, o Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, o que é de grande importância para o agronegócio brasileiro. As áreas onde ocorrem a maior produção se concentra nas regiões Centro-Sul e Nordeste do Brasil. A produção de cana-de-açúcar estimada na safra de 2016/2017 atingiu 657,18 milhões de toneladas. Desse total, a produção de açúcar atingiu 38,69 milhões de toneladas, a produção de etanol se manteve acima de 27,80 bilhões de litros, sendo de etanol anidro 11,07 bilhões de litros e de etanol hidratado 16,73 bilhões de litros. A estimativa para produção na safra 2017/2018 é de 647,6 milhões de toneladas, redução de 1,5% em relação à safra anterior (CONAB, 2017).

3.2 Biomassa Lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica é uma das fontes de energia que apresentou grande potencial de crescimento nos últimos anos. Em decorrência da diminuição da dependência de combustíveis fósseis, ela é uma das principais alternativas para diversificação da matriz energética mundial. Nos últimos anos esforços tem sido concentrados no desenvolvimento de processos que sejam economicamente viáveis para o aproveitamento dos componentes lignocelulósicos da biomassa (resíduos agrícolas, palha e bagaço de cana-de-açúcar, resíduos florestais, entre outros) para produção de etanol combustível de segunda geração (2^aG). A biomassa lignocelulósica é composta majoritariamente de três macromoléculas, sendo elas: celulose, hemiceluloses e lignina (SANTOS *et al.*, 2012).

A celulose é o principal constituinte da parede celular da biomassa lignocelulósica, sendo o polissacarídeo mais abundante representando cerca de 40-60% da parede celular da planta. Ela é formada por unidades de β -D-glicose, unidas por ligação glicosídica β -1,4, dando origem a um homopolímero linear resistência à tensão, o que a torna insolúvel em água e em grande número de solventes (SANTOS *et al.*, 2012).

Já as hemiceluloses, diferente da celulose, são formadas por várias unidades de açúcares, como as hexoses (D-manose e D-galactose), as pentoses (D-xilose e D-arabinose), dentre outras, sendo compostas por cadeias ramificadas de baixa massa molecular e recobrindo a celulose nos tecidos vegetais (FRANCO, 2010).

A lignina depois da celulose, é a macromolécula mais abundante na biomassa lignocelulósica. Sua estrutura é complexa, formada por três unidades diferentes de fenilpropanos. A lignina protege os elementos vasculares e funciona como um elemento suporte na parede celular, conferindo resistência e rigidez mecânica às plantas (MEIGHAN *et al.*, 2017).

A composição química da biomassa lignocelulósica depende da fonte, sendo que além dos três componentes majoritários, água e outros componentes com baixo teor como proteínas e minerais podem ser encontrados na composição da parede celular. A Tabela 1 apresenta os principais tipos de biomassa lignocelulósica e sua composição em porcentagem de celulose, hemiceluloses e lignina.

Tabela 1. Composição química da biomassa lignocelulósica.

Biomassa lignocelulósica	% Celulose	% Hemiceluloses	% Lignina
Palha de cana	40 – 44	30 – 32	22 – 25
Bagaço de cana	32 – 48	19 – 24	23 – 32
Madeira dura	43 – 47	25 – 35	16 – 24
Madeira mole	40 – 44	25 – 29	25 – 31
Talo de milho	35	25	35
Espiga de milho	45	35	15
Algodão	95	2	0,3
Palha de trigo	30	50	15
Sisal	73,1	14,2	11
Palha de arroz	43,3	26,4	16,3
Forragem de milho	38 – 40	28	7 – 21
Fibra de coco	36 – 43	0,15 – 0,25	41 – 45
Fibra de bananeira	60 – 65	6 – 8	5 – 10
Palha de cevada	31 – 45	27 – 38	14 – 19

Fonte: SANTOS et al., 2012 (Adaptada)

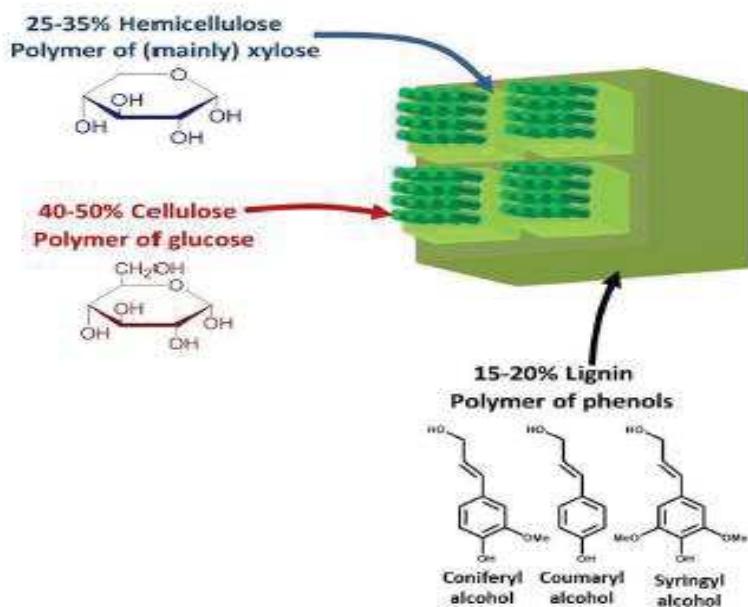
3.3 Características estruturais da biomassa lignocelulósica e a recalcitrância

A maior fonte de carboidratos naturais do mundo é a biomassa lignocelulósica. No entanto, converter esses carboidratos em insumos químicos é difícil em virtude das características químicas e morfológicas da mesma. Como ressaltado anteriormente, os componentes majoritários da biomassa são a celulose, as hemiceluloses e a lignina. As fibras de celulose são envoltas em uma matriz amorfa de hemiceluloses e lignina, que age como uma barreira natural ao ataque de enzimas e/ou microrganismos, e faz com que estruturalmente esses materiais sejam pouco reativos ou rígidos (SANTOS *et al.*, 2012).

Outra característica da biomassa lignocelulósica é a recalcitrância que a mesma apresenta, sendo difícil desestruturá-la e convertê-la em monossacarídeos fermentescíveis. Os grupos OH – hidroxilas, presentes na estrutura da celulose são responsáveis por estabelecer ligações de hidrogênio intramoleculares o que confere resistência à mesma, além de interações intermoleculares entre as hidroxilas das moléculas de celulose, que são responsáveis pela formação da fibra vegetal.

Na superfície das microfibrilas, conforme exibido na Figura 1, as hemiceluloses se ligam recobrindo a celulose e formando o domínio celulose-hemiceluloses da parede celular. Além disso, a presença de hemiceluloses e lignina envolvendo as cadeias de celulose acabam dificultando a entrada de reagentes e catalisadores, sendo necessária a remoção destes componentes para que as enzimas possam acessar a celulose (SANTOS *et al.*, 2012).

Figura 1: Estrutura da microfibrila da biomassa vegetal



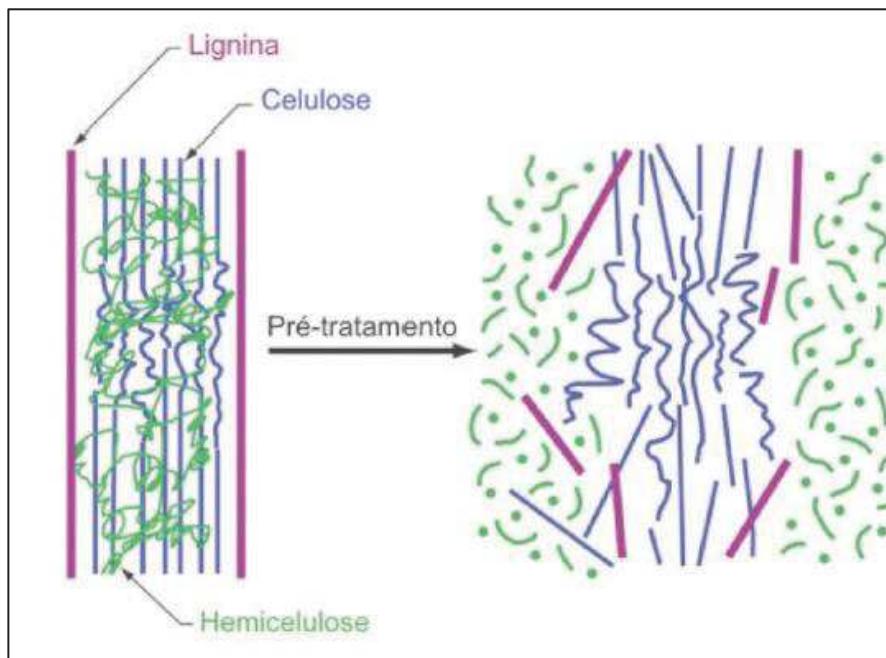
Fonte: GALLO *et al.*, (2017)

3.4 Pré- tratamento da biomassa

Como a biomassa lignocelulósica apresenta natureza recalcitrante, é necessário que uma etapa de pré-tratamento seja realizada, para que o acesso à celulose seja maior, facilitando a hidrólise enzimática (MEIGHAN *et al.*, 2017). O pré-tratamento visa separar e facilitar o acesso aos principais componentes da biomassa (celulose, hemiceluloses e lignina), conforme representado na figura 2, e eventualmente a remoção da lignina. Segundo Chiaramonti *et al.*, (2012), algumas características são desejadas e/ou esperadas de um pré-tratamento, entre elas:

- Reduzir o tamanho das partículas do material lignocelulósico;
- Maximizar a recuperação de celulose;
- Obter um substrato suscetível a hidrólise enzimática;
- Ter baixo investimento e custo operacional.

Figura 2: Efeito do pré-tratamento sobre biomassa



Fonte: SANTOS *et al.*, (2012)

Na literatura, diversos autores têm descrito técnicas de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, como os pré-tratamentos físicos, químicos, biológicos ou a combinação entre eles. Dentre os processos químicos, pode-se destacar os processos organossolve.

No processo organossolve, utiliza-se uma mistura de solventes orgânicos com água a temperaturas que variam de 170 a 250°C, com o intuito de tratar a biomassa lignocelulósica e remover a lignina, que atua como uma barreira física para as enzimas que podem ser adsorvidas irreversivelmente por ela (MEIGHAN *et al.*, 2017). Neste processo, pode-se ter a presença de um catalisador ácido ou básico e emprega-se solventes orgânicos como o metanol, etanol, acetona, etilenoglicol, entre outros (MAGALHÃES, 2011).

O pré-tratamento organossolve tem atraído atenção significativa, devido sua capacidade de fracionamento dos componentes da biomassa. Por outro lado, a escolha do solvente a ser utilizado no processo pode restringir o seu desenvolvimento em função do custo elevado dos solventes orgânicos, o que acaba não sendo industrialmente favorável. Portanto, é crucial identificar um solvente orgânico de baixo valor e com ponto de ebulição alto para o desenvolvimento eficiente do processo organossolve (SUN *et al.*, 2016).

Durante o pré-tratamento em elevadas temperaturas, a hidrólise dos grupos acetila forma ácidos orgânicos como o ácido acético, que gera acidez suficiente no meio reacional para

hidrolisar parte da lignina, que é solubilizada no solvente orgânico, bem como as hemiceluloses que são removidas parcialmente ou completamente (MEIGHAN *et al.*, 2017).

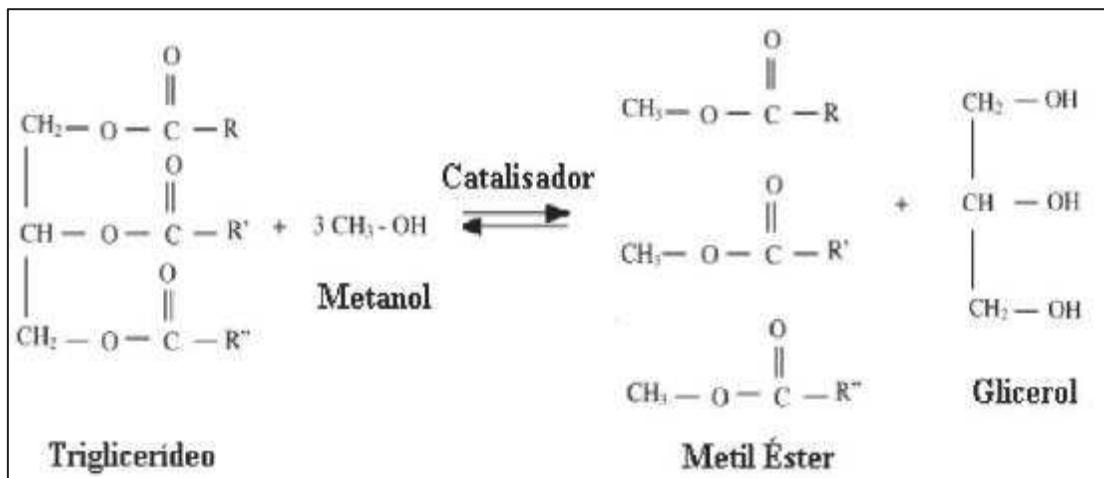
Para que a lignina se fragmente, deve ocorrer uma clivagem solvolítica das ligações α -e β -aril-éter. Os fragmentos formados apresentam baixa polaridade, sendo transportados pelo solvente orgânico para o meio da reação. Quando o processo é finalizado, a fração sólida da biomassa deve ser lavada com o solvente orgânico a fim de remover os fragmentos de lignina que ficam aderidos à superfície da fibra. A redução no teor de lignina da biomassa leva a uma redução considerável na quantidade de enzimas que serão necessárias na fase de hidrólise da celulose, o que contribui para diminuir o custo operacional da produção de etanol 2G (MEIGHAN *et al.*, 2017).

3.5 Solvente Orgânico: Glicerol Bruto

O glicerol é um solvente orgânico de alto ponto de ebulição, subproduto da indústria oleoquímica, que tem se tornado muito atraente como solvente para o pré-tratamento organossolve. Atualmente, a produção de biodiesel tem se tornado cada vez mais crescente, o que fará com que a produção de glicerol se torne abundante com grande excesso de oferta em um futuro muito próximo (SUN *et al.*, 2016).

O glicerol é obtido pelo processo de transesterificação de óleos, que podem ser de origem vegetal (cerca de 80%) e gorduras animais, sendo um subproduto na produção de biodiesel. A transesterificação é uma reação que ocorre entre um triglicerídeo e um álcool na presença de um catalisador produzindo uma mistura de ácidos graxos e glicerol (MATTOS, 2014), conforme representado pela Figura 3.

Figura 3: Representação da reação de transesterificação



Fonte: MATTOS, 2014

O glicerol bruto obtido a partir de gordura animal, como o sebo bovino é de menor qualidade devido ao elevado teor de ácidos graxos saturados. Ele apresenta um elevado ponto de ebulição e elevada viscosidade, contendo até mesmo partículas sólidas. Essas características fazem com que ele tenha baixo valor agregado no mercado (MATTOS, 2014).

Nas plantas de produção de biodiesel, o glicerol é o principal subproduto formado. Em uma planta, 85% do triglicerídeo gera o biodiesel e 10% gera glicerol. O glicerol bruto tem baixo valor agregado sendo que nos últimos anos seu preço tem decaído tanto no mercado nacional como internacional (MATTOS, 2014).

3.6 Hidrólise Enzimática

Para obtenção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica, os polissacarídeos obtidos após a etapa de pré-tratamento (celulose e hemiceluloses) devem passar por uma etapa de hidrólise para obtenção de açúcares fermentescíveis (WOLF, 2011). Na hidrólise de celulose, são formados os dissacarídeos de celobiose e glicose. Já na hidrólise de lignina e hemiceluloses, gera-se açúcares e subprodutos, como os difenóis, cetonas, furfural e ácido acético, que muitas vezes são inibidores da fermentação microbiana (OGEDA; PETRI, 2010).

A hidrólise de material lignocelulósico pode ser ácida ou enzimática. No processo de hidrólise ácida, utiliza-se ácido sulfúrico ou ácido clorídrico em diferentes variações de temperaturas e tempos de reação e as soluções usadas podem ser de alta ou baixa concentração. Esse processo é eficiente na produção de açúcares fermentescíveis. No entanto, pode gerar

produtos de degradação dos açúcares, o que acaba afetando no rendimento final e podendo causar problemas de inibição microbiana (KIIPPER, 2009).

Já a hidrólise enzimática, é um processo onde utiliza-se um complexo enzimático para a obtenção de açúcares fermentescíveis. O processo enzimático é bastante vantajoso, sendo possível obter altos rendimentos em condições brandas de temperatura, pressão e pH. Para a hidrólise da celulose são empregadas enzimas celulolíticas, denominadas celulases (WOLF, 2011).

As celulases são um complexo enzimático, que está subdividido em três classes: as endo-1,4- β -D-glucanases ou endoglucanases que agem quebrando as cadeias da celulose e formando novos terminais. Sua ação ocorre nas regiões amorfas da celulose e de seus derivados, através da hidrólise de ligações glicosídicas β -(1,4); as exo-1,4- β -D-glucanases ou celobio-hidrolases que atuam nos terminais formados produzem a celobiose, e por último as 1,4- β -D-glucosidases são responsáveis por hidrolisar a celobiose em glicose(OGEDA.; PETRI, 2010).

A hidrólise enzimática do material lignocelulósico deve ocorrer em condições favoráveis, podendo ser limitada por fatores tais como:

- A estrutura altamente cristalina da celulose dificulta o acesso da enzima aos sítios ativos;
- A celulase adsorve fisicamente sobre a lignina, restringindo a hidrólise;
- A lignina esconde a superfície celulósica impedindo o intumescimento das fibras.

Portanto, para que a hidrólise enzimática produza um rendimento satisfatório é necessário que a biomassa seja submetida a uma etapa de pré-tratamento. A hidrólise quando realizada em biomassa *in natura* normalmente apresenta rendimento inferior a 20%, enquanto que se uma etapa de pré-tratamento for incluída o rendimento pode alcançar valores maiores que 90% (OGEDA; PETRI, 2010).

4.0 Metodologia

4.1 Matéria prima usada para o estudo

O bagaço de cana *in natura*, utilizado neste estudo foi obtido do município de Ponte Nova, no estado de Minas Gerais. O mesmo foi coletado na pilha de rejeito de bagaço de cana da empresa sucroalcooleira Jatiboca, durante a safra 2015/2016.

