

FABIANA DA SILVA PIETA

UTILIZAÇÃO DA METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA
PARA OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE AÇÚCARES PARA
BIOMASSA DE BAGAÇO DE CANA

CASCATEL
PARANÁ-BRASIL
MARÇO – 2019

FABIANA DA SILVA PIETA

UTILIZAÇÃO DA METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA
PARA OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE AÇÚCARES PARA
BIOMASSA DE BAGAÇO DE CANA

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Energia na Agricultura, para obtenção do título de Mestre.

ORIENTADOR: Dr. Reinaldo Aparecido Bariccatti

COORIENTADOR: Dr. Reginaldo Ferreira Santos

CASCADEL
PARANÁ-BRASIL
MARÇO - 2019

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Pieta, Fabiana da Silva

Utilização da metodologia de superfície de resposta para a otimização da extração de açúcares para biomassa de bagaço de cana / Fabiana da Silva Pieta; orientador(a), Reinaldo Aparecido Bariccatti; coorientador(a), Reginaldo Ferreira Santos, 2019.

59 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, , Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Energia na Agricultura, 2019.

1. Bagaço de cana-de-açúcar. 2. Pré-tratamento químico. 3. Açúcares. I. Bariccatti, Reinaldo Aparecido. II. Santos, Reginaldo Ferreira. III. Título.

FABIANA DA SILVA PIETA

Utilização da metodologia de superfície de resposta para otimização da extração de açúcares para biomassa de bagaço de cana

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Energia na Agricultura em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestra em Engenharia de Energia na Agricultura, área de concentração Agroenergia, linha de pesquisa Biocombustíveis, APROVADO(A) pela seguinte banca examinadora:



Orientador(a) - Reinaldo Aparecido Bariccatti

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)



Armin Feiden

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)



Clayton Antunes Martin

Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Campus de Toledo (UTFPR)

Cascavel, 26 de março de 2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar sempre presente na minha vida, me guiando e protegendo por todos os caminhos.

A minha Família, especialmente a minha mãe Anilda, pela paciência, amor, apoio, ajuda, por sempre me incentivarem e torcerem por mim.

Ao meu noivo Pedro Paulo, pela paciência, apoio e incentivo.

Ao meu orientador Prof. Dr. Reinaldo A. Bariccatti, pelos conhecimentos transmitidos, pela paciência e por me direcionar de forma correta.

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), campus de Cascavel, pela disponibilidade de infraestrutura e laboratórios utilizados nesta pesquisa.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura da biomassa lignocelulósica.	7
Figura 2 - Representação estrutural da celulose com as ligações β -1,4 da cadeia e as ligações de hidrogênio.....	9
Figura 3 - Representação das unidades de polissacarídeos que compõem a hemicelulose.	10
Figura 4 - Representação estrutura da lignina.	11
Figura 5 - Representação do efeito do pré-tratamento na estrutura da biomassa lignocelulósica.....	12
Figura 6 - Reflexão e refração de um feixe de luz ao passar de um meio de propagação para outro.	17
Figura 7 - Componentes de um sistema HPLC.	19
Figura 8 - Banho úmido com termômetro digital.....	24
Figura 9 - Composição média do hidrolisado hemicelulósico obtidos por HPLC.....	29
Figura 10 - Superfície de resposta para quantidade de sólidos solúveis extraídos em função das variáveis massa (g) e concentração do ácido (%) a uma temperatura de 37,5 °C.	31
Figura 11 - Superfície de resposta para quantidade de sólidos solúveis extraídos em função das variáveis massa (g) e temperatura (°C), com concentração do ácido a 7,5%.	32
Figura 12 - Superfície de resposta para quantidade de sólidos solúveis extraídos em função das variáveis temperatura (°C) e concentração de ácido (%), com quantidade de massa em 10g.....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores para a composição média dos constituintes do bagaço de cana ..5	5
Tabela 2 - Composição mássica em diferentes materiais lignocelulósicos6	6
Tabela 3 - Tipos de pré-tratamento de biomassas lignocelulósicas 13	13
Tabela 4 - Especificações do Ácido Sulfúrico.....22	22
Tabela 5 - Planejamento Fatorial 2 ³23	23
Tabela 6 - Especificações do Banho Úmido.....24	24
Tabela 7 - Média e desvio padrão dos sólidos solúveis obtidos por refratômetro em ° Brix26	26
Tabela 8 - Efeitos significativos das variáveis e suas interações27	27
Tabela 9 - Concentração média e desvio padrão dos açúcares glicose (gli), xilose (xil) e celobiose (celo) presentes no hidrolisado de bagaço de cana, segundo as condições estabelecidas obtidas por cromatografia líquida.30	30
Tabela 10 - Análise de variância para o ajuste de superfície34	34

PIETA, Fabiana da Silva. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Setembro de 2018. **Utilização da metodologia de superfície de resposta para otimização da extração de açúcares para biomassa de bagaço de cana.** Professor Orientador Dr. Reinaldo Aparecido Bariccatti. Professor Coorientador Dr. Reginaldo Ferreira Santos

RESUMO

A biomassa lignocelulósica está identificada entre as fontes com potencial para suprir uma parcela de energia consumida pela sociedade, como uma importante matéria-prima para a produção de biocombustíveis e outros produtos de valor agregado, ajudando para o suprimento global. Os materiais lignocelulósicos são compostos de celulose, hemicelulose e lignina e quando submetidos ao pré-tratamento alteram seus fatores estruturais liberando esses açúcares. O objetivo do trabalho é a extração de açúcares do bagaço de cana-de-açúcar a partir do pré-tratamento químico com ácido sulfúrico diluído, com um planejamento fatorial de 3 fatores com dois níveis cada, sendo eles quantitativos. Foram adotados os níveis de 5 g e 15 g para massa da amostra, duas variações de concentração do ácido 5% e 10% e a variação de temperatura 25 °C e 50 °C. A caracterização do hidrolisado se deu através do índice de refração e por cromatografia líquida de alta eficiência. Para o índice de refração, os ensaios 3, 7 e 8 tiveram maior quantidade de sólidos solúveis extraídos, sendo 13,005, 13,025 e 13,010 ° Brix, respectivamente. Segundo os efeitos obtidos a partir dos resultados do índice de refração, o único efeito principal significativo é o aumento da concentração de ácido que aumenta o índice de refração. Nos resultados obtidos por cromatografia líquida conseguimos identificar a presença de glicose, xilose e celobiose nas soluções e a condição que resultou numa maior extração de açúcares foi: 15 g de biomassa, 10% de concentração de ácido e temperatura a 50 °C. Com a concentração do ácido no limite superior (10%) a extração de açúcares nesse trabalho foi significativa com 13,025 g L⁻¹ (solução 8). O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

PALAVRAS-CHAVE: materiais lignocelulósicos, pré-tratamento químico, açúcares

PIETA, Fabiana da Silva. State University of West Paraná, September 2018.
Utilization of response surface methodology for optimization of sugar extraction for sugarcane bagasse biomass. Advisor Dr. Reinaldo Aparecido Bariccatti. Co-advisor Dr. Reginaldo Ferreira Santos

ABSTRACT

Lignocellulosic biomass is identified among the sources with the potential to supply a portion of energy consumed by society, as an important raw material for the production of biofuels and other value-added products, helping to provide global supply. Lignocellulosic materials are composed of cellulose, hemicellulose and lignin and when subjected to pretreatment alter their structural factors releasing these sugars. The objective of this work is the extraction of sugars from sugarcane bagasse from the chemical pretreatment with diluted sulfuric acid, with a factorial planning of 3 factors with two levels each, being quantitative. The levels of 5 g and 15 g for sample mass, two variations of 5% and 10% acid concentration and 25 ° C and 50 ° C temperature variations were adopted. The characterization of the hydrolyzate was done through the refractive index and by high performance liquid chromatography. For the refractive index, the tests 3, 7 and 8 had the highest amount of soluble solids extracted, being 13.005, 13.025 and 13.010 ° Brix, respectively. According to the effects obtained from the results of the refractive index, the only significant main effect is the increase in acid concentration which increases the refractive index. In the results obtained by liquid chromatography we were able to identify the presence of glucose, xylose and cellobiose in the solutions and the condition that resulted in a higher sugar extraction was: 15 g of biomass, 10% of acid concentration and temperature at 50 °C. With the concentration of the acid in the upper limit (10%) the sugar extraction in this work was significant with 13.025 g L⁻¹ (solution 8). The present work was carried out with the support of the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel - Brazil (CAPES) - Financing Code 001.

KEYWORDS: lignocellulosic materials, chemical pre-treatment, sugars

INDICE

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Bagaço de cana de açúcar	4
2.2. Materiais Lignocelulósicos	5
2.3. Celulose	7
2.4. Hemicelulose	9
2.5. Lignina	10
2.6. Diferentes pré-tratamentos utilizados em biomassas lignocelulósicas ..	12
2.7. Pré-tratamento químico com ácido	15
2.8. Índice de refração por refratômetro	16
2.9. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. Localização do experimento	21
3.2. Coleta do Bagaço de cana	21
3.3. Preparo da biomassa	21
3.4. Preparo das soluções para o pré-tratamento	22
3.5. Pré-tratamento da biomassa com ácido sulfúrico diluído	22
3.6. Quantificação dos açúcares	24
3.6.1. Determinação de sólidos solúveis por refratômetro	24
3.6.2. Determinação de monossacarídeos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	25
3.7. Análise Estatística	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1. Determinação de Sólidos Solúveis (° Brix)	26
4.2. Determinação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	28
4.3. Análise estatística	31
5. CONCLUSÃO	35
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
APÊNDICES	43

1. INTRODUÇÃO

A crescente preocupação pela estagnação energética aliada à necessidade de preservar o meio ambiente são as principais razões para a busca por fontes renováveis alternativas e viáveis para a produção de combustíveis sustentáveis (PEREIRA et al., 2015). Os biocombustíveis, entre eles o bioetanol de segunda geração, são alternativas com um potencial promissor, pois para a sua produção são utilizados subprodutos das atividades agrícolas, no caso do bioetanol é o bagaço da cana de açúcar (HICKERT, 2010).