O bagaço de cana-de-açúcar foi coletado com uma umidade de aproximadamente 50%, sendo submetido após coleta a um processo de lavagem com água destilada a 60°C por um

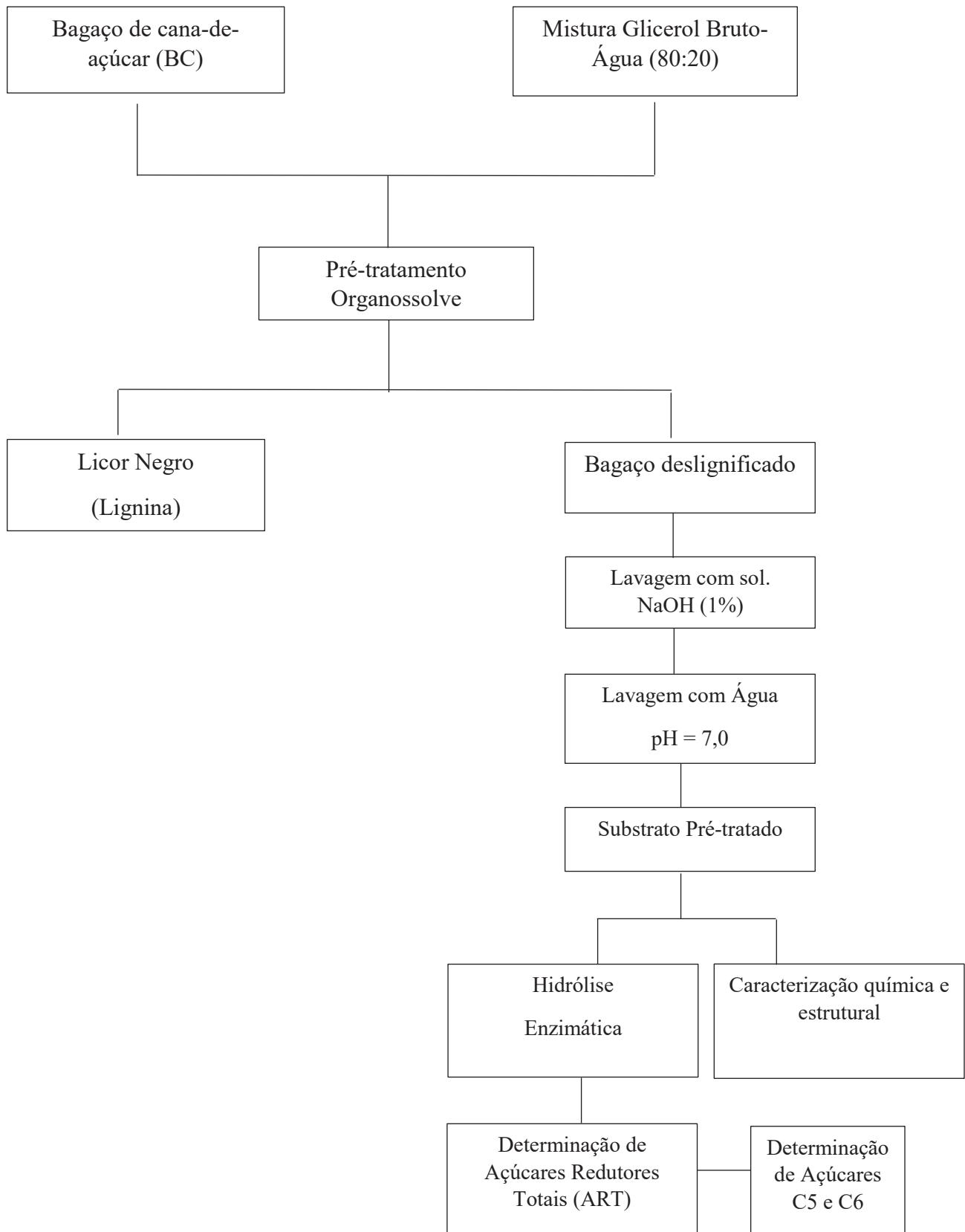
período de 1 h, que visou à remoção dos açúcares residuais do processo de moagem da cana-de-açúcar feito pela usina e consequentemente, uma melhor preservação do material durante o armazenamento. Após esse procedimento o bagaço de cana-de-açúcar foi espalhado para secagem natural durante aproximadamente 15 dias, até que sua umidade atingisse valores próximos de 10 %.

O glicerol bruto utilizado nesse estudo foi proveniente da Usina Caramuru, situada na cidade de Ipameri, no Estado do Goiás - GO. Sua produção foi via reação de transesterificação de óleo de soja e sebo bovino com metanol e foi utilizado como catalisador básico uma solução aquosa de metilato de sódio (30%). Sendo neutralizado com soluções de Ácido Clorídrico (32%) e Hidróxido de sódio (50%).

O teor de glicerina presente no glicerol bruto foi de 80%, sendo que a caracterização foi realizada via Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

As etapas executadas durante a realização deste trabalho são apresentadas por fluxograma (Figura 4).

Figura 4: Fluxograma representando as etapas realizadas no trabalho



Fonte: Autora

4.2 Planejamento Experimental

4.2.1 Planejamento experimental Doehlert

Nesse estudo, optou-se em utilizar um planejamento Doehlert ou Matriz Doehlert, pois o mesmo vem sendo estudado por outros autores como NOVO *et al.*, (2011), que utilizaram glicerol puro para o pré-tratamento organossolve de bagaço de cana-de-açúcar e MEIGHAN *et al.*, (2017) que estudaram o efeito do fracionamento de biomassa de bagaço de cana-de-açúcar por dois pré-tratamentos (auto hidrólise e a deslignificação organossolve com glicerol puro). Além disso, o planejamento do tipo Doehlert permite avaliar diferentes níveis de interação em relação aos planejamentos ortogonais, sendo que ao se comparar esse tipo de planejamento com um ortogonal como o 2^3 com composto central, o planejamento Doehlert permite avaliar vários níveis entre os extremos e o ponto central sendo possível fazer afirmações de regiões experimentais que o planejamento ortogonal não permite, por não apresentar pontos experimentais entre os extremos e o ponto central. Portanto, a resposta do planejamento do tipo Doehlert para otimização é mais rica do que outros planejamentos ortogonais.

A matriz de planejamento Doehlert apresentada na Tabela 3 foi construída (15 experimentos com 3 repetições do ponto central), com três variáveis independentes: temperatura (T, °C), tempo (t, min), razão sólido-líquido (RSL, mL/g), sendo que a temperatura (T, °C) foi variada em 7 níveis, o tempo (t, min) em 5 níveis e a razão líquido-sólido em 3 níveis (Tabela 2). As variáveis dependentes analisadas nesse estudo foram: rendimento, extensão da deslignificação, teor de lignina, celulose residual e conversão enzimática, conforme MEIGHAN *et al* (2017).

Tabela 2: Variáveis independentes estudadas

Variáveis		Níveis do tempo				
		-1	-0,5	0	0,5	1
Tempo (t, min)		30	60	90	120	150
Temperatura (T, °C)		Níveis da temperatura				
		-0,866	-0,577	-0,289	0	0,289
		150	160	170	180	190
		200	210			
RSL (mL/g)		Níveis da razão líquido-sólido				
		-0,817		0		0,817
		6		8		10

Tabela 3. Matriz de experimentos utilizada no Planejamento Doehlert (condições experimentais usadas no pré-tratamento organossolve do BC)

Ensaio	Tempo (min)	Temperatura (°C)	RSL (g/mL)
1	150	180	8
2	120	210	8
3	120	190	10
4	30	180	8
5	60	150	8
6	60	170	6
7	120	150	8
8	120	170	6
9	60	210	8
10	90	200	6
11	60	190	10
12	90	160	10
13	90	180	8
14	90	180	8
15	90	180	8

O planejamento experimental foi desenvolvido para verificar quais variáveis foram significativas para o pré-tratamento proposto, além de estabelecer as melhores condições para

remoção significativa de lignina, a melhor relação RLS, bem como, verificar os melhores resultados para alcançar um ponto máximo na hidrólise enzimática.

4.3 Pré-tratamento organossolve do bagaço de cana-de-açúcar

O pré-tratamento do bagaço de cana foi realizado no Laboratório de Química Tecnológica e Ambiental, localizado na cidade de Ouro Preto - MG. As reações de deslignificação foram realizadas em um reator tubular (tipo autoclave) de aço inox 316 L, cuja tampa do reator possui um anel de vedação feito de politetrafluoretileno (PTFE), que assegura uma vedação apropriada combinada com resistência à elevadas temperaturas (Figura 5).

O reator foi carregado com 30 gramas de bagaço de cana-de-açúcar seco e, em seguida, uma mistura aquosa de glicerol bruto e água na proporção 80 glicerol/20 água, seguindo as condições pré-estabelecidas no planejamento experimental (Tabela 3), foi adicionada ao mesmo. O aquecimento do reator foi realizado utilizando-se um banho térmico com controle digital de temperatura, preenchido por glicerina (fluído de aquecimento) e o resfriamento foi efetuado em banho de gelo assim que o tempo de reação foi atingido (NOVO et al. 2011).

Figura 5: Sistema usado na deslignificação organossolve: A) Reator de aço inoxidável B) Banho termostático contendo glicerina como fluido de aquecimento



Fonte: Autora

Os licores obtidos após a deslignificação foram armazenados para posterior recuperação das ligninas. Já as polpas passaram por um processo de desfibramento, onde as fibras foram separadas umas das outras e lavadas com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1% (em massa), para remoção da lignina aderida na superfície da fibra.

4.4 Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar bruto

Os procedimentos metodológicos realizados para caracterização do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* são descritos a seguir.

4.4.1 Teor de Umidade

Determinou-se o teor de umidade das amostras pelo método da estufa de acordo com a norma TAPPI T264 OM-88 modificada. A determinação foi realizada em triplicata. Pesou-se cerca de 1,0000 g da amostra (com aproximação de 0,002 g) em um vidro relógio de massa conhecida, em uma balança SHIMADZU® modelo AY220.

Colocou-se o vidro relógio com a amostra em estufa a 105 ± 3 °C por aproximadamente 2 horas. Em seguida, arrefeceu-se o vidro relógio em um dessecador até a temperatura ambiente por 1 hora e realizou-se a pesagem. Posteriormente, colocou-se a amostra novamente na estufa por uma hora, repetiu-se o resfriamento e a pesagem por períodos sucessivos de hora em hora até que as pesagens não variassem por mais de 0,002 g.

O teor de umidade, tanto para o bagaço pré-tratado quanto para o bruto (BB), foi determinado a partir da diferença do percentual entre a massa de amostra inicial e a massa de amostra após o processo de secagem, conforme a Eq. 1. Os experimentos foram conduzidos em triplicata.

$$\text{Teor de umidade (\%)} = ((mu - ms)/mu) \times 100 \quad (\text{eq.1})$$

Onde:

mu = a massa (g) de amostra úmida.

ms = a massa (g) de amostra seca.

4.4.2 Teor de Extrativos

a) Determinação do teor de extrativos solúveis em água

Pesou-se 5,0000 g de amostra (com precisão de 0,001g) e submeteu-se a uma extração em um extrator soxhlet, utilizando-se 150,0 mL de água destilada por um período de 50 horas, conforme norma TAPPI T204 cm-97 com pequenas modificações.

Este procedimento foi realizado em triplicata e o teor de extrativos solúveis em água quente foi determinado com base na diferença em massa da amostra seca antes e depois do processo de extração, conforme Eq. 2.

$$\text{Teor de extractivos (\%)} = ((ma - md)/ma) \times 100 \text{ (eq. 2)}$$

Onde:

ma = a massa(g) de amostra antes da extração.

md = a massa (g) de amostra seca após a extração.

O teor de extractivos foi corrigido de acordo com o teor de umidade, através da Eq. 3:

$$\text{Teor de extractivos (\%)} \text{ Corrigido} = \text{TE} \times (100 - \text{TU})/100 \text{ (eq.3)}$$

Onde,

TE= teor de extractivos (%)

TU = teor de umidade (%)

b) Determinação do teor de extractivos solúveis em ciclohexano/etanol

A presença dos extractivos na fibra lignocelulósica pode tornar o processo de hidrólise incompleta, pois estes compostos podem reduzir o acesso à celulose e hemiceluloses. Valores altos de extractivos podem interferir na análise de quantificação da lignina, prejudicando uma caracterização mais precisa dos resíduos lignocelulósicos.

Pesou-se 5,0000 g de amostra (com precisão de 0,001g) que foi submetida a uma extração em água, descrito no item 4.4.2 (a) e colocou-se em cartucho de papel de filtro para extração em um extrator soxhlet, utilizando-se 150,0 mL de uma mistura de ciclohexano/etanol (1:1, v/v) por um período de 50 horas, conforme norma TAPPI T204 cm-97 modificada.

Após esse período, o resíduo foi seco em estufa a 105 °C por 12 horas. Este procedimento foi realizado a fim de se remover os extractivos solúveis nesta mistura de solventes, em triplicatas. O conteúdo de extractivos solúveis foi determinado através da diferença de massa da amostra seca antes e após o processo de extração, conforme Eq. 4.

$$\text{Teor de extractivos (\%)} = ((ma - md)/ma) \times 100 \text{ (eq.4)}$$

Onde:

ma = a massa(g) de amostra antes da extração.

md = a massa (g) de amostra seca após a extração.

O teor de extractivos foi corrigido de acordo com o teor de umidade, através da equação 5:

$$\text{Teor de extrativos (\%)} \text{ Corrigido} = \text{TE} \times (100 - \text{TU}) / 100 \quad (\text{eq. 5})$$

Onde,

TC = teor de extrativos (%)

TU = teor de umidade (%)

O teor de extrativos totais resulta na soma do teor de extrativos solúveis em água com teor de extrativos solúveis em ciclohexano/etanol.

4.4.3 Teor de Cinzas

O teor de cinzas da amostra foi determinado segundo a Norma TAPPI T211 om-02. Os cadinhos de porcelana foram calcinados em mulfla a 525°C por 4 h e depois resfriados à temperatura ambiente em dessecador e tarados. Cerca de 1,000 g de amostra (40-60 mesh) livre de umidade foi pesada em um cadinho previamente tarado. Esse procedimento foi realizado em triplicata. Os cadinhos foram aquecidos a 100°C e nessa temperatura permaneceram por 1 h. Após esse tempo, a temperatura foi aumentada gradualmente de 50 em 50°C a cada 40 min (rampa de 1,25°C/min.) a fim de carbonizar a amostra suavemente para que não houvesse projeções. Os cadinhos foram mantidos a 525°C por 4 h e resfriados a temperatura ambiente em dessecador. O teor de cinzas foi calculado conforme Eq. 6.

$$\text{Teor de cinzas (\%)} = (m_f / m_i) \times 100 \quad (\text{eq. 6})$$

Onde,

m_f = massa final (após a calcinação)

m_i = massa inicial de amostra livre de umidade.

4.4.4 Determinação do teor de lignina Klason insolúvel

A determinação da composição química do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e do bagaço pré-tratado pelo método organossolve, em termos de teor de lignina foi determinada de acordo com a Norma TAPPI T222 om-98 com adaptações. Para determinação da lignina insolúvel, as amostras pré-tratadas em diferentes condições foram secas em uma estufa de circulação de ar e moídas em um moinho de facas (Marca Marconi, modelo MA 048) a uma granulometria entre 40-60 mesh, sendo as determinações feitas em duplicas.

Uma massa de aproximadamente $1,0000 \pm 0,0001$ g de bagaço de cana-de-açúcar seca e moída, foi colocada em um almofariz e adicionou-se 15,0 mL de solução de ácido sulfúrico 72% (m/m) ($d = 1,6338 \text{ g.mL}^{-1}$, 20°C). Posteriormente, macerou-se a mesma exaustivamente e deixou-se em repouso por 2 horas (contadas a partir da adição do ácido) à temperatura ambiente.

Decorridas as 2 horas, transferiu-se a mistura para um balão de fundo chato com capacidade de 1 L e adicionou-se água destilada até que a concentração de ácido sulfúrico fosse de 3% (m/m) (adição de 560mL de água) e aqueceu-se o sistema sob refluxo por 4 h.

Em seguida, filtrou-se a lignina insolúvel em funil de vidro de placa sinterizado n°4, previamente seco e tarado. Coletou-se o filtrado para análise posterior de lignina Klason solúvel e para determinação de açúcares, por Cromatografia Líquida. O funil com a lignina insolúvel foi seco em estufa a $105 \pm 3^\circ\text{C}$ por 12 horas, resfriado em dessecador até temperatura ambiente e pesado (em uma balança com precisão de 0,0001g), sendo o teor de lignina insolúvel calculado pela relação entre a porcentagem da massa de lignina (eq.7) e a relação à massa inicial de amostra seca, conforme a Eq. 7.

$$\text{Lignina (\%)} = \frac{m1}{m2} \times 100$$

Onde,

- $m1$ corresponde à massa de lignina insolúvel seca;
- $m2$ corresponde à massa de amostra seca pesada inicialmente.

4.4.5 Determinação do Teor de Lignina Klason Solúvel

A lignina solubilizada no meio ácido foi analisada pela técnica de espectroscopia na região do ultravioleta (UV-VIS).

Preparou-se as soluções para análise, tomando o filtrado obtido na determinação do teor de lignina Klason insolúvel, que foi diluído com água destilada até a concentração final de ácido sulfúrico igual a $0,05 \text{ mol L}^{-1}$. Uma solução de referência (branco) de concentração de $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, foi preparada a partir do ácido sulfúrico 72%.

Medidas de absorbância do filtrado foram efetuadas nos comprimentos de onda de 215 nm e 280 nm. A concentração em g/L de lignina Klason solúvel foi calculada de acordo com a Eq. 8.

$$C(\text{g/L}) = \frac{(4,53 \cdot A215) - A280}{300} \quad (\text{eq. 8})$$

Onde;

- C (g/L) corresponde a concentração de lignina Klason solúvel em meio ácido;
- A215 o valor da absorbância em 215 nm e A280 o valor da absorbância em 280 nm.

A absorbância em 280 nm corresponde a uma correção para os compostos de furfural gerados no processo de hidrólise, enquanto que a absorbância em 215 nm é a medida da concentração de lignina solúvel. Sendo assim, a equação (4) é resultante da resolução simultânea das Eq. (9) e (10):

$$A280 = 0,68 \text{ CD} + 18 \text{ CL} \quad (\text{eq. 9})$$

$$A215 = 0,15 \text{ CD} + 70 \text{ CL} \quad (\text{eq. 10})$$

Onde;

- A280 representa o valor da absorbância a 280 nm;
- A215 é o valor da absorbância a 215 nm;
- CD a concentração dos carboidratos (g/L) e CL a concentração da lignina solúvel (g/L).
- Os valores 0,68 e 0,15 correspondem, respectivamente, as absorvividades molares dos produtos de degradação dos carboidratos em 280 e 215 nm, e os valores 18 e 70 são as respectivas absorvividades molares da lignina solúvel em 280 e 215nm.

4.4.6 Determinação do teor de Celulose e Hemiceluloses

Os teores de celulose e hemicelulose foram calculados a partir da análise cromatográfica dos componentes presentes na solução resultante do ensaio do Método de Klason para determinação de lignina. Na análise cromatográfica, os seguintes componentes foram analisados: celobiose, glicose, xilose, arabinose, ácido fórmico, ácido acético, 2-furfuraldeído (FF) e 5-hidroximetil-2-furfuraldeído (HMF). As porcentagens de celulose e hemicelulose foram calculadas de acordo com as equações 11 e 12 (CANILHA et al., 2011; GURGEL et al., 2014; BAÊTA 2016).

$$\text{Cel.} = \frac{(0,95 \cdot \text{Ccelobiose}) + (0,90 \cdot \text{C glicose}) + (3,52 \cdot \text{Các. fórmico}) + (1,29 \cdot \text{CHMF}) \cdot \text{VH2O} + \text{H2SO4}}{\text{massa inicial de bagaço}} \quad (\text{Eq.11})$$

$$\text{Hemi.} = \frac{(0,88 \cdot \text{Cxilose}) + (0,88 \cdot \text{C arabinose}) + (0,72 \cdot \text{C ác. acético}) + (1,37 \cdot \text{furfural}) \cdot \text{VH2O} + \text{H2SO4}}{\text{massa inicial de bagaço}} \quad (\text{Eq. 12})$$

4.5 Caracterização do substrato após pré-tratamento organossolve

4.5.1 Determinação da perda de massa e do rendimento após o pré-tratamento

Após o pré-tratamento organossolve, a perda de massa foi calculada, a partir da relação entre a massa de bagaço bruto utilizado inicialmente na reação e a massa obtida após a etapa de deslignificação, como mostrado na Eq. 13.

$$(\text{eq. 13})$$

$$Perda\ de\ massa\ (%) = \frac{mi - mf}{mi} \times 100$$

Onde,

- mi: corresponde a massa em base seca inicial de bagaço antes do pré-tratamento;
- mf: corresponde a massa obtida após o pré-tratamento.

O rendimento para cada condição do pré-tratamento foi estabelecido, conforme a Eq.14.

$$Rendimento\ (%) = \frac{mf}{mi} \times 100 \quad (\text{eq. 14})$$

Onde,

- mf é a massa final obtida após o pré-tratamento organossolve e;
- mi é a massa inicial antes do pré-tratamento.

4.5.2 Determinação do Teor de Umidade

Determinou-se o teor de umidade das amostras pré-tratadas, conforme descrito no tópico 4.4.1.

4.5.3 Determinação do teor de lignina Klason insolúvel e solúvel

A determinação da composição química do bagaço pré-tratado foi realizada conforme descrito no tópico 4.4.4 e 4.4.5.