A biomassa lignocelulósica está identificada entre as fontes com potencial para suprir uma parcela de energia consumida pela sociedade como uma importante matéria-prima para a produção de biocombustíveis e outros produtos de valor agregado, ajudando para o suprimento global de energia. Assim, o Brasil tem destaque no sentido de substituir os combustíveis fósseis pelo etanol renovável da cana-de-açúcar. Além disso, o Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e, juntamente com os EUA, lidera a produção mundial de bioetanol, obtendo na safra de 2017/2018 cerca de 633,26 milhões de toneladas de cana e 37,86 milhões de toneladas de açúcar. Já para o etanol atingiu uma produção de 27,8 bilhões de litros na safra de 2017/2018 (CONAB, 2018; UNICA, 2018).

Segundo MILANEZ et al. (2015) a obtenção do bioetanol de segunda geração no Brasil possui potencial para aumentar a produtividade em até 50% com relação à produção atual. Esse resultado é possível em razão da eficiência energética de materiais lignocelulósicos que podem produzir teoricamente, para cada 10 milhões de toneladas de biomassa seca, 600 milhões de galões de bioetanol, o que significa aproximadamente 227,12 L/tonelada, e isto considerando apenas a fração celulósica do material (PEREIRA JR. et al., 2008 apud SANTOS, 2012).

Qualquer matéria que tenha em sua composição açúcar ou outro carboidrato pode ser utilizada como matéria-prima para produção de bioetanol, entre eles estão as madeiras, gramíneas e algas (BANSAL et al., 2013). De acordo com os tipos de carboidratos presentes na matéria-prima, elas podem ser classificadas em três grupos diferentes: materiais açucarados, materiais amiláceos e lignocelulósicos, sendo este último grupo derivado de vegetais que necessitam de pré-tratamento

físico e químico para obtenção de etanol, como o bagaço e a palha da cana, entre outros (BARCELOS, 2012).

Com relação à sua estrutura, os materiais lignocelulósicos são compostos de 32-50% de celulose, 19-25% de hemicelulose, 23-32% de lignina, extrativos, cinzas e outros componentes menos representativos (SUN et al., 2016 e BRIENZO et al., 2014), porém dependendo da espécie da planta, idade, tempo de colheita e condição ou estágio de crescimento, a proporção desses componentes pode variar (BARCELOS, 2012).

A biomassa lignocelulósica possui excelentes mecanismos para proteger seus carboidratos estruturais da degradação por microrganismos e enzimas. Os processos de pré-tratamento da biomassa alteram seus fatores estruturais (volume e tamanho dos poros, tamanho da partícula e área superficial específica), sua composição química (lignina, hemiceluloses e grupo acetil) e fatores da estrutura da celulose (cristalinidade e grau de polimerização) (ZHAO et al., 2012).

Entre os processos de pré-tratamento a hidrólise com ácido diluído é um dos mais estudados. Esse pré-tratamento pode ser realizado com diferentes ácidos, como ácido sulfúrico, ácido clorídrico, ácido acético e ácido fosfórico. O pré-tratamento com ácido diluído resulta na solubilização da hemicelulose, separando a biomassa em uma fração líquida contendo, predominantemente, pentoses e uma fração sólida composta, majoritariamente, por celulose e lignina (MUSSATTO et al.; 2010).

Dependendo das condições operacionais, a fração líquida será constituída de açúcares (xilose, glicose e arabinose) e produtos da decomposição das hemiceluloses (como oligômeros dos polímeros e ácido acético gerado pela hidrólise de grupos acetil ligados aos açúcares) e/ou produtos da decomposição de monossacarídeos (como furfural, produto da desidratação de pentoses, e 5-hidroximetilfurfural (HMF), produto da desidratação de hexoses) (GÁMEZ et al., 2006).

Entre as condições operacionais que afetam o pré-tratamento ácido estão concentração do ácido, tempo e temperatura. A variação nessas condições afeta a capacidade do pré-tratamento e a composição da biomassa de modo que se modifique durante o processo. Além disso, a razão sólido/líquido também exerce influência no processo, tendo relação com a concentração de xilose e ácido acético

na fração líquida (PEDERSEN E MEYER, 2010, BETANCUR E PEREIRA JR., 2010).

O pré-tratamento é realizado com o intuito de aumentar a área superficial da biomassa, elevar a sua porosidade, reduzir a cristalinidade da celulose (SANTOS, 2012), aumentar a eficiência, baixar os custos de produção e diminuir a formação de inibidores (CHATUVERDI; VERMA, 2013). Conhecer extremamente a biomassa que será utilizada é necessário para que se tenha uma maior eficiência na obtenção dos biocombustíveis. Afinal é esta caracterização que irá fornecer informações importantes para que seja determinado o melhor processo ou método a ser utilizado, e assim, obter maiores rendimentos, minimizar custos e impactos ambientais (OLIVEIRA, 2013).

Neste contexto, o presente estudo tem como objetivo geral a extração de açúcares do bagaço de cana-de-açúcar a partir do pré-tratamento químico com ácido sulfúrico diluído, com um planejamento fatorial de 3 fatores com dois níveis cada, sendo eles quantitativos. Foram adotados os níveis de 5 g e 15 g para massa da amostra, duas variações de concentração do ácido 5% e 10% e a variação de temperatura 25 °C e 50 °C. Os objetivos específicos são a caracterização do hidrolisado através do índice de refração e por cromatografia líquida de alta eficiência. Com isto, pretende-se avaliar o efeito de cada variável na extração do açúcar.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Bagaço de cana de açúcar

Como resultado do processo de moagem da cana-de-açúcar obtém-se o bagaço, que é um subproduto sólido fibroso, captado no último terno da moenda, durante a extração do caldo bruto para a produção de açúcar. Tem como principal uso, atualmente, a geração de energia térmica e elétrica através de sua combustão nas caldeiras de alta pressão das usinas (FERNANDES et al., 2017).

O bagaço de cana-de-açúcar é uma biomassa rica em açúcares complexos como a hemicelulose e a celulose, carboidratos não-fermentáveis. Entretanto, esses carboidratos são formados por monossacarídeos fermentáveis, xilose e glicose, despertando o interesse no estudo dessa biomassa para a fabricação de etanol de segunda geração (2G) (FERNANDES, 2018).

Com o crescente aumento da produção agrícola há um aumento na produção de resíduos agrícolas, o que significa maior atenção para o aproveitamento e/ou reciclagem desses materiais (OLIVEIRA; COSTA, 2012). O bioetanol derivado das biomassas vegetais, como o bagaço de cana de-açúcar, é considerado uma das alternativas mais promissoras aos combustíveis fósseis, petróleo e carvão vegetal, ao ser usado como um combustível renovável devido a sua queima ser menos poluente, contribuindo na redução de emissão de dióxido de carbono, reciclando gás carbônico (CO₂) da atmosfera (FERNANDES, 2018).

O bioetanol possui maior número de octanas, maior inflamabilidade, velocidade e vaporização do que a gasolina (ELGHARBAWY et al., 2016 e SUN, et al., 2016). A importância da discussão do uso do bagaço de cana-de-açúcar para a indústria sucro-energética-alcooleira está na possibilidade de redução de custos, de perdas no armazenamento nos pátios ao ar livre e dos impactos ambientais (COSTA e DUARTE, 2010).

Para isso, é necessário um procedimento para liberar esses açúcares presentes na celulose numa forma que possam ser facilmente utilizados. O objetivo é obter mais açúcar que possa ser fermentado (OLIVEIRA; COSTA, 2012). Na Tabela 1 estão expostos os valores da composição média de alguns constituintes do bagaço de cana em diferentes trabalhos.

Tabela 1 - Valores para a composição média dos constituintes do bagaço de cana

Glicose (%)	Xilose (%)	Arabinose (%)	Lignina Solúvel (%)	Lignina Insolúvel (%)	Cinzas (%)	Matéria Base Seca (%)
33,8	22	2,4	1,4	22,5	6,3	91,0
46,0	25,0	2,1	3,2	1,5	2,3	80,1
40,7	16,9	-	23,4	23,4	-	81,0
41,95	21,7	-	-	23,61	-	87,3

Fonte: Biswas et al., 2014; Prado et al., 2014; Khuong et al, 2014; Gao et al., 2013; adaptado pelo autor.

Os componentes químicos da parede celular das fibras do bagaço variam de acordo com diversos fatores, dentre eles o tipo de cana, o tipo de solo, as técnicas de colheita e até o manuseio (PANDEY et al., 2000).

Segundo Gámez et al. (2006) a utilização do bagaço restante viabilizaria economicamente o investimento necessário para adaptar as usinas de álcool e açúcar para a produção de etanol lignocelulósico, resolvendo o problema de abastecimento da indústria sucroalcooleira, oferecendo vantagens socioambientais, além de aumentar o rendimento do processo que passará a utilizar seu resíduo excedente como biomassa para geração do etanol de segunda geração.

2.2. Materiais Lignocelulósicos

A biomassa vegetal é todo material orgânico, não fóssil, que tenha conteúdo de energia química no seu interior; isso inclui todas as vegetações aquáticas ou terrestres, árvores, resíduos agrícolas, resíduos agroindustriais, etc. (OMACHI et al. 2004). Já o termo resíduo pode ser definido como aquilo que sobra de um processo de produção ou exploração, de transformação ou utilização (QUIRINO, 2002).

Os materiais lignocelulósicos de forma geral são heterogêneos, duros e fibrosos, com uma parede celular de estrutura complexa, resistente e recalcitrante. São constituídos por carboidratos como: a celulose (32 a 50%) e a hemicelulose (19

a 25%, como xilose, arabinose e xiloglucana), pectinas, e pequenas quantidades de extrativos. Os materiais lignocelulósicos são impregnados com uma matriz de lignina (23 a 32%), que dá sustentação, e que também, é uma barreira mecânica para proteção da planta (SUN et al., 2016 e BRIENZO et al., 2014). Na Tabela 2 é apresentada a composição mássica dos três principais compostos para diferentes biomassas lignocelulósicas.

Tabela 2 - Composição mássica em diferentes materiais lignocelulósicos

Material	Celulose	Hemicelulose	Lignina
Bagaço da cana	32-48	19-24	23-32
Palha da cana	40-44	30-32	22-25
Madeira mole	40-44	25-29	25-31
Madeira dura	43-47	23-35	16-24
Palha de trigo	37-41	27-32	13-15
Palha de cevada	31-45	27-38	14-10
Casca de cereais	39-47	26-31	3-5
Fibra de bananeira	60-65	6-8	5-10
Espiga de milho	45	35	15
Forragem de milho	38-40	28	7-21

Fonte: Santos et al., 2012.

Dentre as biomassas apresentadas, o bagaço da cana destaca-se por ser altamente energético e de grande abundância, uma vez que sua produção está atrelada ao desempenho da safra da cana de açúcar (ASSUMPÇÃO, 2015). As biomassas vegetais são fontes de carboidratos renováveis e de baixo custo, favorável ao meio ambiente, são matérias-primas na produção de biocombustíveis e produtos químicos amplamente disponíveis na indústria e agricultura (BEHERA et al., 2014)

Além disso, o seu custo de transporte para o reaproveitamento é menor, quando comparado à palha da cana, uma vez que é obtido logo após a extração do caldo, nos processos de moagem, enquanto que a palha é parcialmente deixada na lavoura com intuito de proteger o solo da proliferação de microrganismos e na reciclagem dos nutrientes (ASSUMPÇÃO, 2015).

Por outro lado, a obtenção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos não é tão simples como aquele gerado a partir de materiais ricos em açúcar ou amido (CHENG; TIMILSINA, 2011). A parede vegetal das biomassas é formada por fibras de celulose que estão envolvidas por uma rede de hemicelulose e embebidas por uma matriz de lignina que estão fortemente interligadas através de ligações covalentes ou não covalentes, como está representada na Figura 1 (SUN, et al., 2016).

Essa estrutura complexa dificulta o acesso à celulose na parede celular, por isso, precisam de um pré-tratamento para modificar sua estrutura, composição química, o grau de polimerização, cristalinidade, superfície de contato e a capacidade de adsorção da enzima no material para superar essa recalcitrância e aumentar a digestão enzimática dos polissacarídeos (MAURYA et al., 2015, SUN et al, 2016).

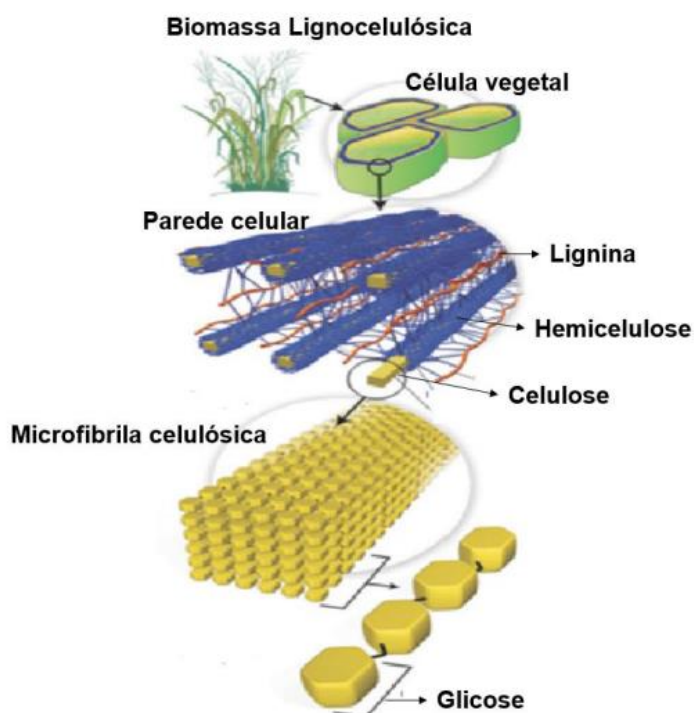


Figura 1 – Estrutura da biomassa lignocelulósica (Adaptado de KONDO e POLYM, 1997).

2.3. Celulose

A celulose ($C_6H_{10}O_5$) é o principal constituinte da parede celular das biomassas vegetais (lignocelulósicas). É um homopolissacarídeo caracterizado por possuir uma cadeia longa e alto peso molecular e também por ser um dos materiais poliméricos mais abundantes na natureza (SUN, et al., 2016). As hidroxilas são os grupos funcionais predominantes; a celulose pode ser linear e uniforme, formada por unidades repetitivas (monômeros) de celobiose (dímero de glicose), unidas entre si por ligações β -1,4-glicosídicas (ASSUMPÇÃO, 2015).

Moléculas de celulose ligam-se entre si, paralelamente, por meio de hidrogênio que dão origem às fibrilas que unem a lignina e hemicelulose. A difícil acessibilidade da celulose a reagentes e catalisadores e insolubilidade na maioria dos solventes é devida a esta associação de polímeros, o que explica a sua baixa reatividade e elevada resistência à ação microbiana (SANTOS et al, 2012).

Os grupos funcionais de hidroxilas (OH) existentes em sua estrutura estabelecem ligações intramoleculares entre grupos hidroxilas da mesma molécula e intermoleculares entre grupos hidroxilas de cadeias adjacentes, de forma a permitir a formação de fases cristalinas, representadas na Figura 2. As ligações intramoleculares são responsáveis pela formação das fibras vegetais enquanto as ligações intermoleculares conferem a rigidez à celulose (HENRIKSSON; LENNHOLM, 2009).

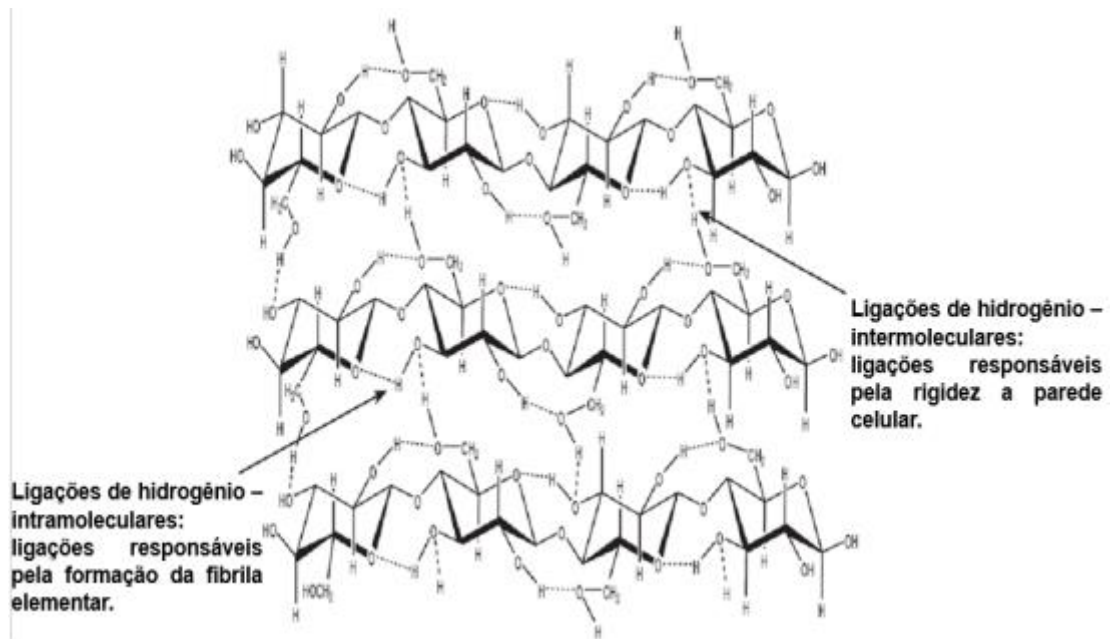


Figura 2 - Representação estrutural da celulose com as ligações β -1,4 da cadeia e as ligações de hidrogênio (Adaptado de Canilha et al., 2012).

2.4. Hemicelulose

Outro constituinte das plantas são as polioses ou hemiceluloses que não constituem uma única substância, mas sim uma mistura de polissacarídeos de baixa massa molecular, os quais estão associados com a celulose e a lignina (SAHA, 2003).

As hemiceluloses representadas na Figura 3 são polissacarídeos constituídos por unidades de açúcares diferentes ligados entre si. Possuem uma cadeia curta e ramificada e, em função disso, são mais reativas que a celulose. As ramificações proporcionam a menor energia das ligações. Além disso, uma maior absorção de água se dá devido a seu caráter amorfo, o que contribui para a maior flexibilidade das fibras e também, maior área específica (ASSUMPÇÃO, 2015).

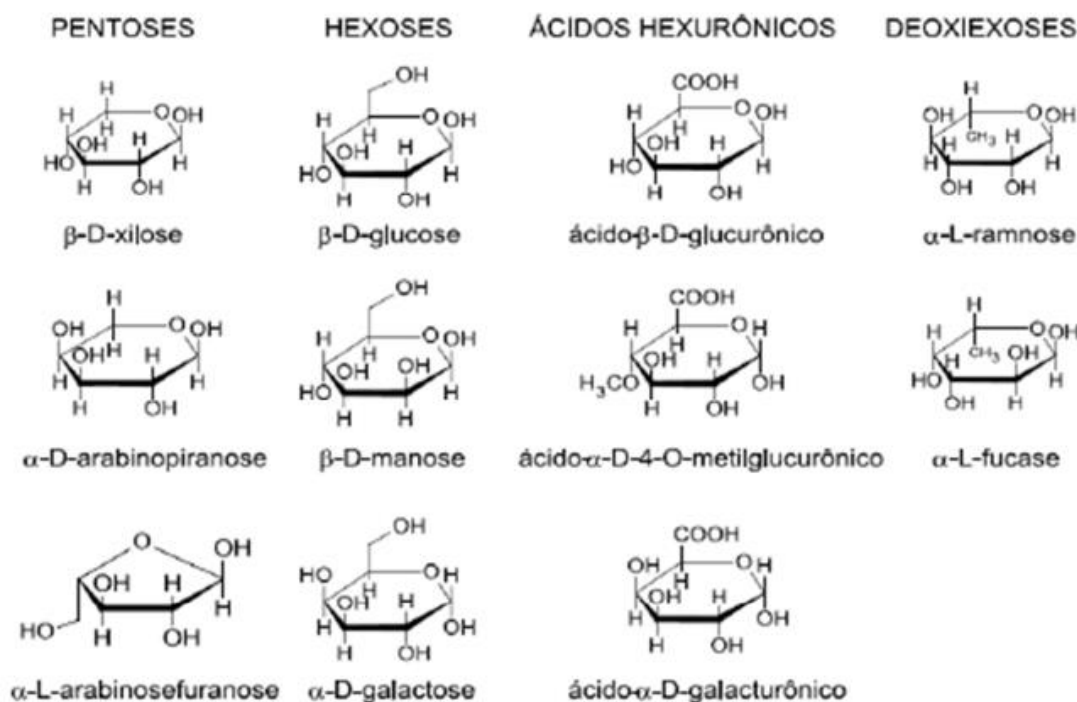


Figura 3 - Representação das unidades de polissacarídeos que compõem a hemicelulose (MORAIS et al., 2005).