4.5.4 Porcentagem de deslignificação

A determinação do teor de lignina das amostras foi calculada como descrito acima, e posteriormente foi feito uma análise em relação a porcentagem das deslignificações, conforme a equação proposta por Pasquini *et al.*, (2005), apresentada abaixo.

$$Deslignificação\ (%) = \frac{Lkb - [LKpt \cdot \left(\frac{R}{100} \right)]}{Lkb} \times 100 \quad (\text{eq. 15})$$

Onde;

LKb = Lignina Klason do bagaço (%)

LKpt = Lignina Klason da bagaço pré-tratado (%)

R = Rendimento do processo de pré-tratamento (%)

4.5.5 Correção dos resultados de celulose, hemiceluloses e lignina de acordo com o rendimento

Os percentuais de celulose, hemiceluloses e lignina obtidos após o pré-tratamento foram corrigidos de acordo com o rendimento do pré-tratamento, conforme equação 16 proposta por Silva *et al.*, (2017).

$$V_{pt} = Yfx \frac{R}{100} \quad (\text{eq. 16})$$

Onde;

V_{pt}: valor corrigido de acordo com rendimento do pré-tratamento;

Yf: porcentagem de componente (celulose, hemiceluloses, lignina) obtida após pré-tratamento;

R: Rendimento.

4.5.6 Determinação do teor de Celulose e Hemiceluloses

Os teores de celulose e hemiceluloses foram determinados conforme descrito no tópico 4.4.6.

4.6 Caracterização Morfológica

4.6.1 Difração de Raio-X (DRX)

Os difractogramas de raio-X da biomassa *in natura* e pré-tratadas foram obtidos utilizando um difratômetro Shimadzu XRD - 6000 LabX com intervalo de 4 a 45° (2θ), velocidade de varredura de 2°/min, potência de 40 kV com uma corrente de 30 mA e radiação CuKa (1,5406 Å). O índice de cristalinidade das amostras foi calculado através da equação 17, proposta por Segal *et al.*, (1959).

$$ICr = \frac{I_{200} - I_{am}}{I_{200}} \times 100 \quad (\text{eq. 17})$$

Onde;

- ICr representa o grau de cristalinidade relativo;
- I₂₀₀ refere-se à intensidade máxima, em unidades arbitrárias, no pico cristalino à 20° aproximadamente 22° e;
- I_{am} é a intensidade da região amorfa em 2θ = 18°.

4.6.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As amostras de bagaço *in natura* e pré-tratadas foram analisadas, em um microscópio de varredura eletrônica, (modelo Carl Zeiss EVO 10 MA), no Laboratório Multusuário de Microscopia Eletrônica de Varredura da Faculdade de Engenharia Química (FEQUI-UFU) da Universidade Federal de Uberlândia.

As amostras foram fixadas em suportes de alumínio com fita de carbono e metalizadas com ouro. As imagens de MEV foram obtidas com ampliação de 100X, 500x, 1000x e tensão de aceleração de 5.0 kV.

4.7 Hidrólise enzimática

Após a realização do pré-tratamento na biomassa de bagaço de cana-de-açúcar, os substratos obtidos foram submetidos à hidrólise enzimática. Nessa etapa, foi utilizada o coquetel enzimático comercial Cellic® CTec 3, cujos parâmetros operacionais do processo foram definidos de acordo com as recomendações apresentadas na ficha técnica do complexo Cellic® CTec 3 (NOVOZYMES, 2012).

O complexo Cellic® CTec3 contendo celulases e hemicelulases é bastante utilizado na produção de bicompostíveis e é um melhoramento da versão anterior Cellic® CTec 2 da Novozymes (FAQ Cellic® CTec3).

A atividade de lipase foi determinada previamente na solução estoque, atingindo o valor de 162,92 FPU/mL (*filter paper unit* por unidade volumétrica da solução enzimática). Os ensaios de hidrólise enzimática foram realizados no Laboratório de Microbiologia Ambiental, da Universidade Federal de Uberlândia (LAMIC-UFU). Nos ensaios, a razão sólido-líquida utilizada foi de 10:1 (ml/g), sendo a fração sólida de substrato de 1g e a concentração inicial de enzima fixada em 10 FPU/g em relação ao percentual de celulose obtido no substrato.

Os ensaios foram realizados considerando o substrato em base seca. Ponderou-se no ensaio a massa de 1 g de substrato e o mesmo foi peneirado em uma peneira (2mm). As amostras foram colocadas em erlenmeyers de 50 mL juntamente com 10 mL de tampão de citrato de sódio 50 mM (pH= 4,8) sob agitação em uma incubadora shaker de 150 rpm da marca NOVATECNICA®, mantida a 25°C por 24 horas. Após as 24hs, o complexo enzimático foi adicionado aos frascos reacionais e mantidos sob agitação de 150 rpm e temperatura de 50°C por 72 horas. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

Após as 72h, a hidrólise enzimática foi interrompida, o substrato foi filtrado e os hidrolisados obtidos foram centrifugados (Micro-centrífuga de bancada NI1801 - NOVA®) por 10 min, a 8000 rpm e temperatura de 4°C. Após a centrifugação, foi possível separar a fração líquida da sólida. Uma alíquota da fração líquida foi coletada para a determinação da concentração dos açúcares redutores totais (ART), onde o ensaio foi realizado utilizando o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILEER, 1959), com pequenas modificações.

A quantificação de açúcares redutores totais (ART) foi determinada pelo método do DNS, com 300 µL do hidrolisado enzimático e 300 µL de DNS. O volume final foi fervido por 10 minutos, sendo que, após esse tempo, interrompeu-se a reação encubando os erlenmeyers em banho de gelo durante 10 min e acrescido de 2400 µL de água destilada.

A determinação de ART foi medida por espectrofotometria no comprimento de onda de 540 nm. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

Após esse período, o DNS é reduzido a o ácido 3-amino-5-salicílico que se liga aos açúcares redutores, sendo quantificados em espectrofotômetro de UV-Vis em comprimento de onda de 540nm (MALDONADE *et al.*, 2013).

A partir da equação da reta, da determinação da curva-padrão (absorbância x glicose), calculou-se a concentração de açúcares redutores totais nas amostras (g/L).

Considerou-se nos cálculos as diluições efetuadas nas amostras, multiplicando o resultado por esse fator (MALDONADE *et al.*, 2013).

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Aspecto físico

Após a etapa de pré- tratamento do bagaço de cana de açúcar foi possível visualizar mudanças físicas no aspecto do bagaço. O bagaço de cana de açúcar *in natura* e o pré-tratado apresentaram aspectos físicos diferentes, como por exemplo a redução do tamanho da fibra, conforme é apresentado na figura 6.

Figura 6: Amostra do bagaço de cana *in natura* e pré-tratado



Fonte: Autora

5.2 Composição química do bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar *in natura* foi caracterizado quimicamente, quanto ao teor de umidade, extractivos totais, lignina total (lignina solúvel + lignina insolúvel), celulose, hemiceluloses e cinzas.

A composição química da amostra *in natura* de bagaço de cana-de-açúcar é apresentada na tabela 4.

Tabela 4: Composição química do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* (%)

Teste	BB (%)
Umidade	2,89
Extrativos	2,31
Lignina Total	26,77
Celulose	48,52
Hemiceluloses	19,07
Cinzas	0,41
Balanço de massa	99,97

Os resultados obtidos na caracterização química do bagaço mostraram a presença dos seguintes carboidratos: celulose com teor de 48,52% e hemiceluloses com porcentagem de 19,7%. Ambos os valores encontrados são próximos aos relatados na literatura por NOVO et al., (2011); CANILHA et al., (2012) e MEIGHAN et al., (2017) que encontraram 49,49% de celulose e 46,36 % de hemiceluloses; 45,0% de celulose e 25,8% de hemiceluloses e 24,34% de celulose e 20,61% para hemiceluloses, respectivamente. Esses resultados evidenciam o potencial que a biomassa de bagaço de cana-de-açúcar possui para a produção de etanol de segunda geração, devido ao elevado teor de carboidratos presente nesta biomassa.

A porcentagem de lignina apresentada na Tabela 4, refere-se à lignina total, que é a soma da lignina solúvel com a lignina insolúvel, sendo que a porcentagem da mesma para o bagaço *in natura* foi de 26,77%, valor este próximo ao reportado por NOVO et al (2011) sendo 22,69%, CANILHA et al., (2011) que obteve 19,1% e MEIGHAN et al., (2017) que obteve 23,93% de lignina.

A porcentagem de extrativos e cinzas mostrados na Tabela 4 foi de 2,31% de extrativos e 0,41% de cinzas. Os dados obtidos estão dentro do que foi encontrado por CANILHA et al., (2011) que foi 9,1% de extrativos e 1,0% de cinzas e MEIGHAN et al., (2017) que encontraram 2,26% de extrativos e 2,19% de cinzas.

Os resultados apresentados na Tabela 4 mostram que o balanço de massa para o bagaço-de-cana-de-açúcar *in natura* que foi de 99,97% fechou de forma coerente, sendo possível determinar a composição do bagaço com boa exatidão. Valores entre 90-110% são considerados bons, considerando-se a complexidade dos materiais lignocelulósicos e as diferentes metodologias para determinação da composição química (BAÊTA, 2016).

5.3 Pré-tratamento organossolve do bagaço de cana-de-açúcar

5.3.1 Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado

O pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar ocorreu em diferentes condições de tempo, temperatura e razão sólido-líquida (RSL). A Tabela 5 apresenta os valores de caracterização que foram obtidos em triplicata para cada amostra. A Tabela 6 apresenta os valores da caracterização corrigida pelo rendimento do pré-tratamento.

Tabela 5: Composição do bagaço pré-tratado e dados obtidos após pré-tratamento

Ensaio	Composição da Fração Sólida			Rendimento após Pré-Tratamento			
	Cel (%)	Hemi (%)	Lig (%)	BM	RF (%)	PM (%)	PD (%)
1	82,49 ± 5,51	11,75 ± 5,73	16,40 ± 0,96	110,64	50,16	49,84	69,27
2	67,25 ± 4,01	1,94 ± 0,70	25,54 ± 2,15	94,73	43,16	56,84	58,82
3	55,76 ± 3,59	8,37 ± 1,00	14,72 ± 1,45	78,85	43,06	56,94	76,31
4	47,04 ± 2,10	28,66 ± 0,87	25,83 ± 2,3	101,53	77,94	22,06	24,79
5	51,94 ± 3,79	26,59 ± 7,11	26,24 ± 0,59	104,77	83,39	16,61	18,25
6	44,36 ± 0,18	24,95 ± 0,31	25,9 ± 0,02	95,21	85,82	14,18	16,95
7	50,25 ± 0,96	30,76 ± 0,27	26,0 ± 0,62	107,01	78,62	21,38	23,63
8	52,58 ± 6,84	22,95 ± 2,19	25,91 ± 1,80	101,44	66,10	33,90	36,01
9	81,57 ± 3,86	7,24 ± 0,23	16,82 ± 1,73	105,63	33,37	66,63	79,02
10	56,25 ± 12,66	7,67 ± 1,13	21,5 ± 0,25	85,42	46,89	53,11	62,33
11	51,09 ± 6,11	18,22 ± 1,17	22,49 ± 0,90	91,8	51,05	48,95	57,11
12	41,12 ± 0,16	27,16 ± 0,05	24,85 ± 0,08	93,13	92,91	7,09	14,51
13	60,09 ± 3,34	19,45 ± 0,38	23,81 ± 0,02	103,35	53,63	46,37	56,74
14	37,90 ± 4,65	8,08 ± 4,50	21,15 ± 0,18	67,03	55,48	44,52	56,16
15	44,64 ± 0,40	17,23 ± 0,81	24,08 ± 0,03	85,95	66,30	33,70	40,36

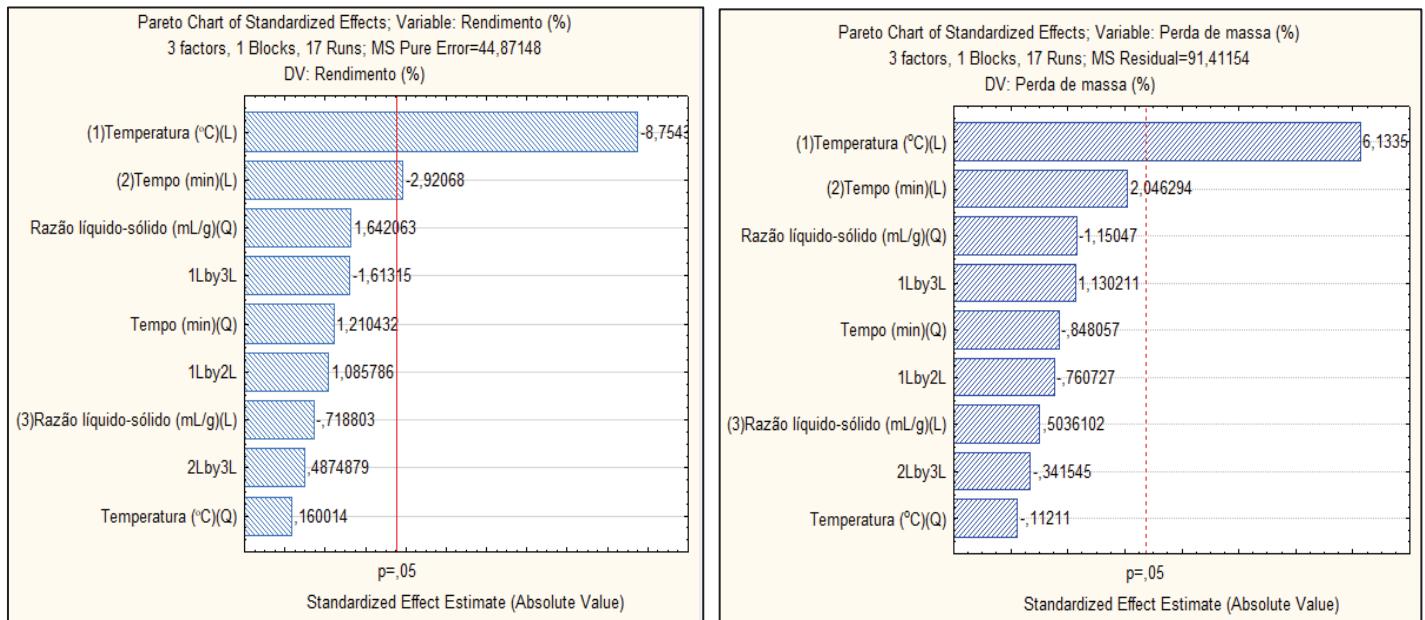
Cel (%): Porcentagem de celulose; Hem (%): Porcentagem de Hemicelulose; Lig (%): Porcentagem de lignina; BM: Balanço de Massa (Cel (%) + Hem (%) + Lig (%)); RF: Rendimento final após pré-tratamento; PM: Perda de Massa após pré-tratamento; PD: Porcentagem de deslignificação (%).

Tabela 6: Valores da caracterização química do bagaço pré-tratado corrigidos pelo rendimento do pré-tratamento

Composição da Fração Sólida			
Ensaio	Cel (%)	Hemi (%)	Lig (%)
1	41,38±2,28	5,89±1,92	8,23±0,97
2	29,03±1,41	0,84±0,35	11,03± 2,16
3	22,46±1,26	3,60±0,50	6,34 ±1,46
4	36,67±1,34	22,34±0,78	20,14 ±2,30
5	43,32±2,58	22,17±3,95	21,89 ±0,60
6	38,07±0,12	21,41±0,31	22,23 ±0,03
7	39,50±0,61	24,18±0,24	20,45 ±0,62
8	34,76±3,69	15,17±1,67	17,13 ±1,81
9	27,22±1,05	2,42±0,09	5,62 ±1,74
10	26,37±4,85	3,60±0,61	10,09 ±0,26
11	26,08±2,55	9,30±0,69	11,48 ±0,91
12	38,20±0,12	25,23±0,06	23,09 ±0,08
13	29,22±1,33	9,46±0,21	11,58 ±0,03
14	21,03±2,11	4,48±2,88	11,74 ±0,19
15	29,59±0,21	11,42±0,42	15,97 ±0,03

Os resultados obtidos na etapa de pré-tratamento e caracterização da biomassa de cana-de-açúcar pré-tratada foram analisados com os programas Statistica® versão 7.0 (a partir do modelo quadrático) e OriginPro 8®. A Figura 7 apresenta o Diagrama de Pareto para as respostas de rendimento e perda de massa após a etapa de pré-tratamento.

Figura 7: Diagrama de Pareto para o pré-tratamento organossolve do bagaço de cana-de-açúcar considerando as variáveis, temperatura (°C), tempo (min) e RSL em função da resposta rendimento e perda de massa.



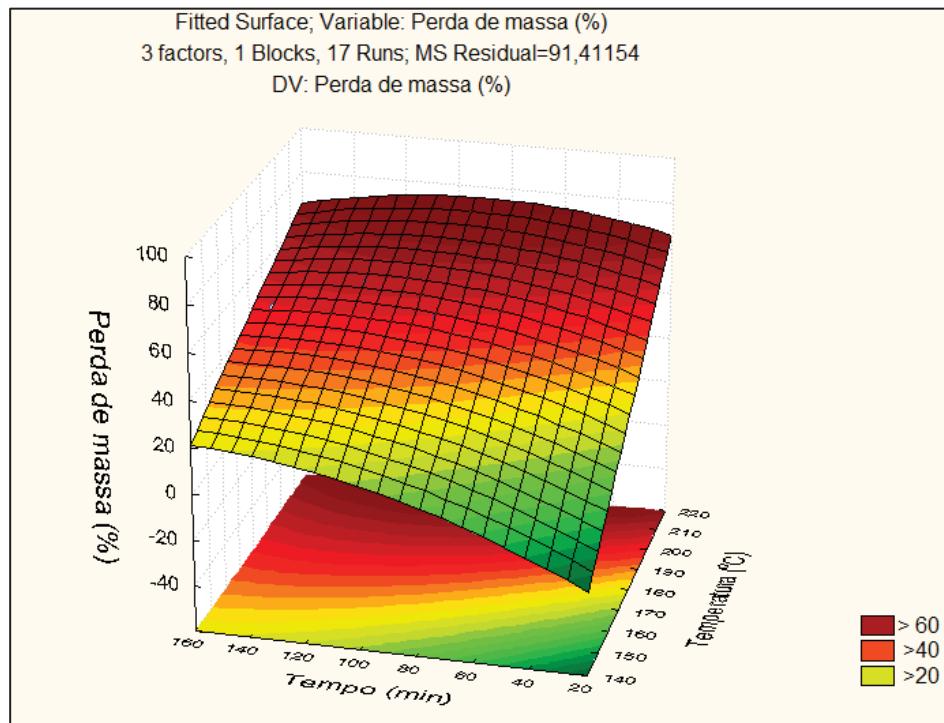
Fonte: Autora

O Diagrama de Pareto mostra que a variável temperatura (T) tem efeito mais acentuado no processo de pré-tratamento, sendo que a mesma é significativa para temperaturas mais baixas e tempos de pré-tratamento menores, o que resulta no aumento do rendimento.

Para a resposta perda de massa, observa-se que temperaturas mais altas favorecem a perda de massa, dessa forma, a variável temperatura é a que mais influencia a perda de massa do material lignocelulósico durante o pré-tratamento.

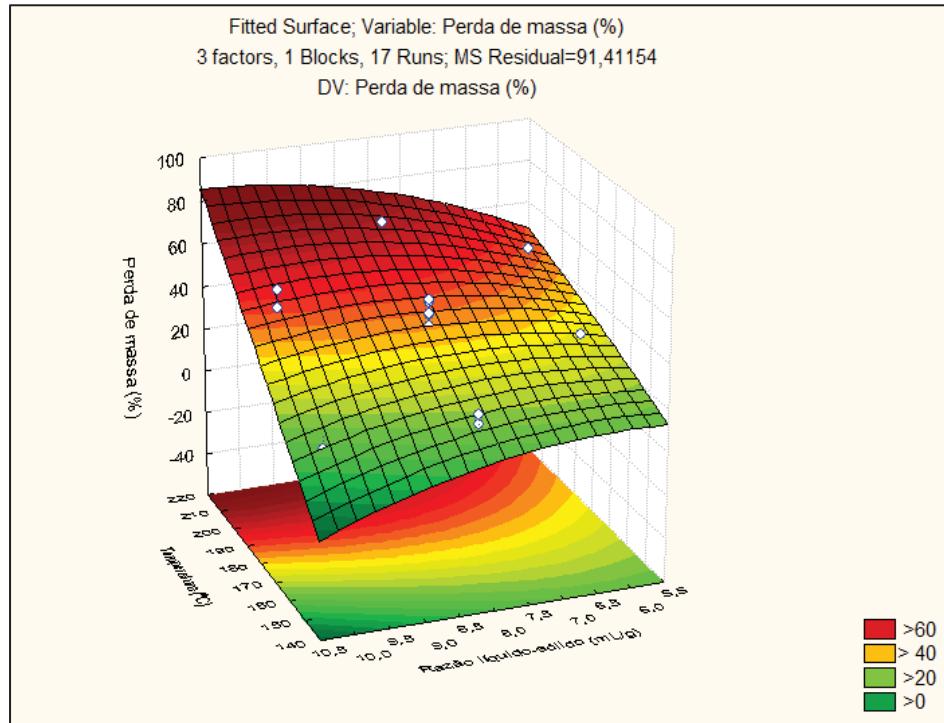
Na figura 8, o gráfico de superfície relaciona a perda de massa com o tempo e temperatura, o que corrobora que quanto maior a temperatura, maior será a perda de massa da biomassa. Nas amostras pré-tratadas, observa-se que as amostras 2 (T:210°C; t: 120 minutos), 3 (T:190°C; t: 120 minutos), 9 (T:210°C; t: 60 minutos) e 10 (T:200°C; t:90 minutos) foram as que apresentaram uma maior perda de massa, o que se relaciona a temperatura de pré-tratamento que foi superior a 190°C.

Figura 8: Gráfico de superfície com resposta perda de massa relacionado com tempo e temperatura.



Fonte: Autora

Figura 9: Gráfico de superfície com resposta perda de massa relacionado com temperatura e RSL



Fonte: Autora

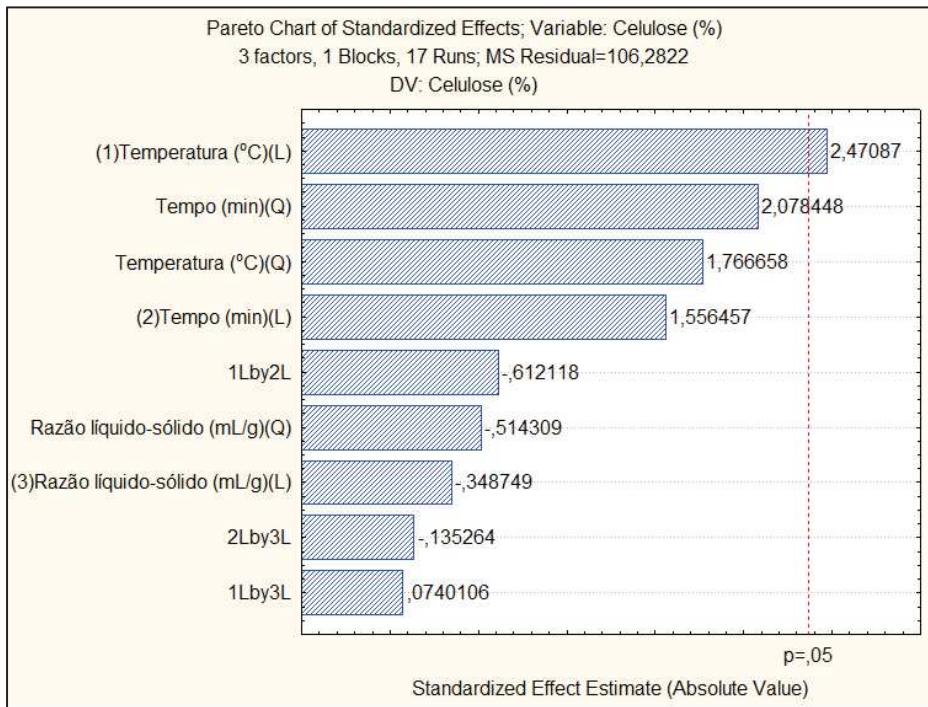
A RSL não teve significância na perda de massa do material lignocelulósico durante o pré-tratamento, portanto pelo gráfico de superfície (Figura 9) observa-se que maiores temperaturas levam a uma maior perda de massa e que esse processo independe da razão sólido-líquida (RSL).

Novo *et al.*, (2011) estudou o efeito do pré-tratamento com glicerol puro na biomassa de bagaço de cana, nesse estudo os autores fizeram dois planejamentos, sendo um primeiro fixando duas temperaturas (150°C e 190°C) e duas frações de tempo (60 e 240 minutos), no segundo projeto experimental foi um planejamento com composto central onde variou-se tempo e temperatura de reação. Os resultados mostraram que o melhor resultado foi com tempo de reação de 150 minutos, temperatura de 198,3°C, cujo rendimento foi de 54,4%, teor de lignina residual 7,75% e porcentagem de deslignificação de 81,4%.

Para compreender como tempo (min), temperatura (°C) e razão sólido-líquido (RSL) afetam as amostras pré-tratadas os resultados obtidos na etapa de caracterização, como porcentagem de celulose, lignina e hemiceluloses também foram analisados com os programas Statistica® versão 7.0 (a partir do modelo quadrático) e OriginPro 8®, conforme segue abaixo.

Para porcentagem de celulose encontrada no material pré-tratado traçou-se um Diagrama de Pareto (Figura 10). Através do diagrama é possível observar que temperaturas mais altas favoreceram a porcentagem de celulose, o que pode ser observado na Tabela 5, onde as amostras 2 (67,25%), 3 (55,76%), 9 (81,57%), 10 (56,25%) e 11 (51,09%) que foram pré-tratadas com temperaturas mais altas apresentaram porcentagem de celulose maior que 55%.

Figura 10: Diagrama de Pareto considerando os efeitos das variáveis T (°C), t (min) e RSL sobre a Celulose (%)



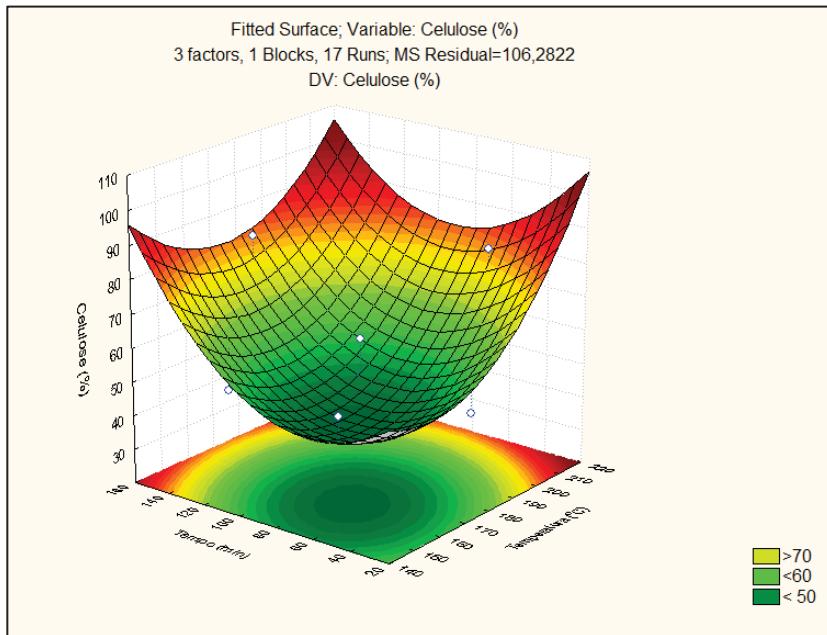
Fonte: Autora

Analisando o gráfico de superfície para a celulose em função do tempo e temperatura (Figura 11), é possível verificar que as variáveis tempo e temperatura quando combinadas favoreceram o teor de celulose para algumas amostras. Por exemplo, para amostra 1 (T: 180°C, t: 150 minutos) que permaneceu ao fim do pré-tratamento com 82,49% de celulose, um fator importante observado é que a faixa de temperatura no pré-tratamento ficou em 180°C, não sendo essa a maior temperatura do planejamento, já o tempo de reação foi alto sendo 150 minutos. Para a amostra 2 (T: 210°C, t: 120 minutos) o teor de celulose foi de 67,25%, essa amostra foi pré-tratada com temperatura elevada e tempo alto, porém o resultado obtido não foi tão bom quando comparado com a amostra anterior. Já a amostra 9 (T: 210°C, t: 60 minutos), permaneceu com teor de celulose de 81,57%, sendo pré-tratada com temperatura elevada 210°C e tempo reduzido 60 minutos.

Portanto, com essas informações é possível verificar que se o pré-tratamento for feito com temperaturas mais brandas e tempo de reação maior é possível ter uma porcentagem de celulose considerável, caso o pré-tratamento ocorra em condições de temperatura elevada e tempo elevado, observa-se uma degradação da celulose, diminuindo assim seu teor na biomassa

pré-tratada, sendo assim, é necessário ter um equilíbrio entre tempo e temperatura, de forma que somente uma das variáveis seja elevada.

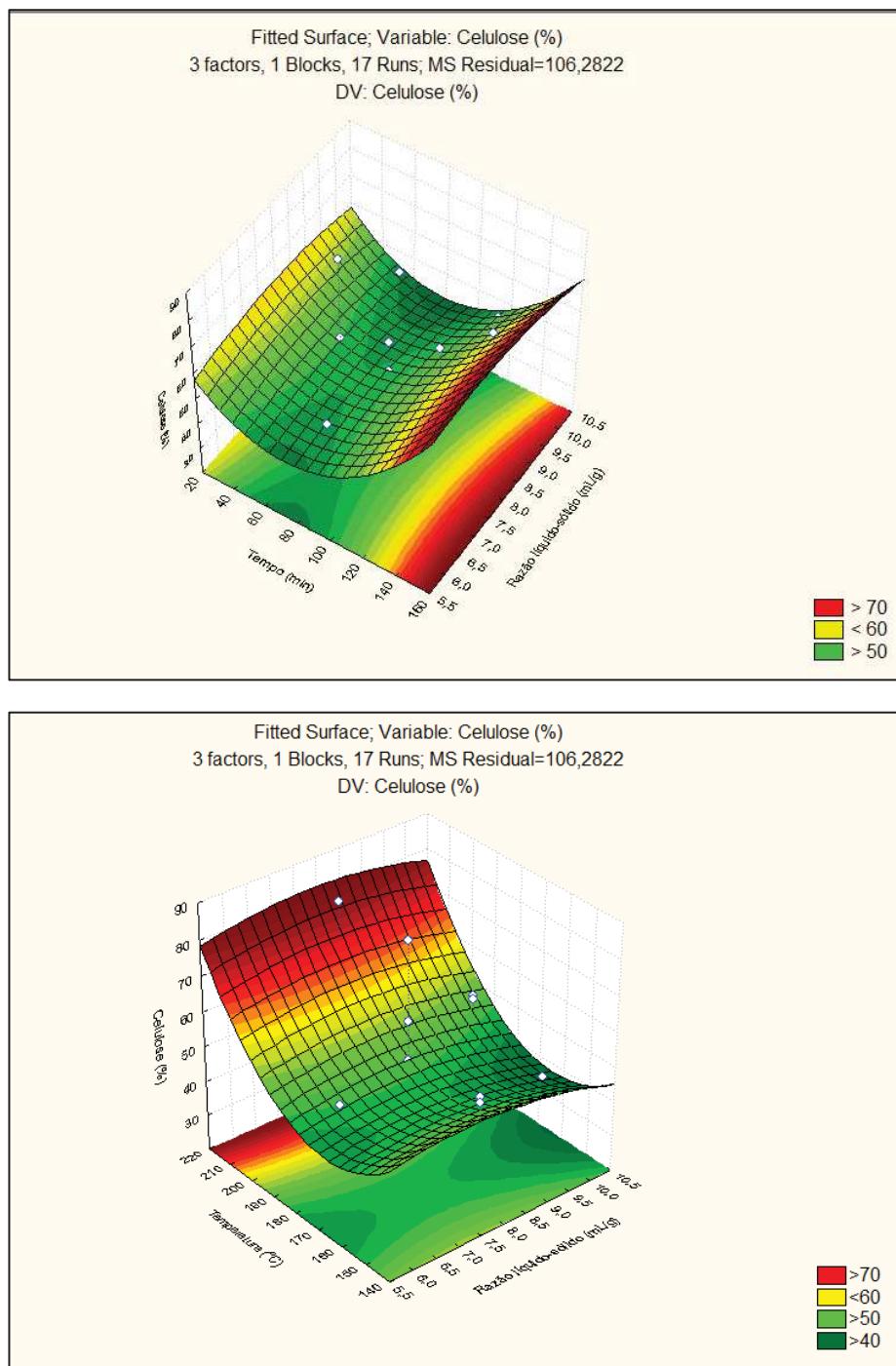
Figura 11: Gráfico de superfície considerando o teor de celulose em função do t (min) e $T(^{\circ}\text{C})$ de pré-tratamento.



Fonte: Autora

Quando analisamos a relação entre a razão sólido-líquida (RSL) e o tempo de reação ou a razão sólido-líquida (RSL) e a temperatura de pré-tratamento (Figura 12), observa-se que o teor de celulose independe da razão sólido-líquida (RSL) estabelecida no pré-tratamento, sendo que o teor de celulose pode ser obtido em qualquer um dos níveis de variação da razão sólido-líquida (RSL).

Figura 12: Gráfico de superfície considerando $t(\text{min}) \times \text{RSL}$ e $T(\text{°C}) \times \text{RSL}$



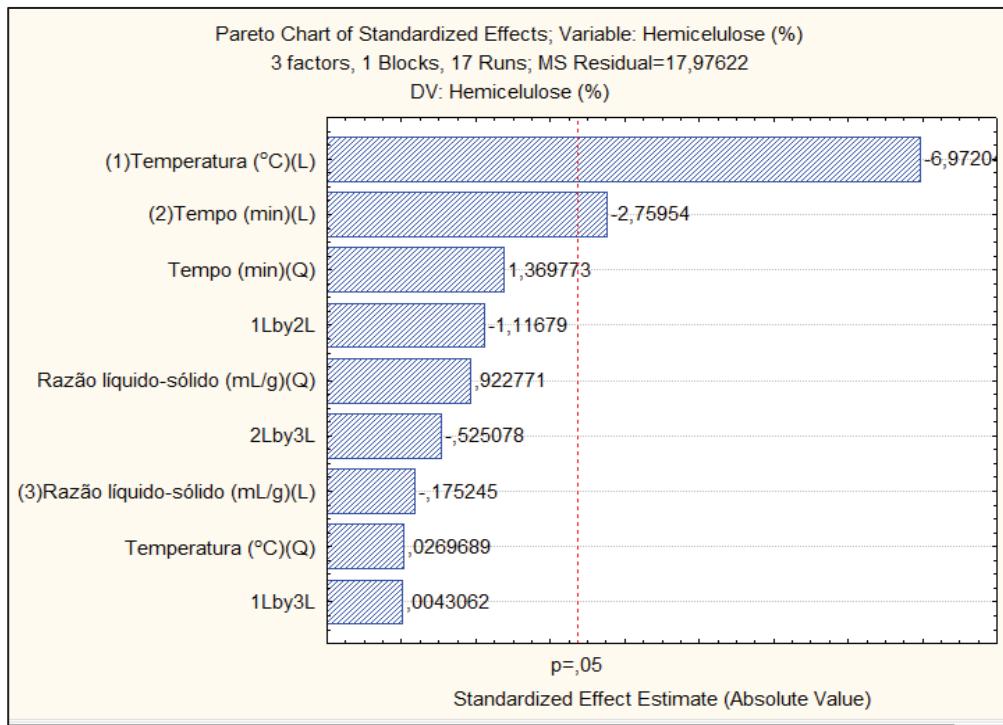
Fonte: Autora

A análise dos resultados obtidos para hemiceluloses e lignina também foram feitas usando os programas Statistica® versão 7.0 (a partir do modelo quadrático) e OriginPro 8®, conforme segue adiante.

O Diagrama de Pareto (Figura 13) para as hemiceluloses mostram que temperaturas menores e tempos mais baixos são variáveis significativas que contribuem para a preservação das hemiceluloses, portanto, se o intuito de pré-tratamento for a remoção de hemiceluloses

deve-se trabalhar com faixas de temperaturas mais altas e tempo de reação maiores, e vice-versa.

Figura 13: Diagrama de Pareto para hemiceluloses

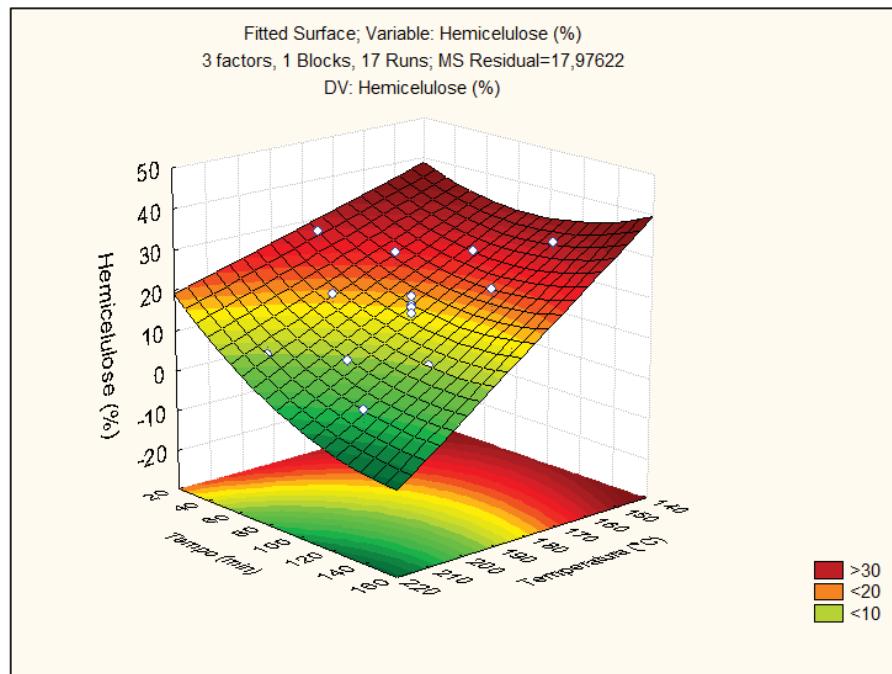


Fonte: Autora

Pode-se observar através do gráfico de superfície (Figura 14) que em temperaturas menores o valor da porcentagem de hemiceluloses foi maior que em amostras pré-tratadas com temperaturas mais elevadas. Por exemplo, na amostra 5 (T: 150°C, t: 60 minutos) o teor de hemiceluloses foi de 26,59%, na amostra 7 (T: 150°C, t: 120 minutos) foi de 30,76%. Quando compara-se essas amostras com a amostra 2 (T: 210°C, t: 120 minutos) o teor de hemiceluloses diminuiu consideravelmente com o aumento da temperatura ficando em 1,94%, o mesmo pode ser observado para a amostra 9 (T: 210°C, t: 60 minutos) em que o teor de hemiceluloses ficou em 7,94%. Portanto observa-se que para preservar o teor de hemiceluloses é recomendado trabalhar com temperaturas de pré-tratamento mais brandas.

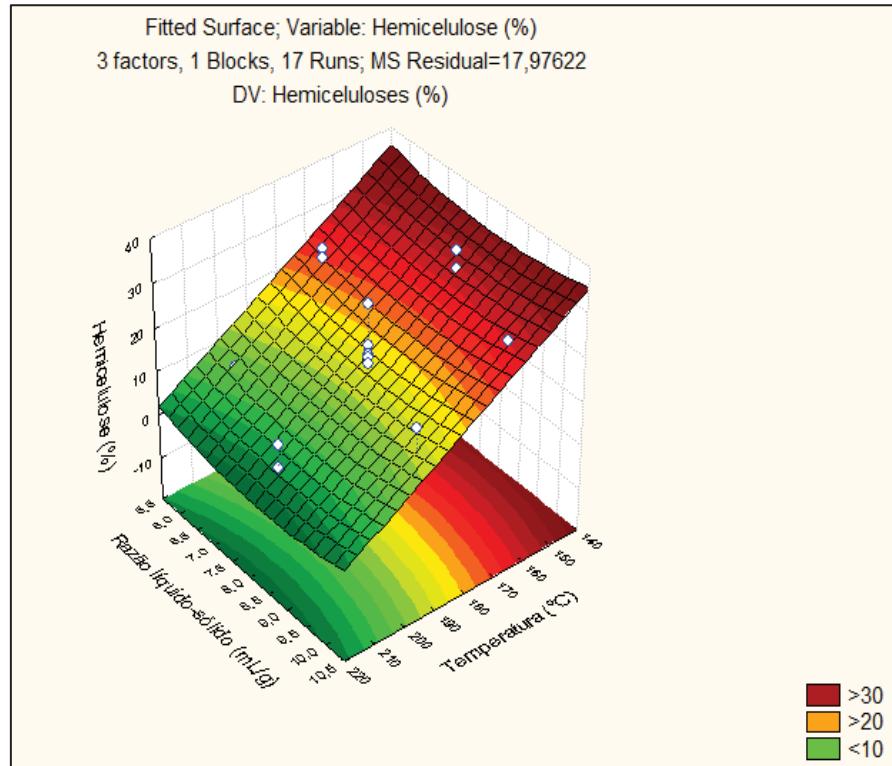
Outro fator importante observado no pré-tratamento em relação ao teor de hemiceluloses é que a razão sólido-líquida (RSL) em função da Temperatura (°C) (Figura 15) não interfere na porcentagem de hemiceluloses, sendo possível mantê-la fixa durante o pré-tratamento.