Dentre os açúcares que as compõem, as xilanas ou pentoses são predominantes. São formadas pela condensação de unidades de xilose, associadas a grupos acetil, arabinosil e glucoranosil. As hidroxilas (OH), seguidas das ligações acetil (COCH₃) nos anéis dos açúcares e das ligações éster aos grupos acetil, são os grupos funcionais mais abundantes na hemicelulose. A hemicelulose de gramíneas, como o bagaço da cana de açúcar, é formada majoritariamente por xilanas altamente acetiladas (PITARELO, 2013).

Quando comparada à celulose, a hemicelulose é mais propensa a sofrer a hidrólise devido a sua estrutura ramificada. A sua degradação por hidrólise ácida ou por oxidação são as alternativas mais comuns (ASSUMPÇÃO, 2015). Segundo Ayala (2012) a sua degradação por ácidos é mais viável por atacar mais facilmente as ligações éster e acetil, provocando a formação do ácido acético, o qual torna o meio reacional ainda mais ácido, permitindo assim o avanço na degradação de novos grupos.

2.5. Lignina

A lignina é a segunda macromolécula orgânica mais importante e abundante dentre os materiais lignocelulósicos. Ela confere rigidez, impermeabilidade e resistência aos ataques de microrganismos e à degradação oxidativa (AGBOR et al., 2011).

O seu desenvolvimento acontece de maneira gradual e vai sendo incorporada à estrutura durante o crescimento vegetal. É um polímero amorfo e hidrofóbico constituído por moléculas aromáticas e grupos alifáticos. Sua estrutura é formada por diversos monômeros de fenil propano ligados por diferentes tipos de ligações, como a do tipo carbono-carbono (C-C) ou tipo éter (ROR'), tais como as hidroxilas (OH), carbonilas (CO), carboxilas (COOH), ésteres (RCOOR') e ligações etilênicas (CH₂) representadas na Figura 4 (ALVES, 2011).

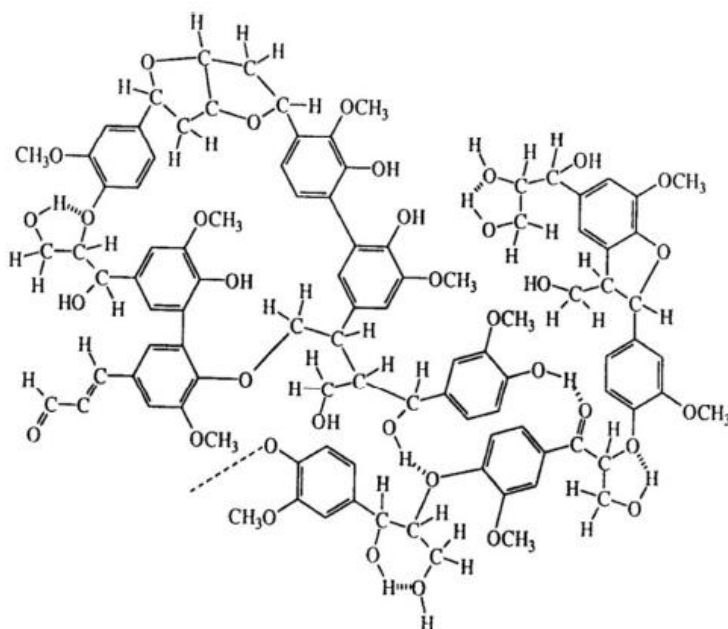


Figura 4 - Representação estrutura da lignina (ROSA E GARCIA, 2009).

O teor de aromáticos na lignina é elevado e isto é resultado da intensa polimerização desidrogenativa dos seus precursores, sendo eles: álcool coniferílico, álcool sinapílico e álcool p-cumarílico. A concentração destes álcoois nos materiais lignocelulósicos depende da espécie do vegetal, e o bagaço da cana como uma gramínea, possui os três precursores citados acima. A lignina recobre os demais polissacarídeos dificultando os processos fermentativos na obtenção do etanol (ASSUMPÇÃO, 2015).

Segundo Pitarelo (2013) a lignina é essencial para a sobrevivência da planta

por exercer o transporte de água e nutrientes e também por ser responsável pela resistência mecânica da planta, assim como sua proteção contra a degradação química e enzimática. Devido a sua estrutura química ser complexa para a produção do E2G é necessário “desmontar” a parede celular do vegetal, retirando a lignina, de forma a permitir o aproveitamento da glicose existente na celulose.

2.6. Diferentes pré-tratamentos utilizados em biomassas lignocelulósicas

No processo de obtenção de etanol celulósico, o objetivo é “desmontar” a parede celular para utilizar os polissacarídeos como fonte de açúcares fermentáveis, como está representado na Figura 5. No entanto, já foi salientado o quão complexa é a estrutura da parede e o quão “delicado” deve ser este processo de desmonte para preservar intactos os açúcares que serão usados para fermentação (BUCKERIDGE et al., 2010).

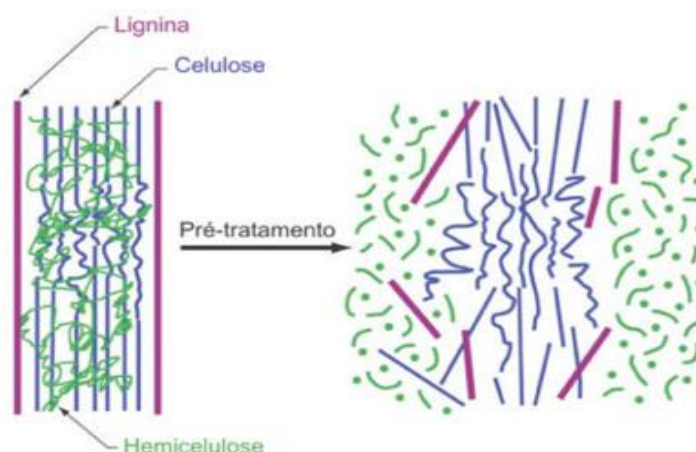


Figura 5 - Representação do efeito do pré-tratamento na estrutura da biomassa lignocelulósica (MOSIER, et al., 2005).

No processo de separação e aproveitamento dos materiais lignocelulósicos, vários métodos de pré-tratamento vêm sendo apresentados, podendo estes serem classificados em físicos (tratamento mecânico por trituração, moagem, ultrassons e micro-ondas), químicos (líquidos iônicos, agentes oxidantes, ácidos, álcalis, solventes orgânicos e AFEX- explosão com solução de amônia), físico-químicos (explosão a vapor d'água, fluidos supercríticos e a auto hidrólise com água líquida quente) e biológicos (ação de enzimas), além da possível combinação entre eles. O

material a ser tratado e a finalidade proposta são dois fatores que determinam o melhor tipo de pré-tratamento, pois todos os processos têm vantagens e desvantagens relacionadas ao modo como ocorrerão as alterações químicas da parede celular (ASSUMPÇÃO, 2015).

Na tabela 3 são apresentados os diferentes tipos de pré-tratamento que podem ser utilizados, bem como seus fatores de modificação, vantagens e desvantagens.

Tabela 3 - Tipos de pré-tratamento de biomassas lignocelulósicas

Pré-tratamentos	Fatores	Vantagens	Desvantagens
Físicos	Moagem e trituração; Radiação e Altas temperaturas.	Redução tamanho da partícula; Redução cristalinidade.	Alto gasto energético; Não remoção de lignina e hemicelulose e Formação de inibidores
	Alcalinos e AFEX (expansão da fibra em amônia)	Remoção da lignina; Despolimerização da hemicelulose.	Formação de sais irrecuperáveis; Baixa eficiência em resíduos com alto teor de lignina e corrosão.
Químico	Ácidos	Remoção da hemicelulose; altera estrutura da lignina.	Necessidade neutralização; Ataque pouco efetivo a lignina e corrosão.
	Agentes Oxidantes	Remoção efetiva a hemicelulose; Baixa degradação da celulose; Não geração de resíduos sólidos.	Necessidade ajuste de pH do reagente.
	Solventes Orgânicos (organossolv)	Remoção da lignina e hemicelulose; Obtenção da lignina com alto grau de pureza.	Necessidade remoção do solvente residual; Formação de inibidores; Alto custo na recuperação do solvente.
Biológico	Micro-organismos (Fungos)	Remoção lignina e hemicelulose; Baixo gasto energético; Ideal para materiais com alto teor de carboidratos.	Maior tempo de residência; Alto custo; Taxa de hidrolise baixa; Menor rendimento em açúcares.
Físico-Químico	Explosão a vapor, Explosão a CO ₂ e LHW.	Aumento da área superficial; eficiência energética	Equipamentos resistentes a alta pressão; Alto controle das variáveis de processo; Etapa adicional para remoção da lignina.

Fonte: Assumpção, 2015.

Quando se obtiver uma maior efetividade no processo de hidrólise, além de maior conversão dos polímeros de celulose e hemiceluloses em açúcares fermentescíveis e ter o mínimo de perda ou degradação dos açúcares, o objetivo do pré-tratamento foi alcançado com sucesso (ASSUMPÇÃO, 2015).

Os tratamentos feitos a partir dos métodos físicos incluem vários tipos de moedores, entre eles estão os moedores de bola, moedores de atrito, além de compressão, irradiação e expansão da fibra em amônia (AFEX). Esse pré-tratamento tem como vantagens proporcionar o aumento da digestibilidade enzimática, aumentando a área superficial da biomassa lignocelulósica e reduzir a cristalinidade da celulose. Porém, possui desvantagens: alto gasto energético, não remoção de lignina e hemicelulose e formação de inibidores (ISHIZAWA et. at, 2009).

No pré-tratamento biológico é feito o uso de fungos, bactérias ou enzimas (lacases) para a deslignificação e redução do grau de polimerização da celulose e hemiceluloses. Nesse tratamento as vantagens são: baixo gasto energético, processo limpo e ideal para materiais com alto teor de carboidratos. Porém, suas maiores desvantagens são: ser um processo lento para ser aplicado industrialmente, os fungos e as bactérias não são seletivos, assim, além de degradarem as hemiceluloses e lignina, degradam a celulose e o alto custo das enzimas (SANTOS; COLODETTE; QUEIROZ, 2013).

Para o pré-tratamento físico-químico é feito um aquecimento (160 a 290 °C) rápido da biomassa lignocelulósica com vapor de alta pressão (20 a 60 bar) sem adição de qualquer substância química. O resultado da explosão de vapor é uma mistura que fica mantida por um período até promover a hidrólise das hemiceluloses, e finalizada com uma descompressão explosiva. Esse pré-tratamento é nomeado de explosão a vapor ou pré-tratamento de auto hidrólise (BALAT; BALAT; CAHIDE, 2008). As vantagens são: baixo consumo de energia, não envolvimento de reciclo. Entre as desvantagens estão: etapa adicional para remoção da lignina, alto controle das variáveis de processo e equipamentos resistentes à alta pressão (ASSUMPÇÃO, 2015). Esse tipo de tratamento é considerado a opção com maior custo-benefício para resíduos agrícolas (BALAT; BALAT; CAHIDE, 2008).

2.7. Pré-tratamento químico com ácido

O pré-tratamento ácido utiliza principalmente soluções ácidas (clorídrica, sulfúrica e fosfórica) responsáveis pela decomposição da hemicelulose. Em razão do baixo custo, o ácido sulfúrico é preferível quando comparado ao clorídrico e fosfórico. Fatores como concentração ácida e temperatura da reação são limitantes, pois condições severas podem favorecer a degradação da celulose e da hemicelulose, com a formação do furfural, 5- hidroximetilfurfural (5-HMF) e ácido acético, caracterizados por serem fortes inibidores de fermentação (SARKAR, et al. 2012).

O ácido diluído quando usado no pré-tratamento da biomassa lignocelulósica pode gerar produtos de degradação, porém ainda são menores do que usando o ácido concentrado. Além disso, a digestibilidade do material pré-tratado tem uma boa relação com a remoção da fração hemicelulósica (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). No pré-tratamento com ácido diluído ocorre a hidrólise das hemiceluloses em açúcares como xilose, arabinose, entre outros que são solúveis em água, e tem formação de resíduo sólido rico em celulose e lignina (SAHA, 2003).

Pitarelo (2013) verificou que são necessárias etapas de moagem e lavagem antes do pré-tratamento ácido. A moagem aumenta a área superficial e a lavagem reduz o teor de cinzas e impurezas na biomassa. Isso ocorre devido à área superficial do bagaço e o teor de cinzas atuarem como um efeito tamponante sobre a ação do ácido, o que pode resultar num consumo maior de ácido para a obtenção do pH adequado aos processos do pré-tratamento. Para Saha (2003) um pH desfavorável pode afetar sua eficiência de conversão, uma vez que o pH baixo ou alto pode prejudicar o microrganismo da fermentação sendo assim, necessário ser corrigido para a sua utilização nos processos fermentativos.

São dois os tipos de processos usando ácido diluído: o primeiro utiliza temperaturas superiores a 160 °C; o outro trabalha com temperaturas inferiores a 160 °C (SAHA, 2003; SUN, 2002). Para Canilha et al. (2011) a condição ótima determinada foi: concentração do ácido sulfúrico em 2% (m/m), tempo de residência de 30 minutos e temperatura de 150 °C. A composição final do bagaço pré-tratado sólido deu-se em 8,76% de hemicelulose, 56,52% de celulose e 29,93% de lignina.

Por sua vez, Manzoor (2012) verificou que a condição de 4% H₂SO₄ a 180 minutos provocou maior grau de remoção da lignina chegando a 82%. No entanto,

essa condição degradou a celulose de forma bem acentuada, cerca de 88%. Dependendo das condições utilizadas, entre 80% a 95% de açúcares na hemicelulose podem ser recuperados em uma moderada temperatura nesse tipo de processo (BALAT; BALAT; CAHIDE 2008).

Entre as literaturas citadas, o ácido sulfúrico indica respostas positivas e eficazes quanto à remoção da hemicelulose, não só no bagaço de cana, mas também em outras biomassas, como o sorgo e o bagaço de laranja, entre outros. Em relação aos fatores como concentração do ácido, temperatura, quantidade/tipo de biomassa e o tempo são os mais influentes e interferem de forma significativa (ASSUMPÇÃO, 2015; KHALIL et al., 2015).

2.8. Índice de refração por refratômetro

Lei de Snell-Descartes, também conhecida como lei de Snell ou lei de Descartes ou ainda, simplesmente, lei de refração, se resume a uma expressão que dá o desvio angular sofrido por um raio de luz ao passar para um meio diferente do qual ele estava percorrendo. Cada meio apresenta um tipo "resistência" à passagem da radiação. Essa resistência também depende do comprimento de onda da radiação e muda com a temperatura. Essa tal "resistência" é conhecida como índice de refração (PILLING, 2011).

Os fenômenos de reflexão e de refração da luz acontecem quando um feixe de luz passa pela interface que separa dois diferentes meios de propagação transparentes, conforme diagrama apresentado na Figura 6.

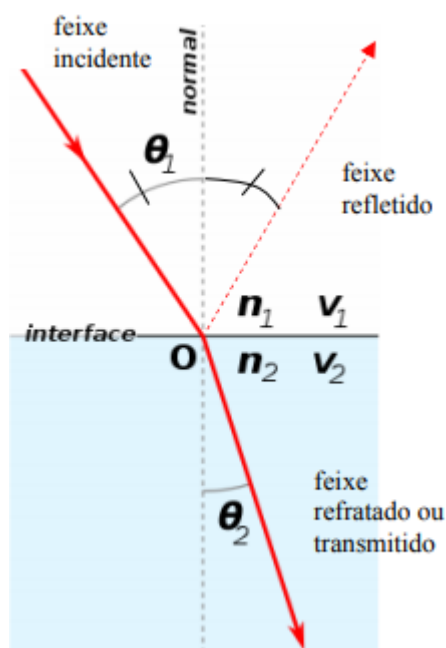


Figura 6 - Reflexão e refração de um feixe de luz ao passar de um meio de propagação para outro (TOGINHO; ZAPPAROLI; PANTOJA, 2008).

Um raio luminoso monocromático proveniente do meio 1 incide sobre a interface que separa os dois meios. Parte da luz incidente retorna ao meio 1, sendo chamada de luz refletida e parte penetra no meio 2, mudando a direção de propagação, sendo denominada luz refratada. O ângulo entre a direção normal à superfície (N) e o raio de luz incidente, o raio de luz refletido e o raio de luz refratado são definidos como ângulo de incidência θ_1 , ângulo de reflexão θ_1 , ângulo de refração θ_2 , respectivamente. A normal (N) é a semi-reta perpendicular à interface que separa os dois meios de propagação, com origem no ponto de incidência da luz (TOGINHO; ZAPPAROLI; PANTOJA, 2008).

As características do meio podem ser alteradas pela adição de outra substância no líquido em análise, alterando sua refração e alterando a direção de um feixe de luz ao trocar de meio; nesse caso, a passagem do ambiente para a solução líquida. Essa mudança para uma solução de açúcares é medida em graus Brix para a determinação do ângulo de refração. O refratômetro mede este desvio e retorna um valor de índice de refração que é comparado com um padrão previamente calibrado (CALDAS et al., 2015).

Brix ($^{\circ}\text{Bx}$) é uma escala numérica que mede a quantidade de sólidos solúveis em uma solução de sacarose. A escala Brix é utilizada na indústria de

alimentos para medir a quantidade aproximada de açúcares em sucos de fruta, vinhos e na indústria de açúcar. A escala de Brix, criada por Adolf F. Brix (1798 - 1870), foi derivada originalmente da escala de Balling, recalculando a temperatura de referência de 15,5°C. A quantidade de sólido solúvel é o total de todos os sólidos dissolvidos em água, começando com açúcar, sal, proteínas, ácidos e etc. Já os valores de leitura medidos é a soma de todos eles. Uma solução de 25 °Bx tem 25 gramas do açúcar da sacarose e 75 gramas da água nos 100 gramas da solução (PILLING, 2011).

2.9. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Os métodos clássicos para a determinação de açúcares em biomassas são baseados na técnica de cromatografia. Nas últimas décadas, os métodos cromatográficos, principalmente a cromatografia líquida de alta eficiência, tornaram-se muito populares para a determinação de açúcares, sendo atualmente bastante utilizada na indústria farmacêutica, uma vez que têm a capacidade de separar, identificar e quantificar os compostos presentes numa mistura (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2009).

Os seus principais componentes são um sistema de bombas, um sistema de injeção da amostra, a coluna cromatográfica, o detector e um sistema que permite registrar e fazer o tratamento da resposta analítica do detector – software e computador (Figura 7) e tem como objetivo principal separar individualmente os diversos constituintes de uma mistura por meio de uma interação entre as moléculas da amostra e de duas fases, uma estacionária e outra móvel (SILVA, 2016).