Figura 14: Gráfico de superfície considerando teor de hemiceluloses em função do t (min) x T (°C)



Fonte: Autora

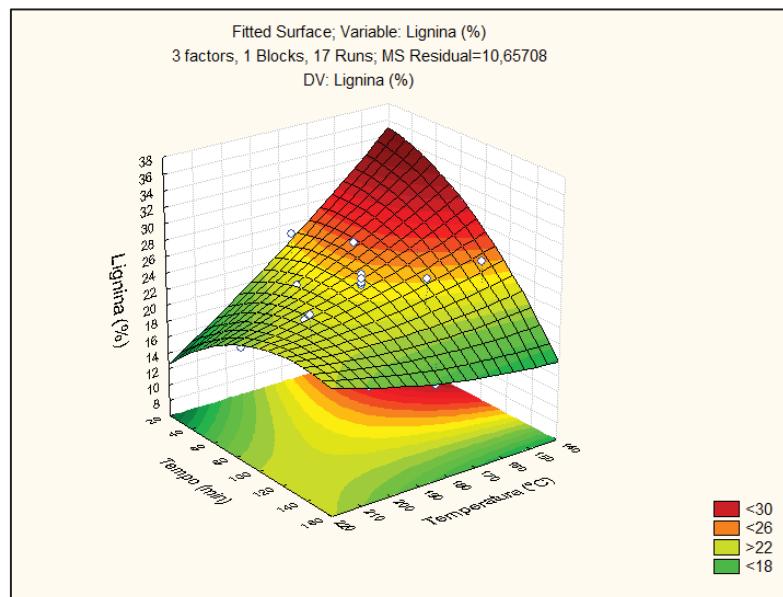
Figura 15: Gráfico de superfície considerando o teor de hemiceluloses em função da RSL x T (°C).



Fonte: Autora

Para a análise dos resultados obtidos para a lignina após a etapa de pré-tratamento, o gráfico de superfície apresentado na Figura 16, mostra que as maiores porcentagens de lignina retidas na biomassa foram para as amostras cujo pré-tratamento abrangeu faixas de temperaturas menos elevadas e tempos de reação menores. Por exemplo, para a amostra 5 (T: 150°C, t: 60 minutos), a porcentagem final de lignina após o pré-tratamento foi de 26,24%, enquanto que para a amostra 3 (T: 190°C, t: 120 minutos) foi de 14,72%. A partir desses dados pode-se concluir que a melhor condição para remoção de lignina em material lignocelulósico durante o pré-tratamento, ocorre em faixas mais elevadas de temperatura e tempo maior de reação.

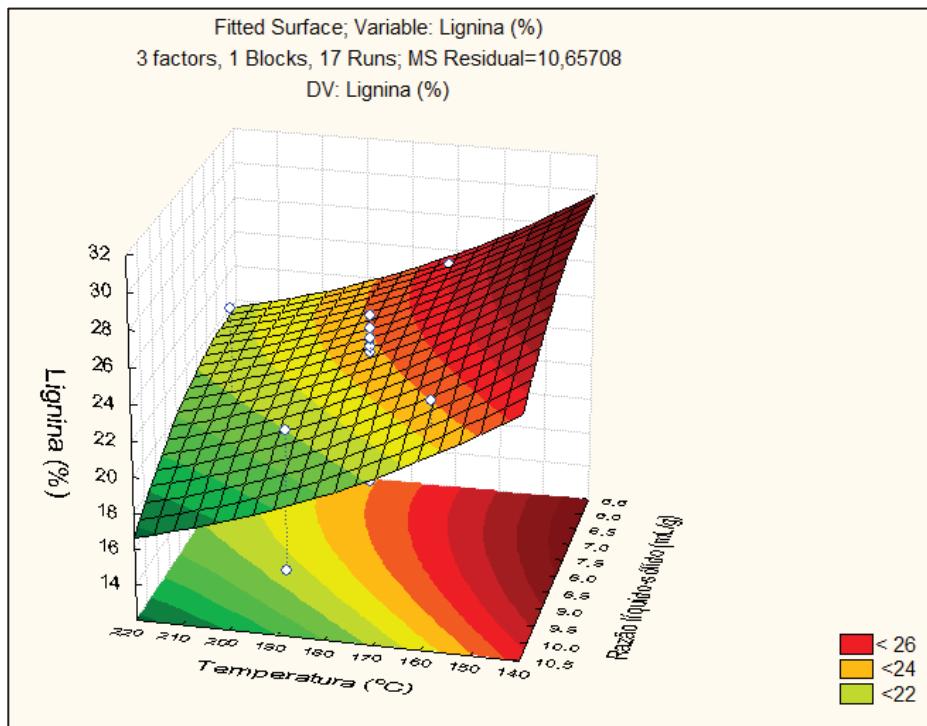
Figura 16: Gráfico de superfície considerando o teor de lignina em função da T (°C) x t(min)



Fonte: Autora

Quando comparado a temperatura de reação com a RSL (Figura 17), observa-se que a variável razão sólido-líquida (RSL) não influenciou na porcentagem de lignina da biomassa.

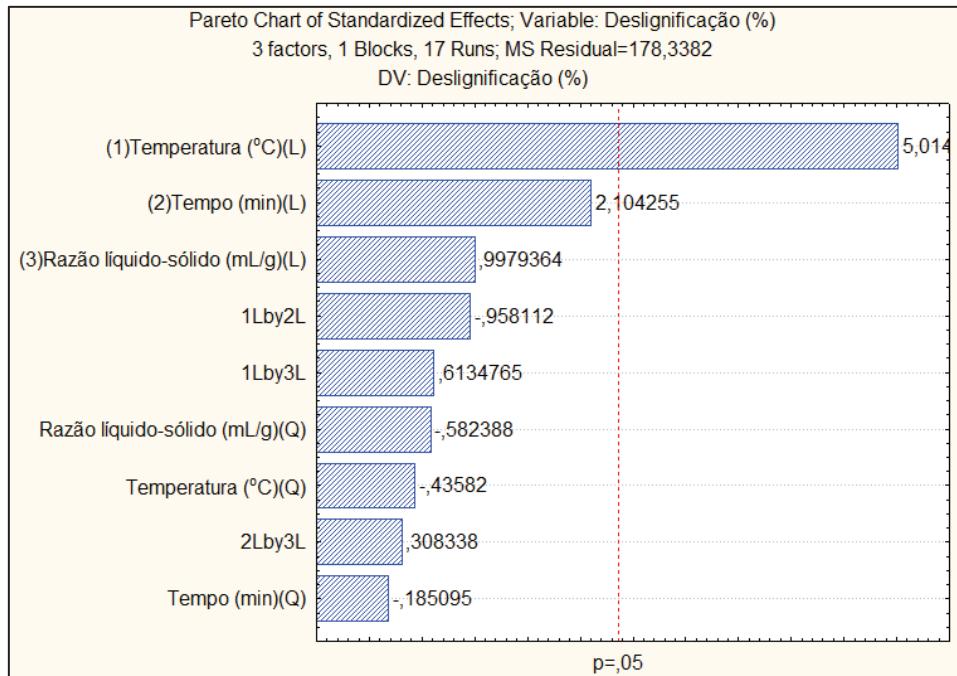
Figura 17: Gráfico de superfície considerando o teor de lignina em função da T (°C) e RSL



Fonte: Autora

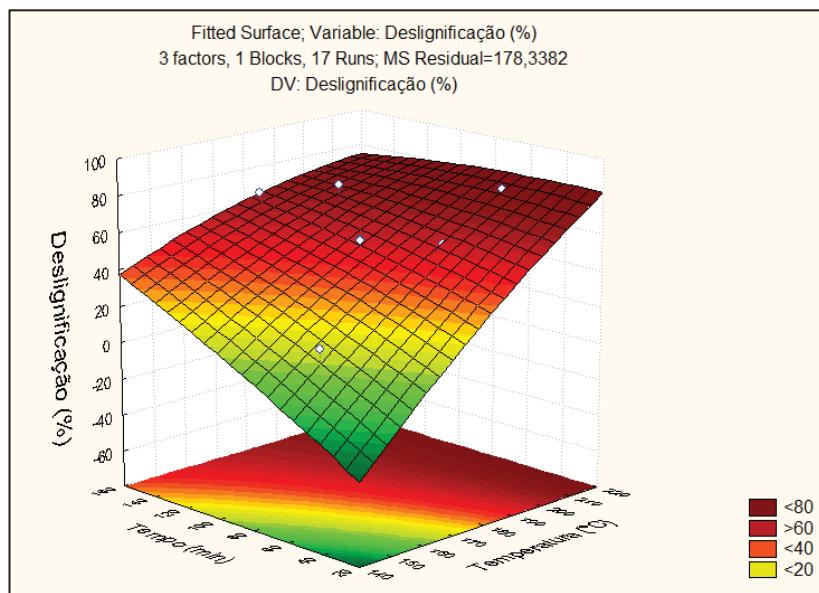
Em relação a porcentagem de deslignificação obtida no pré-tratamento da biomassa, o Diagrama de Pareto (Figura 18), mostra que para temperaturas mais elevadas maior foi o percentual de deslignificação, portanto a temperatura é uma variável significativa na deslignificação da biomassa, o que é evidenciado ao observar a porcentagem de deslignificação da amostra 9 (T: 210°C, t: 60 minutos) que foi 79,02%. Outras amostras como a 3 (T: 190°C, t: 120 m) também apresentou uma alta porcentagem de deslignificação correspondendo a 76,31%. O gráfico de superfície relacionando tempo (min) e temperatura (°C) em função da deslignificação da biomassa (Figura 19), mostra que temperaturas mais elevadas e tempos maiores resultaram em uma maior porcentagem de deslignificação da biomassa.

Figura 18: Diagrama de Pareto para porcentagem de deslignificação



Fonte: Autora

Figura 19: Gráfico de superfície relacionando T(°C) x t (min) em função da porcentagem de deslignificação



Fonte: Autora

Autores como Sun *et al.* (2016) investigaram o efeito do pré-tratamento organossolve com glicerol puro em diferentes matrizes lignocelulósicas. No caso do bagaço de cana-de-açúcar, os autores observaram que o pré tratamento apresentou uma boa seletividade removendo aproximadamente 70% de lignina e hemiceluloses e preservando 94% da celulose

total. Outro fator importante observado por eles, foi que o pré-tratamento organossolve desconstruiu a estrutura recalcitrante da biomassa lignocelulósica que favoreceu a hidrólise do substrato pré-tratado (SUN *et al.*, 2016).

Vários fatores influenciam o processo de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, dentre eles tempo e temperatura são parâmetros chave que influenciam nos resultados.

No estudo citado acima, os autores observaram que na faixa de temperatura de 200-240°C o rendimento do pré-tratamento já é comprometido diminuindo gradativamente de 68-57%, essa observação também pode ser constatada no estudo realizado, pois as amostras que foram pré-tratadas com as maiores faixas de temperatura que foi de 200-210°C, também apresentaram uma diminuição significativa no rendimento do pré-tratamento.

Os autores observaram que a celulose original também é degradada passando de 96% a 210°C para 91% a 240°C. Em temperatura menor que 220°C a lignina e as hemiceluloses degradam-se acentuadamente no bagaço de cana-de-açúcar quando comparado com o aumento da temperatura do pré-tratamento, permanecendo nessa faixa de temperatura 33% de lignina e 29% de hemiceluloses, já em temperaturas maiores permaneceu praticamente inalterado.

Segundo Novo *et al.*, (2011) para se obter melhores resultados no pré-tratamento organossolve com glicerol, como alto grau de deslignificação, é necessário utilizar uma proporção de glicerol alta, além de altas temperaturas, que pode ser observado nos resultados explanados acima. No entanto, para preservação da celulose residual tempos de reação intermediários são necessários para que se preserve a fração celulósica.

5. 4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para melhor compreender as características físicas do substrato pré-tratado e como o pré-tratamento afeta as fibras, algumas observações puderam ser feitas a partir das micrografias.

Através das imagens é possível perceber que o bagaço de cana-de-açúcar *in natura* apresentou um superfície lisa e continua com as fibras ordenadas de forma compacta.

Após o pré-tratamento organossolve com glicerol bruto, é possível visualizar uma redução significativa do tamanho das fibras do material lignocelulósico, as fibras antes compactas foram expostas, tonando-se soltas e mais finas, além de apresentar um tamanho médio menor quando comparado com o bagaço de cana-de-açúcar *in natura*.

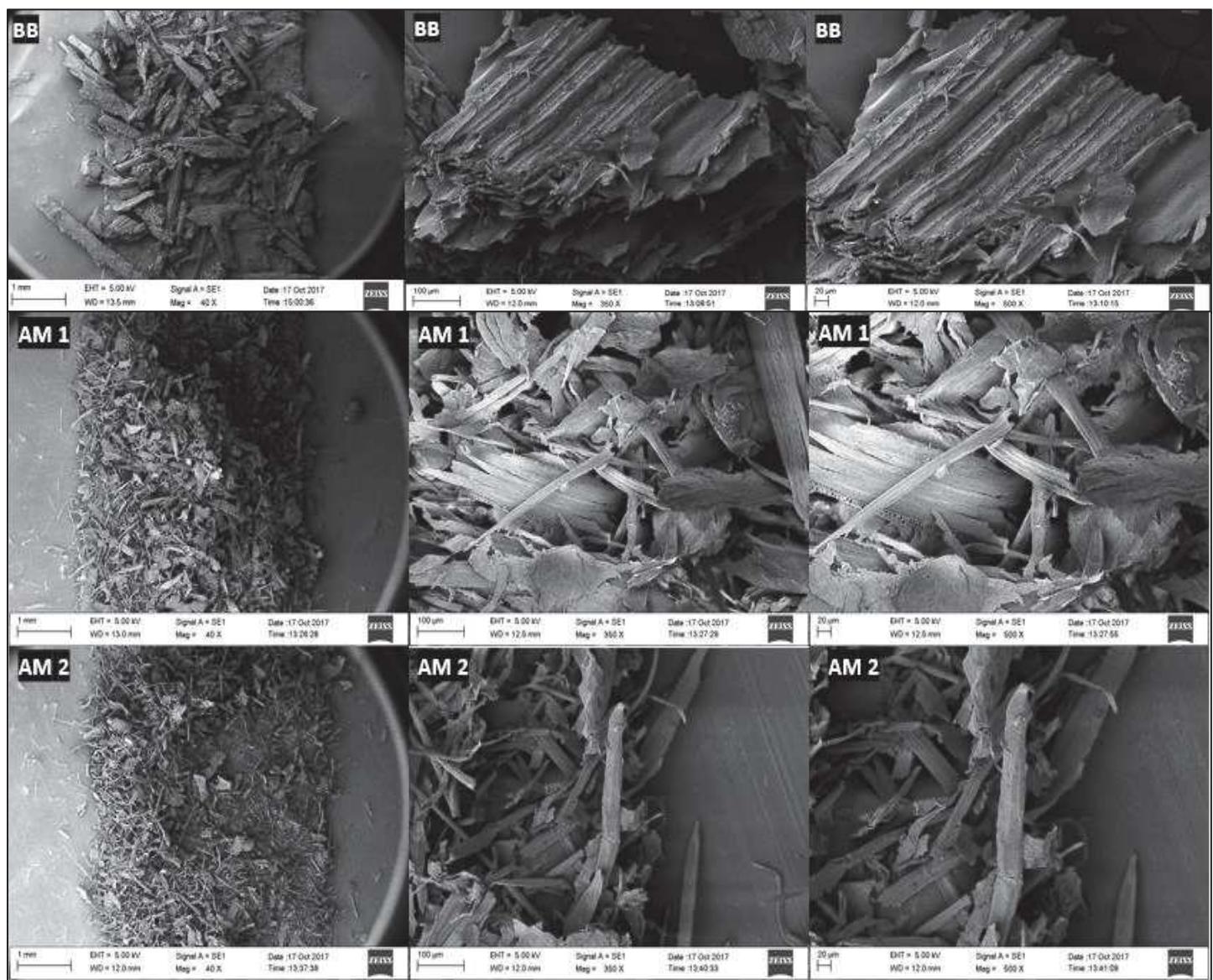
Durante o pré-tratamento organosolve, parte da lignina e hemiceluloses são solubilizadas e despolimerizadas aumentando a área superficial e permitindo uma estrutura

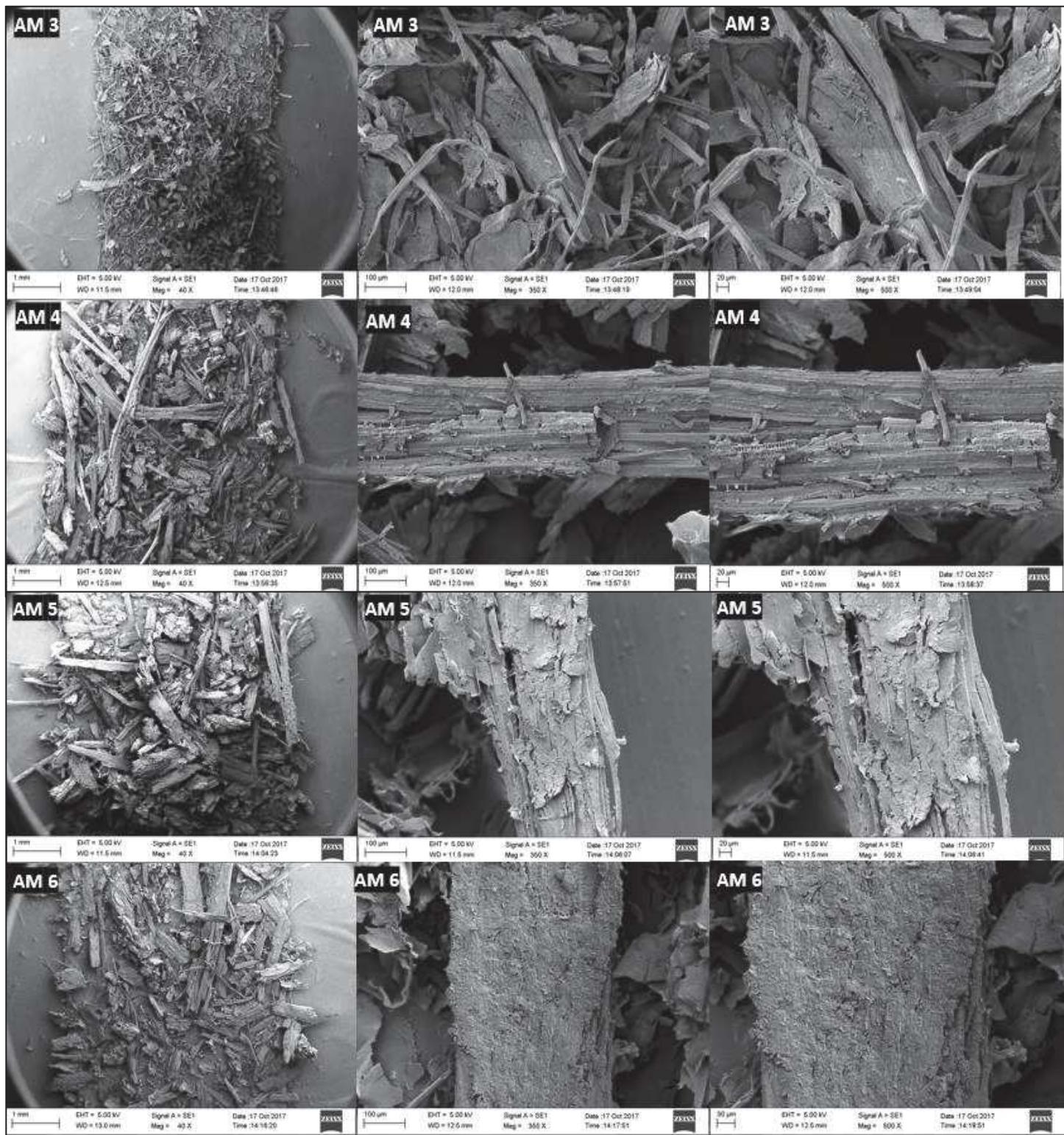
aberta. Estas características favorecem a sacarificação enzimática da celulose (RAMONÍ, *et al* 2013).