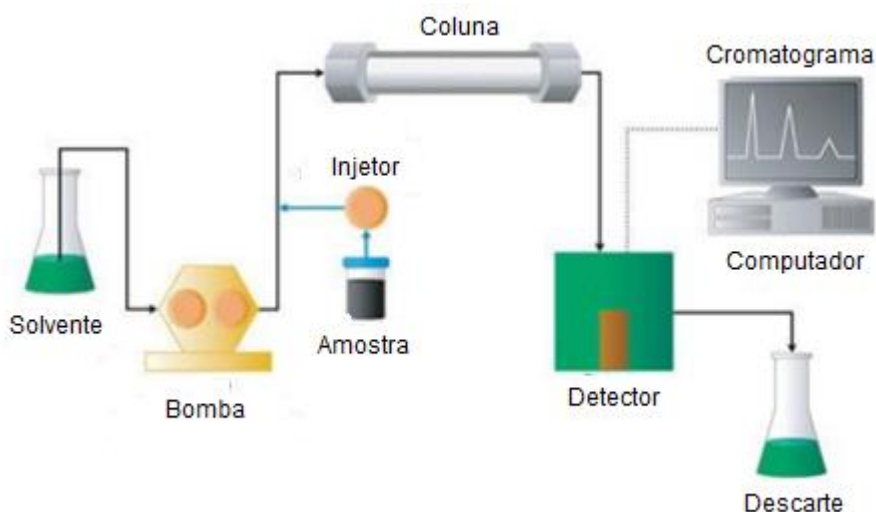


Figura 7 - Componentes de um sistema HPLC (Adaptado de SILVA, 2016).

No sistema de bombas acontece a circulação da fase móvel a um determinado fluxo ao longo de todo o sistema cromatográfico, podendo ser programado para efetuar a introdução dos componentes da fase móvel em proporções variáveis. A fase móvel flui continuamente através do sistema de injeção, por meio da fase estacionária constituída pela coluna cromatográfica. Na solução da amostra eluída ocorre a separação dos componentes mediante a interação dos mesmos simultaneamente com a fase móvel e a fase estacionária. A fase móvel faz o transporte da amostra através do caminho cromatográfico gerando dados como tempo de retenção, intensidade, área e concentração de uma determinada substância (OLIVEIRA, 2016; SILVA, 2016).

Na coluna cromatográfica ocorrem diferentes interações, as quais são classificadas como: partição, absorção, exclusão ou troca iônica. A classificação da separação deve-se aos diferentes tipos de enchimento na coluna cromatográfica, por sua seleção para uma determinada análise, e influencia significativamente o método de separação, podendo este ser afetado tanto na seletividade como na eficiência de separação dos analitos de interesse e a sua capacidade é determinada pelo comprimento, diâmetro e pelo material de recheio (SILVA, 2016).

Os componentes, ao saírem da coluna, seguem para o detector que transforma a quantidade de substância recebida em sinais eletrônicos e transfere estes dados para um sistema de captura de sinais, normalmente um computador acoplado ao cromatógrafo. Existem vários tipos de detectores, sendo que a escolha

dependerá fortemente das características químicas ou físicas das espécies a se detectar. Os detectores de HPLC devem possuir várias características, entre elas: alta sensibilidade, seletividade, linearidade (correspondente ao aumento da concentração do analito), pouco sensível às variações de temperatura e fluxo, preciso e com reprodutibilidade (OLIVEIRA, 2016; SILVA, 2016).

Em suma, a cromatografia líquida de alta eficiência tem sua aplicação considerada indispensável em vários laboratórios, tendo como suas principais vantagens a utilização de pequenos volumes de fase móvel, bem como menores quantidades de analito, alto poder de resolução, separações rápidas, monitorização contínua do eluente, medidas quantitativas aperfeiçoadas, análises repetitivas e reprodutíveis com a mesma coluna e automação do procedimento analítico e do manuseio dos dados. Porém, tem como desvantagem o fato de ser caro devido à pureza elevada dos reagentes utilizados e ao elevado custo do equipamento e da manutenção e calibração periódica associada (GUIMARÃES; COLLINS, 1997; SILVA, 2016).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Localização do experimento

O experimento foi realizado no Laboratório de Biodiesel na Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), campus Cascavel cuja localização geográfica é definida pelas coordenadas 24°59' de Latitude Sul (S) e 53°27' de Latitude Oeste (W) e altitude de 781 metros acima do nível do mar.

3.2. Coleta do Bagaço de cana

O bagaço de cana de açúcar utilizado no presente estudo foi coletado em diferentes estabelecimentos comerciais que vendem caldo de cana no município de Cascavel, Paraná.

3.3. Preparo da biomassa

O bagaço de cana, após o processo de moagem para a obtenção do caldo, encontra-se impregnado por açúcares residuais, extrativos e outros compostos inorgânicos solúveis em água. Sendo assim, a etapa de lavagem e secagem foi necessária a fim de removê-los. Para etapa de lavagem, a biomassa coletada foi deixada em repouso por 2 horas em água destilada e após foi para o processo de secagem em estufa com circulação de ar forçado por 12 horas a 65 °C.

A última etapa foi a adequação e padronização do tamanho do bagaço para o pré-tratamento. Segundo Sarkar et al. (2012) a redução do tamanho das partículas pode gerar melhores resultados, mas também se forem muito pequenas podem formar aglomerados no fundo do recipiente e interferir negativamente nas etapas de pré-tratamentos. Desta forma, no presente trabalho foi determinado o tamanho da partícula de aproximadamente 5 cm e posteriormente triturado em um processador doméstico para melhor redução da granulometria e aumento da área superficial.

3.4. Preparo das soluções para o pré-tratamento

Para o pré-tratamento ácido foi utilizado o ácido sulfúrico diluído e foram necessárias a preparação e adequação prévia do reagente para a etapa de pré-tratamento. A solução concentrada do ácido foi diluída nas proporções de ácido/água 1:10, 1:15 e 1:20 (v/v) e utilizada sem padronização.

O ácido sulfúrico (H_2SO_4) foi escolhido devido a sua efetividade aliado ao baixo custo quando comparado a outros ácidos. Na Tabela 4 estão as especificações do ácido sulfúrico.

Tabela 4 - Especificações do Ácido Sulfúrico

Características	Especificação
Fórmula química	H_2SO_4
Massa Molar	98,08 g mol
Densidade	1,84 g cm^3
Ponto de Ebulição	338 °C
Pureza	98%

Fonte: Casquímica, 2011

3.5. Pré-tratamento da biomassa com ácido sulfúrico diluído

Para avaliar a influência das variáveis: quantidade de biomassa, concentração de ácido e temperatura na extração dos açúcares foi empregado um planejamento fatorial completo de 2^3 , feito em duplicata e com três repetições no ponto central. Foram adotados os níveis de 5 e 15 g para massa da amostra, duas variações de concentração do ácido 5% e 10% e a variação da temperatura 25 e 50 °C. Para o ponto central foram usados 10 g para massa da amostra, 7,5% de concentração do ácido e temperatura de 37,5 °C. A listagem dessas combinações, que é chamada de matriz de planejamento, está apresentada na Tabela 5.

Tabela 5 - Planejamento Fatorial 2³

Fatores:	Limite Inferior (-)	Limite Superior (+)	
A – Massa (g)	5		15
B – Concentração (%)	5		10
C – Temperatura (°C)	25		50
Ensaio	A	B	C
1	5 (- 1)	5 (- 1)	25 (- 1)
2	15 (+ 1)	5 (- 1)	25 (- 1)
3	5 (- 1)	10 (+ 1)	25 (- 1)
4	15 (+ 1)	10 (+ 1)	25 (- 1)
5	5 (- 1)	5 (- 1)	50 (+ 1)
6	15 (+ 1)	5 (- 1)	50 (+ 1)
7	5 (- 1)	10 (+ 1)	50 (+ 1)
8	15 (+ 1)	10 (+ 1)	50 (+ 1)
9	10 (0)	7,5 (0)	37,5 (0)

Os bagaços foram pesados em balança analítica e adicionados em béqueres de 250 e 600 mL, seguidos da adição de 100 mL de ácido sulfúrico diluído. Para um melhor resultado, ao adicionar o ácido à amostra é recomendado esmagá-la com um pistilo de cerâmica, para melhor agregar ambos. Posteriormente, foi colocado em banho úmido, marca Sieger, com termômetro digital, por 40 minutos, como representado na Figura 8. Após isso foi separado o líquido do bagaço e colocado em ambiente refrigerado para posterior análise.



Figura 8 - Banho úmido com termômetro digital.

As especificações do banho úmido são expostas na Tabela 6.

Tabela 6 - Especificações do Banho Úmido

Características	Especificação Técnica
Capacidade	6 litros
Potência	600 W
Precisão de temperatura	+ 0,5 °C
Faixa de trabalho	Temperatura ambiente até 60 °C
Diâmetro Interno (AxLxC)	150 x 150 x 300 mm
Peso	4,100 kg

Fonte: Sieger, 2012

3.6. Quantificação dos açúcares

3.6.1. Determinação de sólidos solúveis por refratômetro

O teor de sólidos solúveis totais (SST) permite verificar a diluição ou concentração de caldos após processamento. Expresso em °Brix tem-se o percentual, em peso, de sólidos totais (açúcares, polissacarídeos, proteínas, minerais) dissolvidos no caldo.

As análises foram realizadas em refratômetro de bancada. O equipamento foi calibrado com água destilada.

Para a análise das soluções foram colocadas, com a ajuda de uma pipeta, de três a quatro gotas da amostra no prisma do refratômetro. Ao olhar pela ocular do refratômetro, observa-se uma escala que aparece no campo visual, deve-se ajustar a distância focal com a ocular do instrumento. Após, só anotar a leitura da escala que corresponde à posição da fronteira. As análises foram feitas em duplicata.

3.6.2. Determinação de monossacarídeos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

As análises foram realizadas no equipamento da Shimadzu, modelo LC- 20A Prominence, com coluna Phenomenex Rezex ROA-Organic Acid H⁺ (8%) (300 x 7.8 mm) a 65 °C. A fase móvel consistiu de uma solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 0,005 N, com fluxo de 0,6 mL min⁻¹. A solução foi diluída de 1:10 (v/v) utilizando água ultra pura. O ajuste do pH foi feito de acordo com o método de Sluiter et al. (2008) com carbonato de cálcio (0,23 g). Após foram filtradas em cartuchos de filtração Sep Pak C18 (para remoção de interferentes) e depois em filtro com membrana 0,45 µm (para remoção de partículas). O volume injetado da solução foi 20 µL. Os carboidratos (celobiose, glicose, xilose, arabinose) foram quantificados pelo detector de índice de refração (RID – 10A).

Para a análise quantitativa foram feitas curvas padrões, utilizando a faixa de 0,05; 0,075; 0,15; 0,25; 0,35; 0,5; 1,0 e 1,5 (g L⁻¹) para celobiose, glicose, xilose e arabinose. As análises foram feitas em duplicatas.