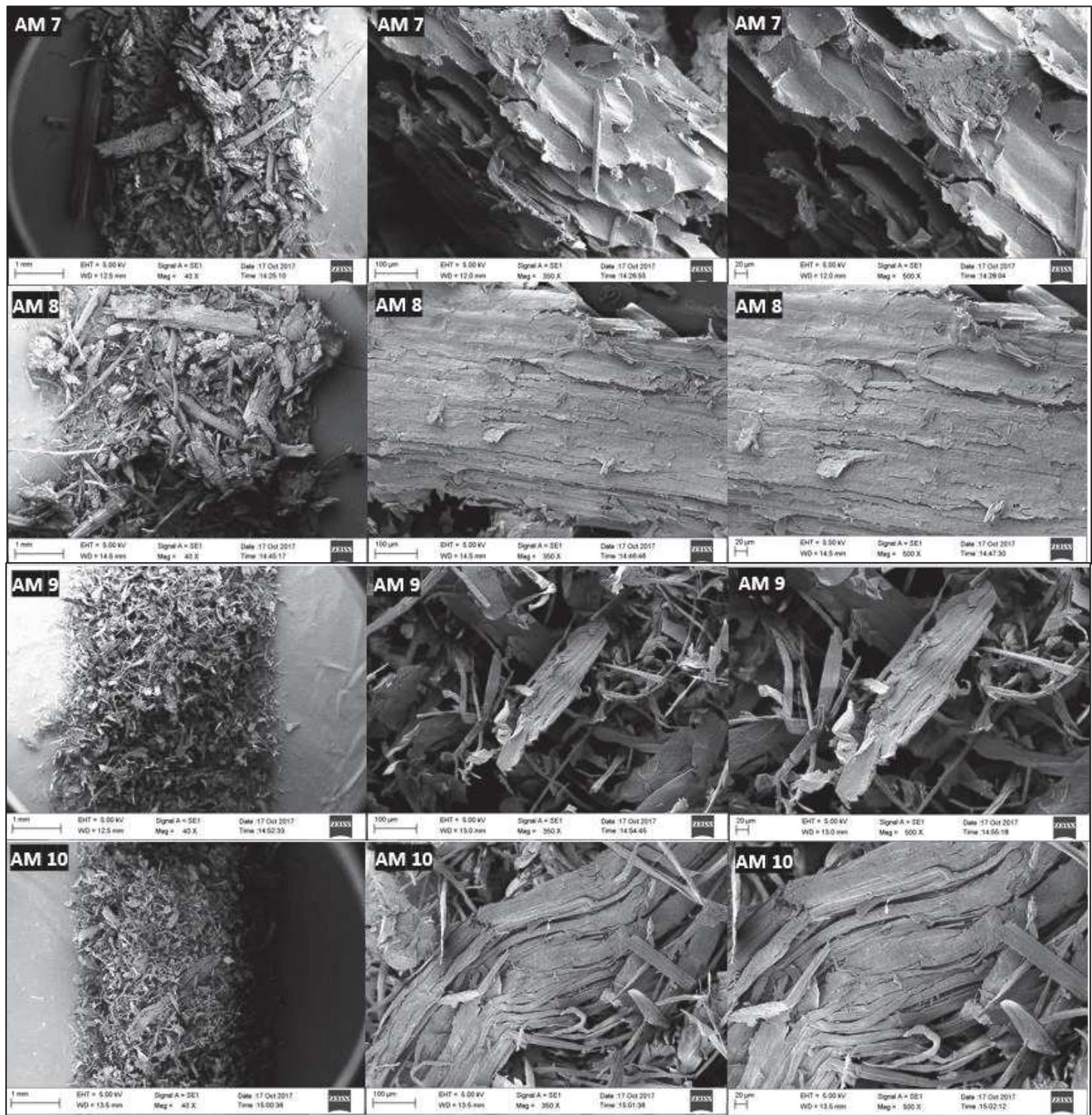
A observação das micrografias (Figura 20) indica que o pré-tratamento promoveu uma descamação na superfície do material, o que pode indicar a remoção parcial de lignina, hemiceluloses e celulose da biomassa.

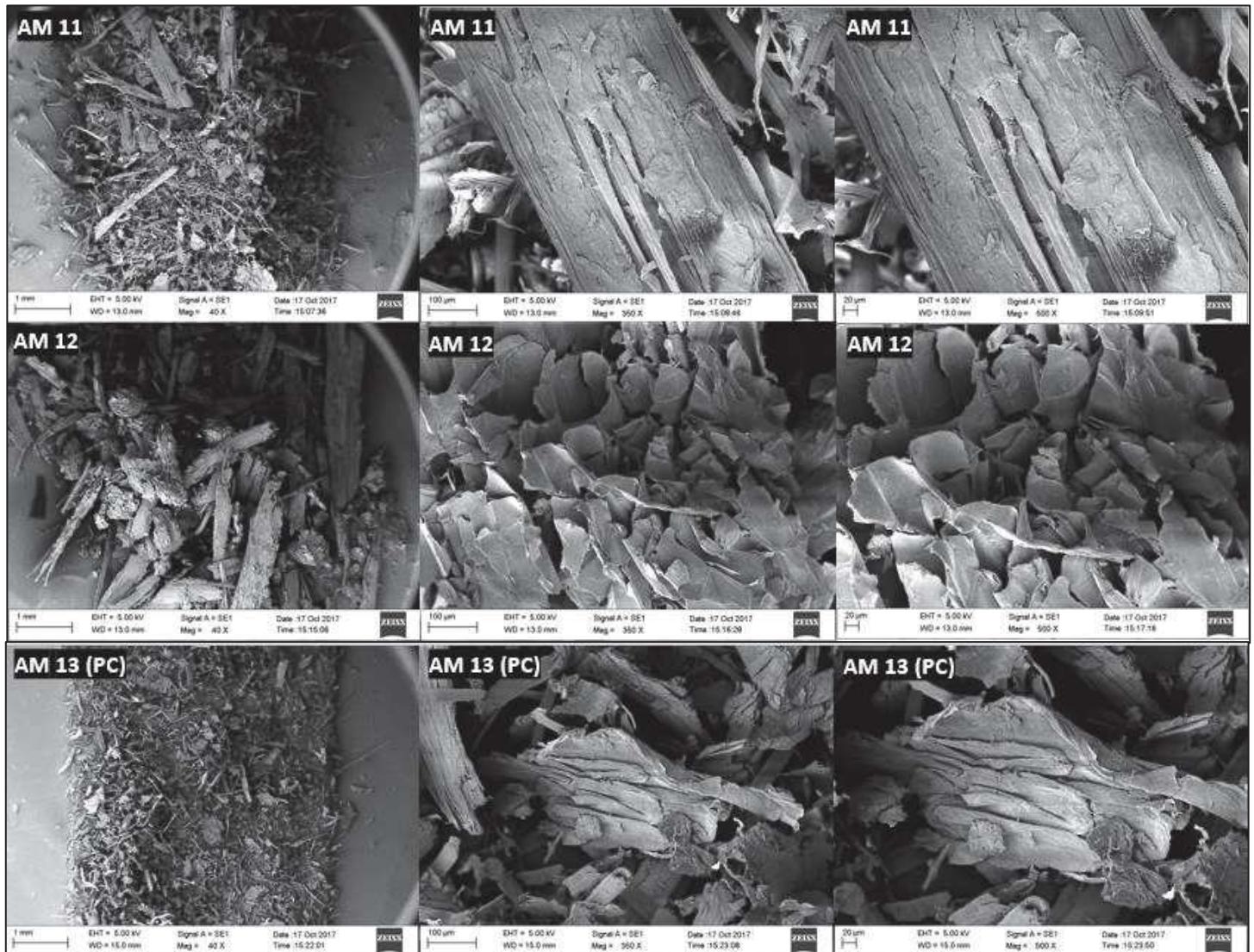
As modificações observadas nas fibras da biomassa, comprovam que o pré-tratamento provoca a ruptura da estrutura recalcitrante da biomassa, o que aumenta a área superficial do substrato provocando um aumento na digestibilidade do complexo enzimático e consequentemente um aumento no rendimento de açúcares (SANTOS., *et al* 2012).

Figura 20: Microscopia eletrônica de varredura do bagaço sem tratamento e pré-tratado.









Fonte: A autora

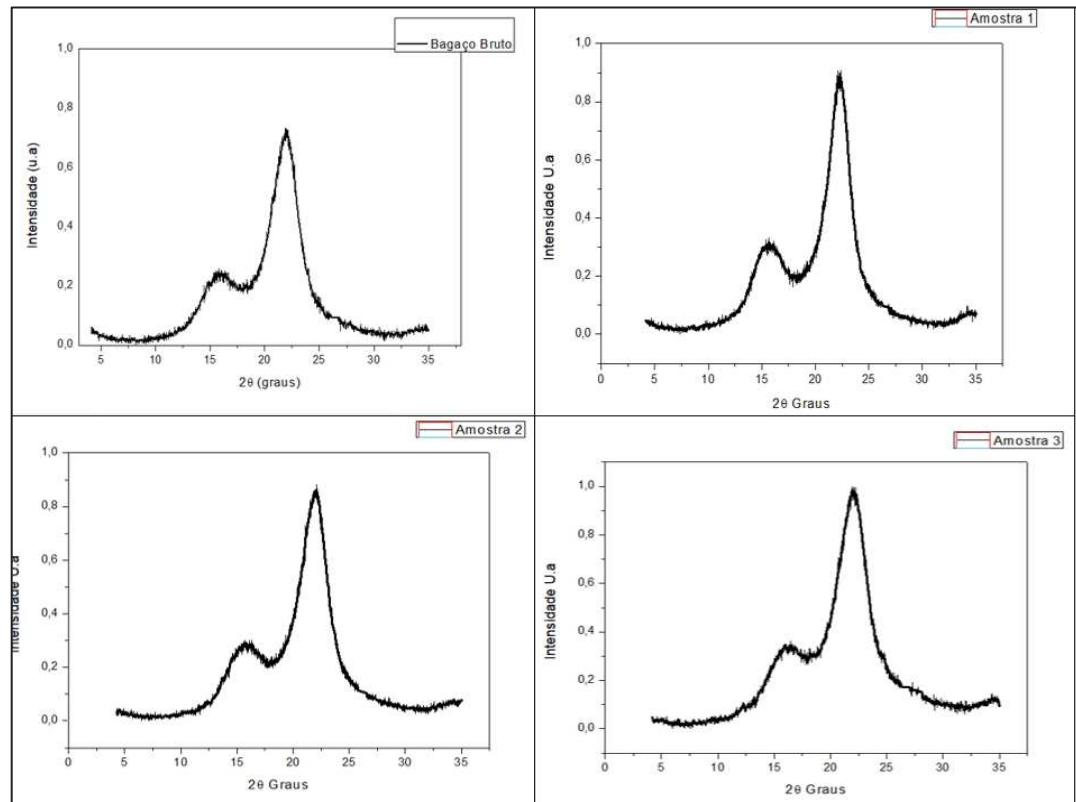
5.5 Difração de Raio-x (DRX)

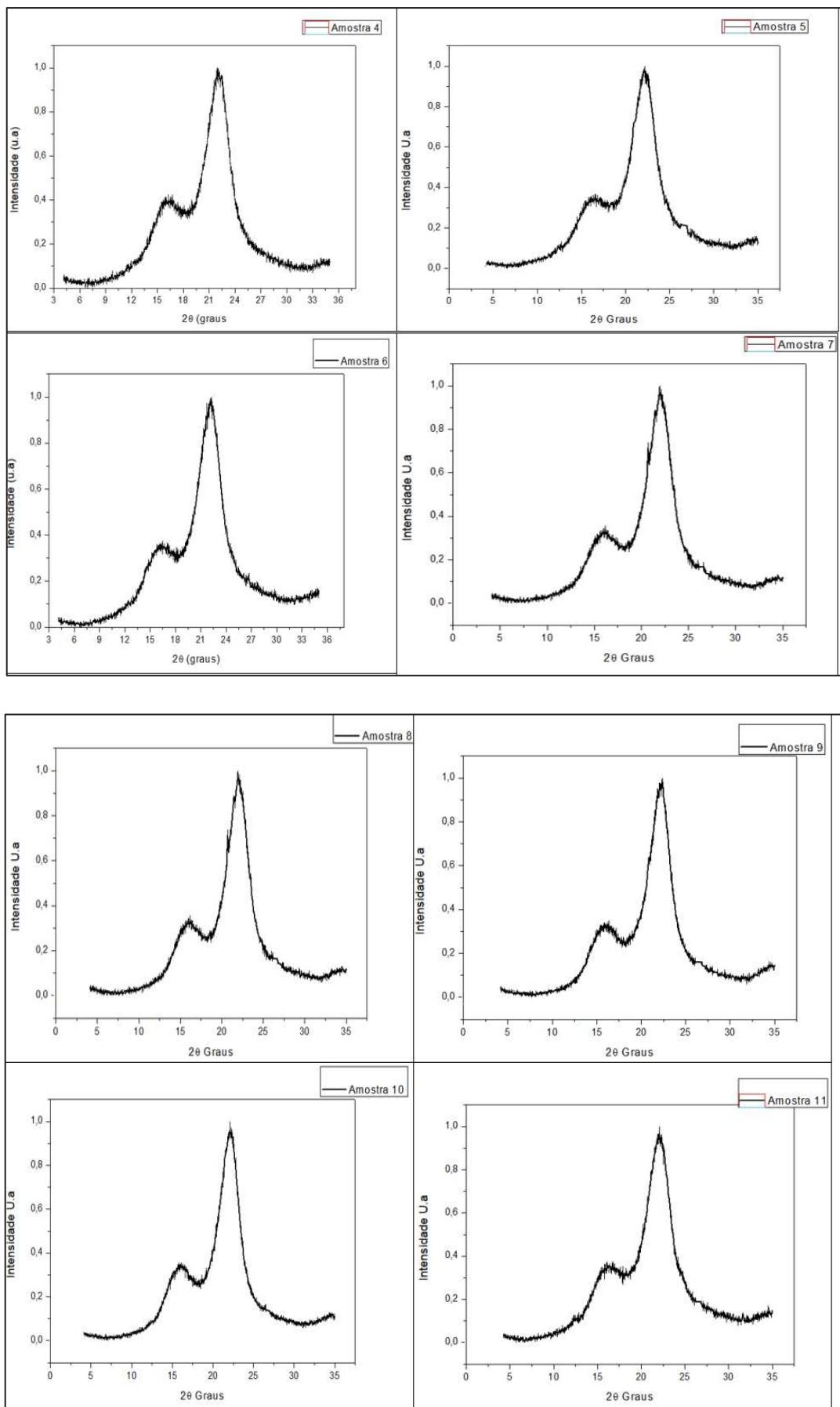
A celulose possui uma estrutura formada pela união de monômeros de D-glicose unidas por ligação glicosídica β -1,4. Sua estrutura formada por ligações de hidrogênio entre grupos OH que podem ocorrer de forma intramolecular (dentro da mesma molécula) ou intermolecular (entre moléculas adjacentes), conferem a mesma uma estrutura supramolecular (LENGOWSKI et al., 2013). Essa molécula possui regiões altamente ordenadas (regiões cristalinas), intermediadas por regiões menos cristalinas (regiões amorfas), sendo essa última mais propensa ao ataque de enzimas, absorção de água e ataque de reagentes (D'ALEMIDA, 1981).

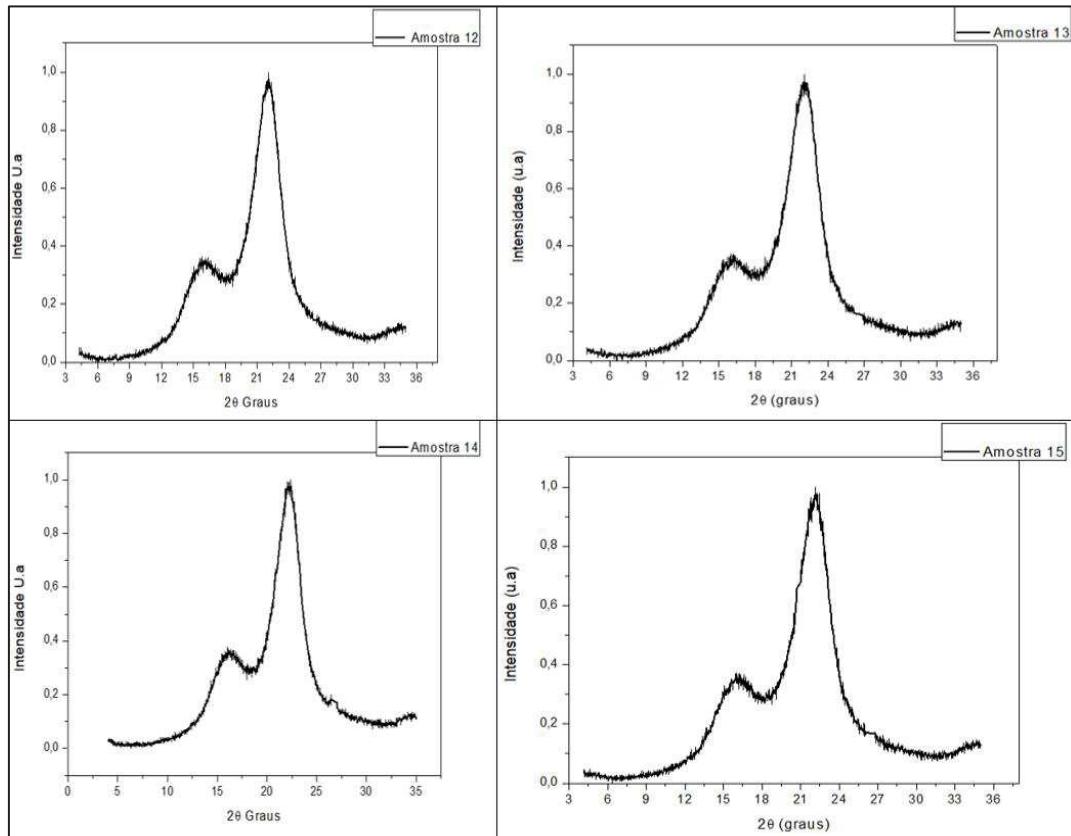
A proporção entre regiões amorfas e cristalinas determina o índice de cristalinidade (IC) da celulose, o que orientado em conjunto com as regiões amorfas e cristalinas afetam as propriedades mecânicas das fibras de celulose (LENGOWSKI et al., 2013). Os difratogramas

(Figura 22) mostram que os picos obtidos para as amostras *in natura* e pré-tratadas são característicos de celulose tipo I, onde o halo amorfo e o pico cristalino ficam situados entre os ângulos $18^\circ \leq 2\theta \leq 19^\circ$ e $22^\circ \leq 2\theta \leq 23^\circ$. Na Figura 20 é possível visualizar os difratogramas obtidos para o bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e para as amostras pré-tratadas, assim como, a tabela 7 apresenta os índices de cristalinidade (ICr) obtidos para cada uma das amostras.

Figura 22: Difratogramas obtidos para a amostra *in natura* e após o pré-tratamento.







Fonte: Autora

O índice de cristalinidade das amostras foi calculado com intuito de verificar se o pré-tratamento modifica a estrutura da celulose, os dados obtidos são apresentados na tabela 7.

Tabela 7: Índice de Cristalinidade (ICr)

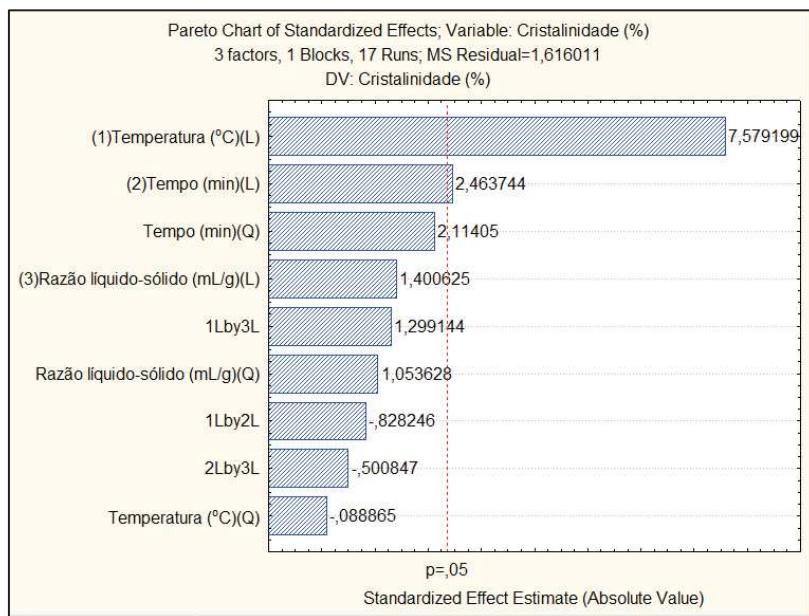
Amostra	ICr (%)
BB	57,60
Amostra 1	68,92
Amostra 2	69,54
Amostra 3	68,72
Amostra 4	65,12
Amostra 5	59,92
Amostra 6	63,31
Amostra 7	60,97
Amostra 8	66,80
Amostra 9	70,61
Amostra 10	65,20
Amostra 11	67,28
Amostra 12	63,67
Amostra 13	64,79
Amostra 14	64,91
Amostra 15	65,50

O índice de cristalinidade do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* foi de 57,60%, as amostras pré-tratadas apresentaram índice maior que do bagaço bruto. Segundo Silva *et al.* (2017), o aumento da cristalinidade em material lignocelulósico pré-tratado é relatado na literatura e esse aumento ocorre devido a solubilização das frações amorfas do material lignocelulósico, tais como lignina e hemiceluloses. No entanto, o aumento da cristalinidade não indica necessariamente que a celulose sofreu mudanças em sua estrutura cristalina (PERRONE *et al.*, (2016).

As superfícies de resposta para as variáveis dependentes do ICr são apresentadas nas Figuras 22 e 23. Os resultados obtidos nestes experimentos foram analisados com os programas Statistica® versão 7.0 (a partir do modelo quadrático).

O Diagrama de Pareto (Figura 23) para o índice de cristalinidade (ICr), mostra que a variável temperatura e tempo mais elevados são significativos para o aumento da cristalinidade do material.

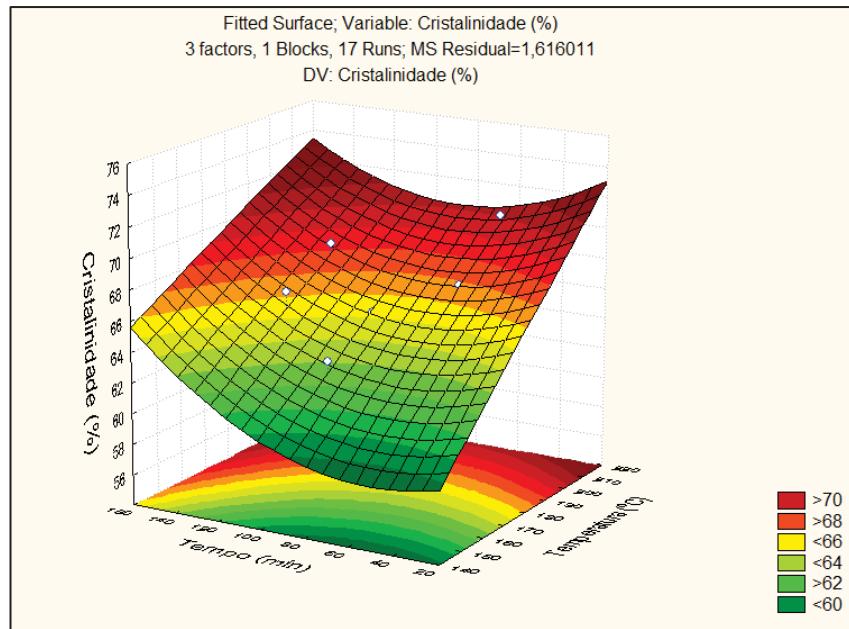
Figura 23: Diagrama de Pareto para o índice de cristalinidade (ICr)



Fonte: Autora

A análise feita pelo Diagrama de Pareto também é comprovada pelo gráfico de superfície (Figura 24) que relaciona o índice de cristalinidade (ICr) em função do tempo e da temperatura. É possível observar que para maiores temperaturas e maiores tempos de pré-tratamento o índice de cristalinidade foi maior.

Figura 24: Gráfico de superfície relacionando a cristalinidade com a T (°C) x t (min).



Fonte: Autora

5.6 Hidrólise Enzimática

A tabela 8 apresenta a concentração de açúcares redutores totais (ART), obtidos após hidrólise enzimática. Os dados apresentados mostram a concentração dos açúcares redutores totais (ART), da amostra de bagaço *in natura* e das amostras após o pré-tratamento.

Tabela 8: Concentração de ART (g/L) obtida após 72 h de hidrólise

Amostra	ART (g/L)
B. B	41,64
Amostra 1	412,35
Amostra 2	128,37
Amostra 3	88,61
Amostra 4	92,37
Amostra 5	92,62
Amostra 6	83,83
Amostra 7	126,27
Amostra 8	155,82
Amostra 9	299,92
Amostra 10	348,96
Amostra 11	159,94
Amostra 12	259,72
Amostra 13	334,65
Amostra 14	216,03

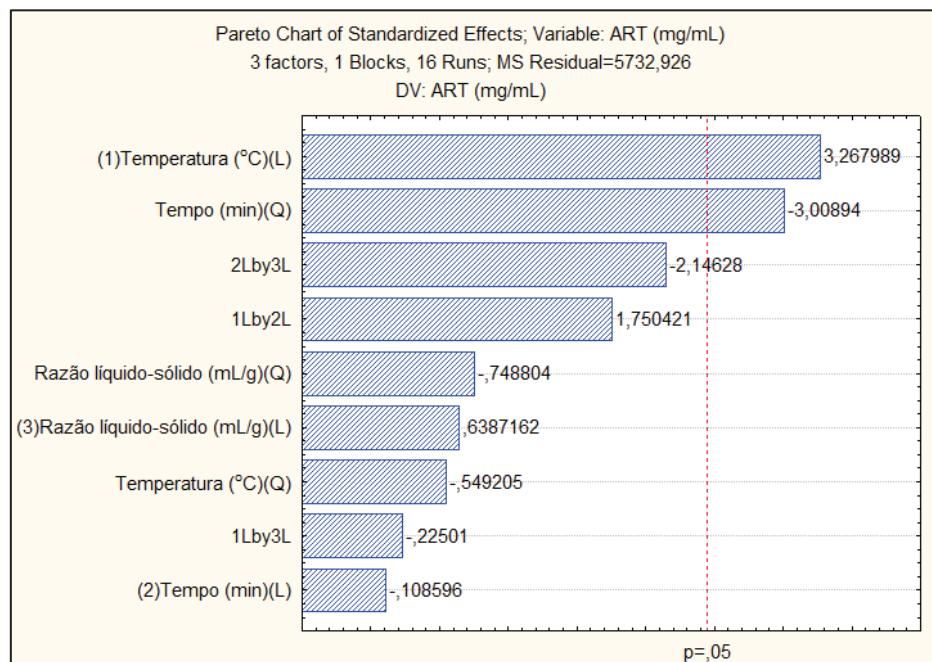
A concentração de açúcares redutores totais para o bagaço de cana-de-açúcar *in natura* após 72 horas de hidrólise, alcançou a concentração 41,64 g/L. Para as amostras pré-tratadas os resultados da tabela 7 mostram que o substrato pré-tratado pelo método organossolve é suscetível e acessível as enzimas, visto que na etapa de hidrólise enzimática utilizou-se uma carga de enzimas relativamente baixa 10 FPU/g de celulose presente no substrato seco, que resultou em concentrações altas de açúcares redutores totais (ART) para a maioria das amostras.

Os resultados obtidos na etapa de hidrólise enzimática foram analisados com o programa Statistica® versão 7.0 (a partir do modelo quadrático) e o Diagrama de Pareto e o gráfico de superfície podem ser vistos na Figura 25 e 26, respectivamente.

O Diagrama de Pareto (Figura 25) mostra que as melhores concentrações de açúcares redutores totais (ART), foi alcançada em amostras que foram pré-tratadas com temperaturas mais elevadas e tempo de pré-tratamento menores, portanto a temperatura é significativa para valores mais elevados e o tempo também é significativo para os menores tempos de reação.

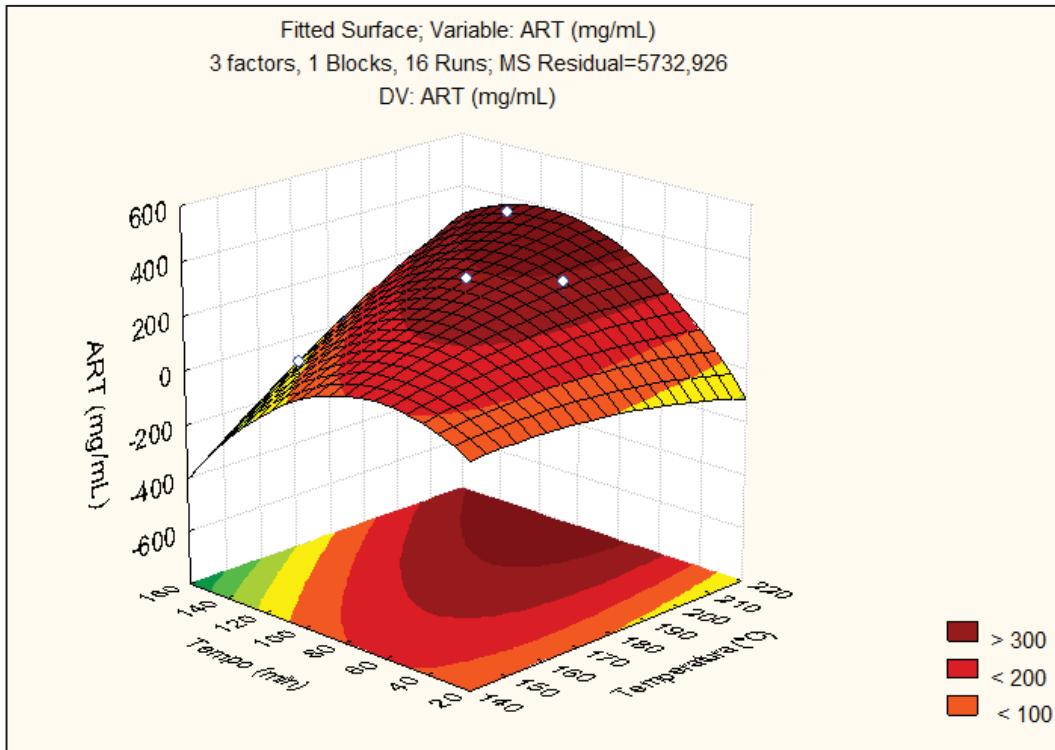
O gráfico de superfície (Figura 26) relacionando a superfície resposta (concentração de ART) com a temperatura e tempo do pré-tratamento também mostraram que para menores tempos e temperaturas mais elevadas a concentração de açúcares redutores totais foi maior.

Figura 25: Diagrama de Pareto para a concentração de ART considerando os efeitos de temperatura e tempo de pré-tratamento.



Fonte: Autora

Figura 26: Superfícies de resposta geradas a partir do modelo quadrático apresentando a relação da temperatura e tempo com a concentração de ART



Fonte: Autora

Essa análise torna-se mais compreensível quando comparamos essa condição com a amostra 9 (T: 210°C; t: 60 minutos) que teve concentração de ART de 299,92 mg/mL e amostra 10 (T: 200°C; t: 90 minutos) com concentração de 348,96 mg/mL, em ambas amostras a concentração de açúcares redutores totais (ART) pode ser considerado satisfatórios, e as mesmas foram pré-tratadas com temperaturas elevadas e tempos de reação relativamente baixos.

As amostras 1 e 9 que tiveram concentração de açúcar redutor total (ART) relativamente alta sendo respectivamente 412,36 mg/mL e 299,92 mg/mL, na etapa de caracterização em relação ao teor de lignina apresentaram valores altos de deslignificação, sendo que a amostra 1 teve 69,27% de deslignificação e a amostra 9 obteve 79,02 % de deslignificação.

A lignina na fibra vegetal funciona como uma barreira física ao redor das fibras celulósicas, por esta razão é necessário submeter a biomassa lignocelulósica a uma etapa de pré-tratamento para que ocorra a separação da matriz de lignina da fibra celulósica que é

convertida em glicose (OGEDA e PETRI, 2010). Essa concentração satisfatória de ART nas amostras, pode ser atribuída a eficácia do pré-tratamento organossolve com glicerol bruto na remoção de lignina.

Vários autores têm estudado o efeito do pré-tratamento organossolve com glicerol em bagaço de cana-de-açúcar.

Martin *et al.*, (2011), estudou o efeito do pré-tratamento com glicerol na recuperação e hidrólise enzimática de bagaço de cana. Em seu estudo os autores utilizaram glicerol, NaOH e H₂SO₄ para pré-tratar a biomassa. Na hidrólise enzimática utilizaram celulases de *Trichoderma reesei* (Celluclast 1.5L) e uma preparação de gly-glicosidase, com uma carga de enzimas de 25 FPU/g. Os resultados do estudo mostraram a eficácia do pré-tratamento com glicerol na hidrólise enzimática da celulose, sendo que a maior conversão global de celulose foi alcançada para o pré-tratamento somente com glicerol, sem adição de hidróxido de sódio e ácido sulfúrico, chegando em uma conversão de 85-94% de celulose, além disso com a celulose foi quase totalmente recuperada chegando a 72% do substrato pré-tratado.

O pré-tratamento organossolve tem sido estudado e utilizado para outros tipos de biomassa como cavacos de *Eucalyptus*, no estudo desenvolvido por Ramoní *et al.*, (2013), os autores observaram que o pré-tratamento com glicerol aquoso removeu 72% de lignina da madeira e preservou a celulose em 83%, além de apresentar uma hidrólise enzimática de 98% em 48 h com 20 FPU/g de Celluclast 1,5 L e 100 UI da Novozyme.

Hundt *et al.*, (2013) realizou a hidrólise enzimática quase completa da madeira pré-tratada com glicerol alcalino com carga enzimática de 15 FPU / g Celulase (Celluclast 1,5 L) e 30 CBU / g B-glucosidase (Novozyme 188), os autores conseguiram converter 97% da celulose na polpa em glicose usando celulases de *Trichoderma reesei* e β-glicosidase de *Aspergillus niger*.

Sun *et al.*, (2016), estudou o efeito do pré-tratamento com glicerol puro na biomassa de cana-de-açúcar, os autores submeteram os substratos pré-tratados a hidrólise enzimática com uma carga de enzima relativamente baixa, 6 e 10 FPU / g de substrato seco, de celulase Cellec CTec2. A 10 FPU / g de substrato seco, todos os substratos apresentaram uma hidrólise enzimática rápida, excedendo 90%. A 6 FPU / g substrato seco, a hidrólise enzimática de 72 h foi superior a 80%.

Analisando os dados obtidos na hidrólise enzimática e os dados presentes na literatura, pode observar que o pré-tratamento com glicerol é seletivo em uma variedade de substratos lignocelulósicos naturais, melhorando assim efetivamente a hidrolisabilidade dos substratos lignocelulósicos. Além disso, como mostrado nesse trabalho e no trabalho de Sun *et al.*, (2016), é possível obter bons resultados de hidrólise utilizando cargas de enzimas relativamente baixas, visto que um dos principais desafios na conversão de biomassa é o alto custo do pré-tratamento e das enzimas empregadas na hidrólise.

5.7 Análise de Glicose (C6) e Xilose (C5) nos açúcares redutores totais (ART)

Através do pré-tratamento almeja-se obter açúcares de cadeias C5 e C6, como xilose (açúcares com 5 carbonos) e glicose (açúcares com 6 carbonos). Sendo assim, a análise desses açúcares foi realizada em um cromatógrafo de fase líquida de alta eficiência (CLAE) modelo SHIMADZU equipado com detector de índice de refração (RID-6A SHIMADZU) e coluna Aminex HPX 87H (300 × 7,8 mm BIO-RAD). Os resultados obtidos para a concentração de glicose e xilose são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9: Concentração obtida de Glicose e Xilose após a hidrólise enzimática

Amostra	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)
B. B	5,78	5,20
Amostra 1	48,61	10,58
Amostra 2	48,02	4,37
Amostra 3	5,60	1,14
Amostra 4	10,13	4,60
Amostra 5	10,83	4,95
Amostra 6	9,43	4,25
Amostra 7	4,42	2,19
Amostra 8	9,81	6,66
Amostra 9	59,49	4,78
Amostra 10	59,75	6,39
Amostra 11	20,07	6,12
Amostra 12	39,60	9,25
Amostra 13	22,74	6,58
Amostra 14	20,59	5,87

Durante a hidrólise enzimática açúcares são formados, dentre eles tem-se dois tipos: as pentoses (xilose) que são provenientes da hidrólise da fração de hemiceluloses e as hexoses

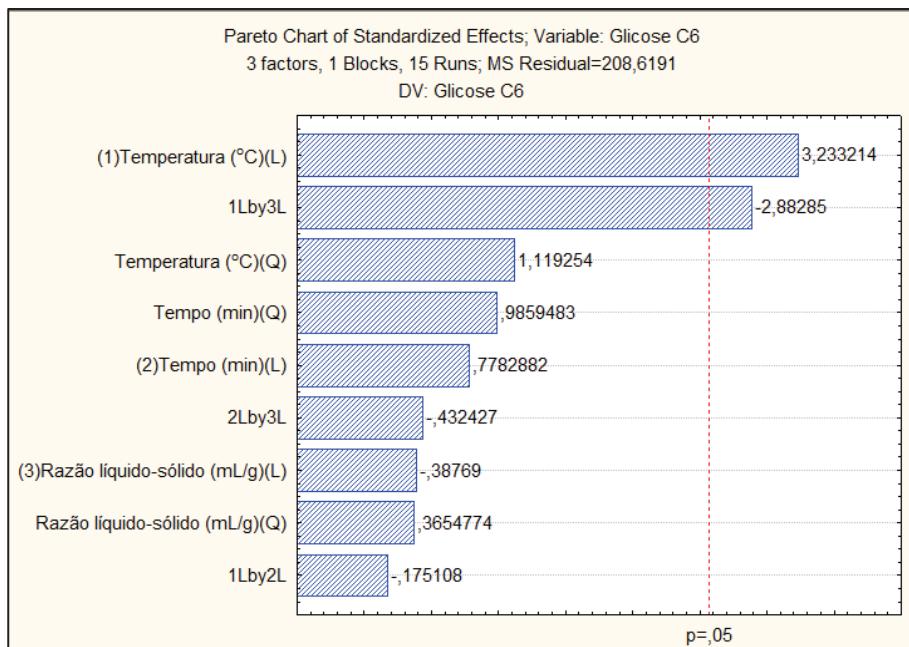
(glicose) que são geradas a partir da degradação de parte das hemiceluloses e da celulose (RABELO, 2007).

As amostras que apresentaram maiores concentrações de glicose foram as amostras 1, 2, 9 e 10, sendo que sua concentração foi respectivamente 48,61 (g/L), 48,02 (g/L), 59,49 (g/L) e 59,75 (g/L).