3.7. Análise Estatística

A análise estatística e tratamento de superfície dos efeitos de cada variável, quantidade de biomassa, concentração do ácido e temperatura sobre a concentração de açúcares, foi realizada utilizando o software Chemoface (versão 1.61). Este programa possibilitou a obtenção das superfícies de resposta em função das variáveis estudadas, bem como os efeitos significativos, o p-valor para regressão e a falta de ajuste, com nível de significância de 95%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Determinação de Sólidos Solúveis (° Brix)

As médias e desvio padrão dos sólidos solúveis estão apresentados na Tabela 7. Podemos observar que as soluções 3, 7 e 8 se destacaram com 13,005, 13,025 e 13,01 ° Brix, respectivamente. Na solução 5 obtivemos a menor extração, com 6,56° Brix.

Tabela 7 - Média e desvio padrão dos sólidos solúveis obtidos por refratômetro em ° Brix

Ensaio	Massa (g)	Ácido (%)	Temp. (°C)	° Brix
1	(-1) 5	(-1) 5	(-1) 25	7,03 ±0,029
2	(+1) 15	(-1) 5	(-1) 25	12,54 ±0,678
3	(-1) 5	(+1) 10	(-1) 25	13,005 ±0,007
4	(+1) 15	(+1) 10	(-1) 25	7,035 ±0,021
5	(-1) 5	(-1) 5	(+1) 50	6,56 ±0,664
6	(+1) 15	(-1) 5	(+1) 50	7,035 ±0,035
7	(-1) 5	(+1) 10	(+1) 50	13,025 ±0,007
8	(+1) 15	(+1) 10	(+1) 50	13,01 ±0,014
9*	(0) 10	(0) 7,5	(0) 37,5	9,37 ±0,0005

Para as triplicatas das soluções obtidas no ponto central temos uma refração média de 9,37 ° Brix e um desvio padrão de 0,0005. No presente trabalho, as

variáveis massa e temperatura mostraram pouca influência na extração dos sólidos solúveis em relação à concentração do ácido que a 10% nos deu um melhor resultado. Neste contexto, devemos lembrar que um pré-tratamento eficaz é caracterizado por vários critérios, entre eles minimizar a demanda de energia, evitar a necessidade de redução das partículas da biomassa e ter um reagente de baixo custo (TAO et al., 2011).

Na pesquisa de Lima (2011) obteve-se uma média de 19,28 ° Brix para diferentes variedades de bagaço de cana de açúcar, onde a extração foi via Soxhlet, com água, durante 10 h. Já para Pietrobon (2008) o hidrolisado de bagaço de cana foi entre 7,80 e 10,60 ° Brix. O autor utilizou junto com a ação de enzimas 0,5% de ácido sulfúrico a 121 °C por 30 minutos em autoclave.

No estudo de Ahmed (2012), com pré-tratamento combinado entre físico (cortar, moer, ferver) e químico (NaOH 2%; 85 °C; 1 h e H₂SO₄ 10%; 100 °C; 30 min) obteve entre 80 e 50 ° Brix, respectivamente. Já Oladi (2017) estudou duas variedades de bagaço da cana a partir de um pré-tratamento com hidróxido de amônio, com temperatura entre 116-220°C por um tempo de 30-60 min. Nesse experimento o brix obtido foi de 9 e 13.

Segundo os efeitos obtidos pelo tratamento dos resultados (Tabela 8), o único efeito principal significativo é o aumento da concentração de ácido, que incrementa o índice de refração em 0,0051.

Tabela 8 - Efeitos significativos das variáveis e suas interações

	Efeitos	Erro	t	P	Significativo
Massa (g) (X1)	-0.00012	0.0003	-0.4100	0.6885	Não
Concentração (%) (X2)	0.0051	0.0003	16.8102	3.3597x10 ⁻¹⁰	Sim
Temperatura (°C) (X3)	0.00012	0.0003	0.4100	0.6885	Não
X1*X2	-0.0046	0.0003	-15.1702	1.2011x10 ⁻⁹	Sim
X1*X3	0.00037	0.0003	1.2300	0.2405	Não
X2*X3	0.0046	0.0003	15.1702	1.2011x10 ⁻⁹	Sim
X1*X2*X3	0.0039	0.0003	12.7101	1.0455x10 ⁻⁸	Sim

Nível de confiança a 95%.

As interações massa/ácido, ácido/temperatura e ácido/massa/temperatura são significativas. Porém, o aumento do ácido e da massa diminui o valor de índice de refração em -0.0046. Já o aumento de ácido e da temperatura incrementa o índice de refração de 0.0046 e por último o efeito entre as interações das 3 variáveis estudadas causa um aumento de 0.0039 no valor médio do Brix.

Nesse sentido, é importante enfatizar que as condições operacionais de pré-tratamentos descritos na literatura, como concentração ácida, temperatura e massa variam amplamente.

4.2. Determinação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

O hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar foi obtido por meio de um pré-tratamento empregando ácido sulfúrico diluído, conforme descrito no item 3.5. As curvas padrões dos açúcares, os cromatogramas obtidos e suas respectivas áreas e os tempos de retenção de cada açúcar estão apresentadas no Apêndice A e B.

A Figura 9 apresenta as concentrações médias dos monossacarídeos e dissacarídeos presentes no hidrolisado hemicelulósico obtidos a partir do pré-tratamento. Três amostras foram caracterizadas por HPLC: duas amostras que tiveram maior índice de °Brix (3 e 8) e o ponto central. Não houve a presença de arabinose em nenhuma das soluções analisadas.

De acordo com os dados obtidos a etapa de pré-tratamento forneceu um hidrolisado hemicelulósico no ponto central (10 g; 7,5% e 37,5 °C), de 3,51; 2,83 e 1,20 g L⁻¹ de glicose, xilose e celobiose, respectivamente. Para a solução 8, sua composição foi de 8,14; 4,58 e 0,10 g L⁻¹ de glicose, xilose e celobiose, respectivamente.

Analisando as duas soluções, observamos que com o aumento da concentração de glicose ocorre a diminuição da celobiose, isso porque a celobiose faz parte da unidade estrutural da glicose (ROSSETO, 2011). Souza (2016) utilizou um pré-tratamento hidrotérmico para o bagaço e a palha da cana de açúcar e concluiu que sua melhor condição para a extração de celobiose (3,37 g L⁻¹) foi a 195

°C durante 10 min, porém, diminuiu a extração de glicose ($1,32 \text{ g L}^{-1}$) nessa condição.

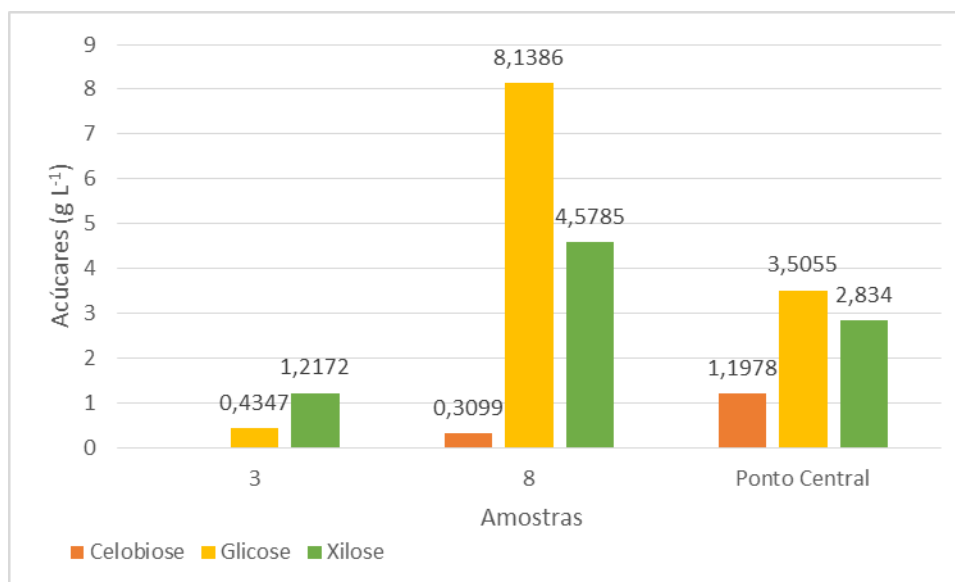


Figura 9 - Composição média do hidrolisado hemicelulósico obtidos por HPLC.

Nesse estudo, considerando apenas as soluções 3 e 8 (Tabela 9), a melhor condição para a extração da glicose foi 15 g de biomassa, 10% de concentração do ácido e 50 °C. Apesar da concentração do ácido ter sido no limite superior (10%), os valores de glicose obtidos não foram superiores a $8,14 \text{ g L}^{-1}$, o que pode ser explicado pelo fato de que quando a temperatura da reação é inferior a 120 °C, a glicose pode ter sido liberada principalmente das cadeias laterais da hemicelulose, pois a celulose geralmente não é hidrolisada nas condições operacionais comumente utilizadas por este tipo de processo. Desse modo, a glicose obtida procedeu em maior parte da fração hemicelulósica (AGUILAR et al., 2002; LIU et al., 2012).

No estudo realizado por de Amores et al. (2013) que utilizou uma extração de explosão a vapor com o pré-tratamento a 215 °C por 5 min e 200 g de bagaço de cana resultou no maior valor de celulose, 63,9%. Porém em temperatura de 230 °C diminuiu para 55%. Já para a hemicelulose os maiores valores (53%) se deram em temperaturas inferiores a 200 °C. Para Liu et al. (2012) o rendimento da glicose aumentou significativamente após 120 minutos a 150 °C.

Tabela 9 - Concentração média e desvio padrão dos açúcares glicose (gli), xilose (xil) e celobiose (celo) presentes no hidrolisado de bagaço de cana, segundo as condições estabelecidas obtidas por cromatografia líquida.