Em relação a concentração de xilose as amostras com maiores concentrações foram as amostras 1 e 12, sendo a concentração para a amostra 1 de 10,58 (g/L) e para a amostra 12 de 9,25 (g/L). Os resultados obtidos para a concentração de glicose e xilose foram analisados usando os programas Statistica® versão 7.0 (a partir do modelo quadrático) e OriginPro 8®, conforme são apresentados abaixo.

O Diagrama de Pareto (Figura 27) para a resposta glicose, mostra que a variável temperatura influência de forma significativa a obtenção de glicose e a interação da RSL com a temperatura também foi significativa, sendo que para as amostras pré-tratadas com temperaturas mais elevadas obteve-se após a hidrólise enzimática maiores concentrações de glicose. Os ensaios 1, 2, 9 e 10 apresentaram maiores concentrações de glicose e foram pré-tratados na faixa de temperatura de 180-210°C.

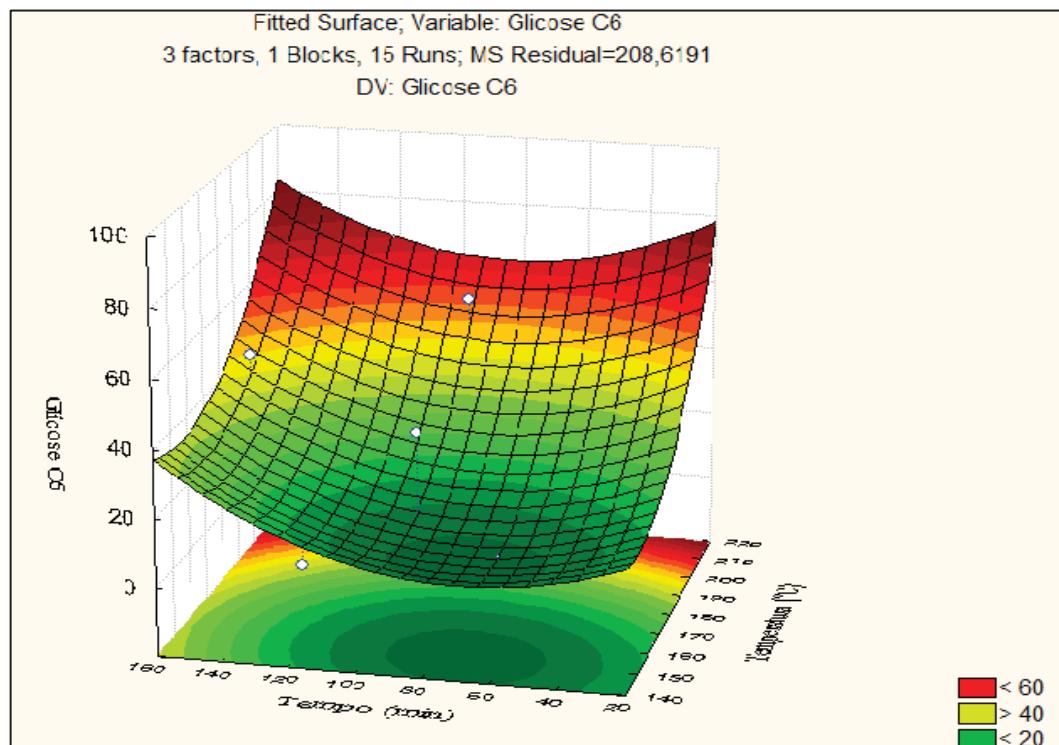
Figura 27: Diagrama de Pareto considerando as variáveis temperatura (°C), tempo (min) e RSL em função da resposta concentração de glicose.



Fonte: Autora

A Figura 28 apresenta o gráfico de superfície relacionando a concentração de glicose em função do tempo e temperatura de pré-tratamento, sendo possível observar que para a faixa mais elevada de temperatura obteve-se as maiores concentrações de glicose, sendo que o tempo de pré-tratamento não apresentou influência na concentração de glicose.

Figura 28: Gráfico de superfície relacionando concentração de glicose com tempo (min) x T (°C)

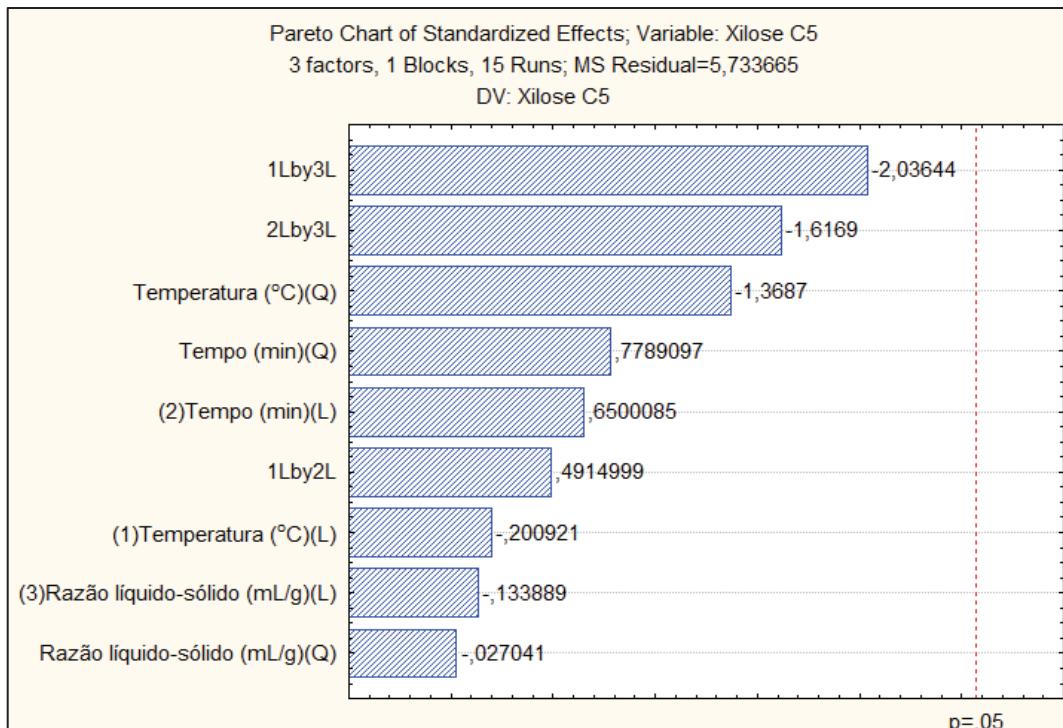


Fonte: Autora

Em relação a concentração de glicose obtida para as amostras 1, 9 e 10 observa-se que esse resultado está relacionado a outros resultados da caracterização, como a porcentagem de deslignificação, que foi a maior para as amostras em questão. Autores como Siqueira et al. (2013) reporta que amostras de bagaço de cana-de-açúcar com menor teor de lignina são mais facilmente hidrolisadas, evidenciando que a presença de lignina é um fator limitante para a eficiência do processo de hidrólise enzimática.

Em relação a concentração de xilose as amostras que obtiveram maiores concentrações foi a amostra 1 e amostra 12. Quando traçado o Diagrama de Pareto (Figura 29), foi possível observar que as variáveis definidas para o pré-tratamento (tempo, temperatura e RSL) não foram significativas para a concentração de xilose.

Figura 29: Diagrama de Pareto considerando as variáveis temperatura (°C), tempo (min) e RSL em função da resposta concentração de xilose.



Fonte: Autora

6.0 Conclusão

O pré-tratamento organossolve usando como solvente o glicerol bruto mostrou-se eficiente para tratamento do bagaço de cana-de-açúcar, as variáveis (temperatura, tempo e RSL) definidas no planejamento permitiram compreender melhor como o pré-tratamento promove a retirada de lignina e hemiceluloses da biomassa, podendo considerar que a deslignificação da biomassa foi eficiente para as temperaturas elevadas de pré-tratamento, sendo possível alcançar em uma amostra o valor máximo de 79,02% de deslignificação, além de rendimento de celulose com o teor elevado, chegando a 82,49%. Dessa forma pode-se concluir que o pré-tratamento é eficiente na remoção de lignina e hemiceluloses, o que foi comprovado através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e da técnica de difração de Raio-x.

O método de fracionamento permitiu preparar uma fração sólida com alto teor de celulose para a hidrólise enzimática, sendo que a quantidade de enzimas utilizadas (10 FPU/g de celulose presente no substrato) é considerada baixa, e mesmo assim possibilitou a obtenção de concentrações elevadas de açúcares redutores totais (ART). A análise de glicose nos açúcares redutores totais, mostrou que a melhor condição de pré-tratamento para a obtenção de glicose, que é o açúcar de maior interesse para a produção de etanol de segunda geração, foram: amostras 1 (T: 180°C, t: 150, RSL: 8) com concentração 48,61 g/L, amostra 2 (T: 210°C, t: 150, RSL: 8) com 48,02 g/L, amostra 9 (T: 210°C, t: 60, RSL: 8) com 59,49 g/L e amostra 10 (T:200°C, t:90, RSL: 6) com 59,75 g/L.

De forma geral, observa-se que a variável temperatura foi a mais relevante na etapa de pré-tratamento e que o melhor resultado obtido para a concentração de glicose foi para a amostra 9 que apresentou alta porcentagem de celulose residual (81,75%) após o tratamento, porcentagem de lignina total (16,82%), porcentagem de deslignificação (79,02%) e concentração de glicose de 59,49g/L.

Portanto, conclui-se a partir do trabalho realizado, que o pré-tratamento com glicerol bruto é capaz de promover a deslignificação eficiente do bagaço de cana-de-açúcar, promovendo a ruptura da estrutura recalcitrante da biomassa e favorecendo a hidrólise enzimática, resultando em altas concentrações de açúcares redutores totais e em concentrações significativas de glicose que pode ser fermentada para a produção de etanol de segunda geração.

7.0 REFERÊNCIA

- ANEEL – Agência Nacional de Energia Elétrica (Brasil). Atlas de energia elétrica do Brasil. 3. ed. 236p. – Brasília, Aneel, 2008.
- BAÊTA, B.E.L. Aproveitamento energético a partir da digestão anaeróbia de hidrolisado hemicelulósico gerado pelo pré-tratamento por auto-hidrólise do bagaço de cana- de-açúcar considerando o contexto da biorrefinaria. 2016. 159f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto. 2016.
- BAÊTA, B. E. L. et al. Optimization of sugarcane bagasse autohydrolysis for methane production from hemicellulose hydrolyzates in a biorefinery concept. *Bioresource Technology*, v. 200, p. 137–146, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.003>
- BASTOS, V. D. Etanol, alcoolquímica e biorrefinarias. Rio de Janeiro: BNDES Setorial, 2007.
- CANILHA, L. et al. 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*, 2012.
<https://doi.org/10.1155/2012/989572>
- CANILHA, L., SANTOS, V.T.O., ROCHA, G.J.M., ALMEIDA e SILVA, J.B., GIULIETTI, M., SILVA, S.S., FELIPE, M.G.A., FERRAZ, A., MILAGRES, A.M.F., CARVALHO, W. A study on the pretreatment of a sugarcane bagasse sample with dilute sulfuric acid. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* V. 38, p. 1467–1475, 2011.
<https://doi.org/10.1007/s10295-010-0931-2>
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira, Cana-de- açúcar, V.3 Safra 2016/17, N.3 Terceiro levantamento. Dezembro 2016. Disponível

em:http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_12_27_16_30_01_boletim_cana_portugues_-3o_lev_-16-17.pdf. Acessado em: 17 de maio de 2018.

- CHIARAMONTI, D.; PRUSSI, M.; FERRERO, S.; ORIANI, L.; OTTONELLO, P.; TORRE, P.; CHERCHI, F. Review of pretreatment processes for lignocellulosic ethanol production, and development of an innovative method. **Biomass and Bioenergy**, v.46, p.25–35, 2012. Elsevier Ltd.

<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.04.020>

- CORTEZ, Luís Augusto Barbosa; CRUZ, Carlos Henrique de Brito; SOUZA, Gláucia Mendes; CANTARELLA, Heitor; SLUYS, Marie-Anne van; MACIEL FILHO, Rubens; "Da criação ao fim do Proálcool", p. 29-60. In: Proálcool - Universidades e Empresas: 40 Anos de Ciência e Tecnologia para o Etanol Brasileiro. São Paulo: Blucher, 2016.

- D'ALMEIDA, M. L. O. Celulose e papel: tecnologia de fabricação de pasta celulósica. 2. ed. v. 1. São Paulo: IPT-SENAI, 1981.

- FRANCO, F. J. P. Aproveitamento da fibra do epicarpo do coco babaçu em compósito com matriz epóxi: Estudo do efeito do tratamento da fibra. 2010, 77f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Departamento de Ciências Exatas e da Terra. Natal - RN, 2010.

- GURGEL, L.V.A., PIMENTA, M.T.B., CURVELO, A.A.d.S., 2014. Enhancing liquid hot water (LHW) pretreatment of sugarcane bagasse by high pressure carbon dioxide (HP-CO₂). **Ind. Crop. Prod.** 57, 141–149, 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.03.034>

- HUNDT M, SCHINITZLEIN K, SCHINITZLEINM, G. Alkaline polyol pulping and enzymatic hydrolysis of hardwood: effect of pulping severity and pulp composition on cellulase activity and overall sugar yield. **Bioresour Technol.** V.136, pp. 672–9, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.02.084>

- IEA- International Energy Agency. World Energy Outlook. **IEA**, 2010.

- KIIPPER, P, G. Estudo da pré-hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar e fermentação alcoólica do mosto de xilose por *Pachysolen tannophilus*. 2009, 100 f. Dissertação (mestrado)

- Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro. Rio Claro, 2009.

- LEITE, Rogério Cerqueira; CORTEZ, Luís Augusto Barbosa; O etanol Combustível no Brasil. In: EMBRAPA. Bicombustíveis no Brasil - Realidades e Perspectivas. Brasília, 2008. p. 161-175.

- LENGOWSKI, E; MUNIS, G; VNISGOSKI, S; MAGALHÃES, W. Avaliação de métodos de obtenção de celulose com diferentes graus de cristalinidade. **Scientia Forestalis**, v. 41, n. 98, p. 185-194, 2013.

- MAGALHÃES, T, S. Estudo de pré-tratamentos de bagaço de cana para produção de etanol celulósico por hidrólise enzimática. 2011, 63 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. São José do Rio Preto, 2011.

- MATTOS, A, P. Caracterização termoquímica do glicerol bruto e aproveitamento energético da queima do glicerol em uma planta de médio porte de produção de biodiesel. 2014, 193 f. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica, Universidade Federal de Itajubá, Itajubá. 2014.

- MALDONADE, I.R.; CARVALHO, P.G.B.; FERREIRA, N.A. Protocolo para determinação de açúcares totais em hortaliças pelo método de DNS. Comunicado Técnico/Embrapa, n.85, ISSN 1414.9850, 2013.

- MARTÍN C, PULS J, SAAKE B, SCHREIBER A. Effect of glycerol pretreatment on component recovery and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. **Cell Chem Technol.** V.45, pp. 487–94, 2011.

- MEIHAN, B. et al. Two-stage fractionation of sugarcane bagasse by autohydrolysis and glycerol organosolv delignification in a lignocellulosic biorefinery concept. **Industrial crops & Products**, v 108, pp. 431- 441, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.06.049>

-MME. Ministério de Minas e Energia. Percentual obrigatório de biodiesel passa para 10%. Disponível em: http://www.mme.gov.br/web/guest/pagina-inicial/outras-noticas/-asset_publisher/32hLrOzMKwWb/content/percentual-obrigatorio-de-biodiesel-passa-para-10;jsessionid=ED1476C157C5E5C177AE5E1AE3B7065C.srv155?redirect=http%3A%2F%2Fwww.mme.gov.br%2Fweb%2Fguest%2Fpaginainicial%2Foutrasnoticas%3Bjsessionid%3DED1476C157C5E5C177AE5E1AE3B7065C.srv155%3Fp_p_id%3D101_INSTANCE_32hLrOzMKwWb%26p_p_lifecycle%3D0%26p_p_state%3Dnormal%26p_p_mode%3Dview%26p_p_col_id%3Dcolumn-1%26p_p_col_pos%3D1%26p_p_col_count%3D3. Acesso em: 25 de setembro 2018.

- NOVO, L.P., GURGEL, L.V.A., MARABEZI, K., CURVELO, A.A.D., 2011. Delignification of sugarcane bagasse using glycerol-water mixtures to produce pulps for saccharification. **Bioresour. Technol.** 102, 10040–10046.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.08.050>

- NOVOZYMES. Novozymes Cellic® CTec3: secure your plant's lowest total cost. 2012. <http://s3.amazonaws.com/zanran_storage/bioenergy.novozymes.com/ContentPages/2546502386.pdf>. Acesso em 10/2017.

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

<https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000700023>

- PASQUINI, D.; PIMENTA, M.T.B.; FERREIRA, L.H.; CURVELO, A.A.S. Extraction of lignina from sugar cane bagasse and *Pinus taeda* wood chios using ethanol-water mixtures and carbon dioxide at high pressures. **Journal of Supercritical Fluids**, v.36, n.1, p.31-39, 2005.
<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2005.03.004>
- PERRONE, O.M.; COLOMBARI, F.M.; ROSSI, J.S.; MORETTI, M.M.S.; BORDIGNON, S.E.; NUNES, C.C.C.; GOMES, E.; BOSCOLO, M.; DA-SILVA, R. Ozonolysis combined with ultrasound as a pretreatment of sugarcane bagasse: Effect on the enzymatic saccharification and the physical and chemical characteristics of the substrate. **Bioresource Technology**, v.218, p.69-76, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.072>
- PEITER, G.C.; ALVES, H.J.; SEQUINEL, R.; BAUTITZ, I.R. Alternativas para o uso do glicerol produzido a partir do biodiesel. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**. V.5. n.4, p.519-537, 2016.
<https://doi.org/10.5380/rber.v5i4.46501>
- RABELO, S. C. Avaliação de Desempenho do Pré-tratamento com Peróxido de Hidrogênio Alcalino para a Hidrólise Enzimática de Bagaço de cana-de-açúcar. Campinas, 2007. (Dissertação de Mestrado, UNICAMP).
- ROMANÍ A, RUIZ HcA, PEREIRA FB, DOMINGUES L, TEIXEIRAJA. Fractionation of *Eucalyptus globulus* wood by glycerol–water pretreatment: optimization and modeling. **Ind Eng Chem Res**. V. 52, pp. 14342–52, 2013.
<https://doi.org/10.1021/ie402177f>
- SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química nova**, v.35, n.5, p.1004–1010, 2012.
<https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000500025>

- SANTOS, R. S.; et al., Bioethanol from Jatropha Seed Cakes Produced by Acid Hydrolysis Followed by Fermentation with Baker's Yeast. **International Journal of Applied Science and Technology**, vol. 4, nº. 4, 2014.

- SEGAL, L.; CREELY, J.J.; MARTIN JR., A.E.; CONRAD, C.M. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. **Textile Research Journal**, v.29, n.10, p.786-794, 1959.

<https://doi.org/10.1177/004051755902901003>

- SILVA, T.A.L. **Avaliação do pré-tratamento de explosão a vapor catalisado por ácido cítrico e hidróxido de sódio sobre a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar.** 2017. 69f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.

- SIQUEIRA, G. et al. Enhancement of cellulose hydrolysis in sugarcane bagasse by the selective removal of lignin with sodium chlorite. **Applied Energy**, v. 102, p. 399–402, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.07.029>

- SUN, F.F., ZHAO, X., HONG, J., TANG, Y., WANG, L., SUM, H., LI, X., HU, J., Industrially relevant hydrolyzability and fermentability of sugarcane bagasse improved effectively by glycerol organosolv pretreatment. **Biotechnol. Biofuels** 9, 59, 2016.

<https://doi.org/10.1186/s13068-016-0472-7>

- TÉBÉKA, I. R. M.; SILVA, A. G. L.; PETRI, D. F. S.; Langmuir 2009, 25, 1582.

<https://doi.org/10.1021/la802882s>

- VASCONCELOS, YURI. Resíduos bem-vindos. Revista Pesquisa FAPESP, ed. 196, junho de 2012. Disponível em: <<http://revistapesquisa.fapesp.br/2012/06/14/residuos-bem-vindos/>>. Acessado em: 15 de junho de 2018.

- WOLF, L.D. Pré-tratamento organossolve do bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol e obtenção de xilooligômeros. 2011. 147f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.