Ensaio	Massa (g)	Ácido (%)	Temp. (°C)	Gli. (g L ⁻¹)	Xil. (g L ⁻¹)	Celo. (g L ⁻¹)	Total (g L ⁻¹)
3	5	10	25	0,435 ±0,027	1,217 ±0,054	-	1,652
8	15	10	50	8,138 ±0,103	4,578 ±0,179	0,309 ±0,031	13,025
9*	10	7,5	37,5	3,515 ±0,020	2,834 ±0,007	1,207 ±0,058	7,556

Segundo Liu et al. (2012) a temperatura elevada favorece a desagregação da cama de proteção da lignina em volta das fibras da hemicelulose e permite que o ácido sulfúrico hidrolise a hemicelulose em xilose. No entanto, ele salienta que o tempo de reação longo e as temperaturas de reação muito elevadas facilmente causam a degradação da xilose em furfural.

Pietrobon et al. (2011) realizou dois pré-tratamentos, um ácido (H₂SO₄ 0,5 %) e um alcalino (Ca(OH)₂ 3%) a 121 °C por 30 min. Para o pré-tratamento ácido obteve 3,51 mg mL de xilose e 0,27 mg mL de glicose. Já para o pré-tratamento alcalino obteve-se 0,01 mg mL de glicose e 0,01 mg mL de xilose.

Para Cheng et al. (2008) que também avaliaram o hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana (10% m/m) com ácido sulfúrico diluído (1,25%) em autoclave a 121 °C por 2 h, a composição do hidrolisado encontrado foi 17,1 g L⁻¹ de xilose, 7,2 g L⁻¹ de glicose e 0,5 g L⁻¹ de celobiose. Milessi et al. (2012) observou valores de açúcares em seu hidrolisado (12,45 g L⁻¹ de xilose e 0,67 g L⁻¹ de glicose) com o mesmo ácido (100 mg H₂SO₄ g de matéria seca, 121 °C por 20 min) a partir do bagaço de cana, obtendo resultado semelhante ao estudo de Antunes et al. (2014) que utilizou as mesmas condições e extraiu apenas xilose (10,90 g L).

A partir dos resultados apresentados é possível afirmar que o pré-tratamento utilizado neste trabalho foi eficiente em relação à disponibilização da fração celulósica, uma vez que houve uma quantidade significativa de açúcares extraídos.

4.3. Análise estatística

Para uma visualização com maior clareza da influência dos fatores sobre a extração de açúcares durante o pré-tratamento ácido de bagaço de cana-de-açúcar as superfícies de resposta foram geradas para o índice de refração (Figura 10, 11 e 12) em função dos fatores significativos das variáveis independentes analisadas.

Ao analisar a superfície de resposta para a extração de sólidos solúveis, pôde-se perceber que concentração do ácido e a massa na Figura 10, foram os dois principais fatores que interferiram na extração do hidrolisado hemicelulósico.

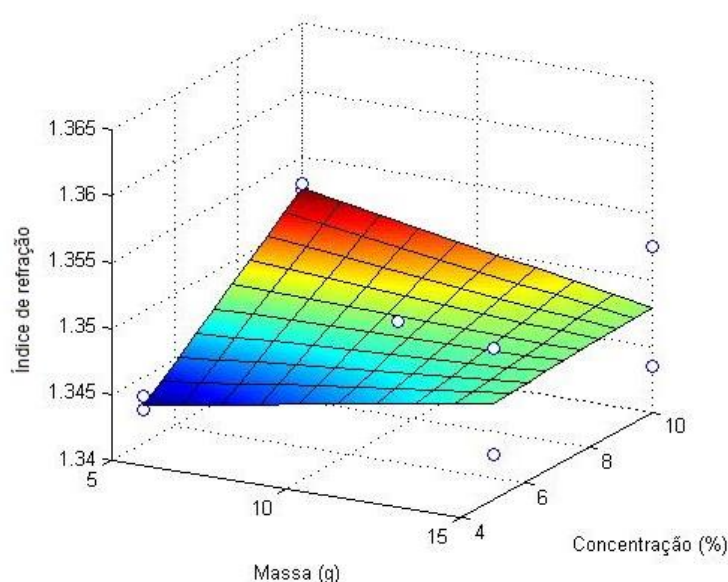


Figura 10 - Superfície de resposta para quantidade de sólidos solúveis extraídos em função das variáveis massa (g) e concentração do ácido (%) a uma temperatura de 37,5 °C.

Para essas duas variáveis independentes, o maior nível (+1) de concentração do ácido e o menor nível (-1) da quantidade de massa resultou em um hidrolisado com maior quantidade de sólidos solúveis, ou seja quanto menor a quantidade de massa e maior concentração do ácido, mais sólidos solúveis foram extraídos.

A superfície de resposta em função das variáveis massa e temperatura não apresentaram ação significativa na extração do hidrolisado como pode ser observado na Figura 11.

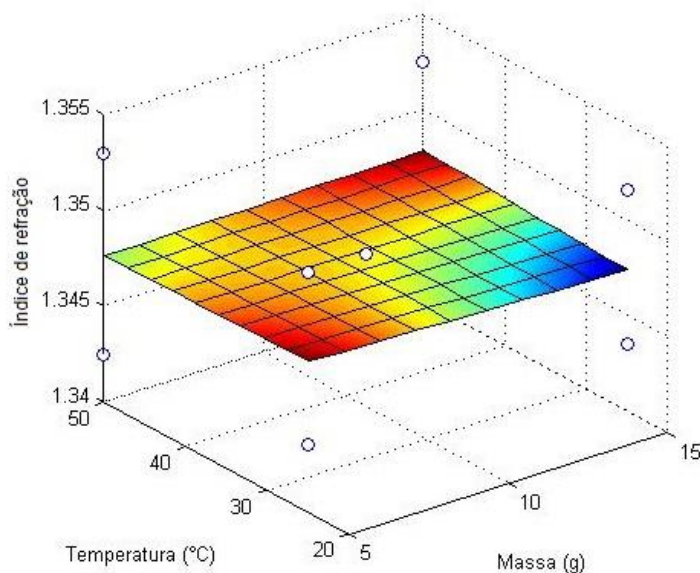


Figura 11 - Superfície de resposta para quantidade de sólidos solúveis extraídos em função das variáveis massa (g) e temperatura (°C), com concentração do ácido a 7,5%.

Quando a quantidade de massa e a temperatura estão no nível superior (15 g e 50 °C) ou inferior (5 g e 25 °C) temos uma maior quantidade de sólidos solúveis, o que é interessante, pensando na praticidade e viabilidade econômica, porém, como essa superfície de resposta é praticamente um plano, os efeitos da massa e da temperatura são pequenos.

As variáveis temperatura e concentração de ácido foram significativas na extração dos sólidos solúveis, como está representada na Figura 12.

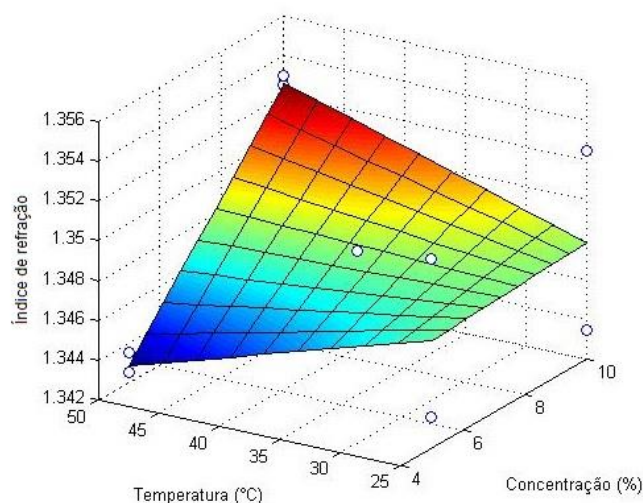


Figura 12 - Superfície de resposta para quantidade de sólidos solúveis extraídos em função das variáveis temperatura (°C) e concentração de ácido (%), com quantidade de massa em 10g.

Pode-se observar que quando a temperatura e a concentração de ácido estão no nível superior (+1) o hidrolisado tem maior percentual de extração de sólidos solúveis. Os aumentos da temperatura e da concentração do ácido favorecem a extração e aumentam os valores de sólidos solúveis.

De acordo com o estudo realizado por Canilha et al. (2011) sobre o pré-tratamento de bagaço com H_2SO_4 , a temperatura foi o fator de maior influência sobre a solubilização dos carboidratos do bagaço, seguido da concentração do ácido e do tempo. Entretanto, no estudo com o mesmo ácido realizado por Neureiter et al. (2002) os autores concluíram que a concentração do ácido foi o fator que mais influenciou na solubilização dos açúcares do bagaço, mas que a temperatura foi o fator de maior influência sobre a formação de furfurais.

Segundo os dados mostrados na Tabela 10 no ajuste da superfície, o p valor para a regressão e a falta de ajuste foram inferiores a 5% ($1,19 \times 10^{-4}$; $4,22 \times 10^{-8}$ respectivamente), devido ao efeito das interações das três variáveis que é significativo, indicando que os coeficientes da equação são adequados, mas existe falta de ajuste.

Tabela 10 - Análise de variância para o ajuste de superfície

	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média da soma dos quadrados	F	p – valor
Regressão	2.77×10^{-4}	6	4.61×10^{-5}	10.5040	1.19×10^{-4}
Resíduo	6.59×10^{-5}	15	4.39×10^{-6}		
Falta de ajuste	6.11×10^{-5}	2	3.05×10^{-5}	82.1211	4.22×10^{-8}
Erro puro	4.83×10^{-6}	13	3.71×10^{-7}		
Total	3.42×10^{-4}	21			

Nível de confiança a 95%.

Com os resultados obtidos, verifica-se que as variáveis empregadas nesse estudo foram significativas, entretanto, os efeitos da concentração do ácido possuem uma maior influência na extração, seguidos da massa e temperatura.

5. CONCLUSÃO

Conclui-se que o pré-tratamento químico com ácido sulfúrico foi eficiente na extração de açúcares do bagaço de cana-de-açúcar. A utilização do planejamento fatorial (2³) foi de fundamental importância para determinar qual melhor condição na remoção desses compostos.

Para o índice de refração, as soluções 3, 7 e 8 tiveram maior quantidade de sólidos solúveis extraídos. Para a solução 3 foram 13,005 ° Brix sob as condições de 5 g de biomassa, 10% de concentração de ácido e 25 °C a temperatura. Já para a solução 7 foram 13,025 ° Brix com 5 g de biomassa, 10% de concentração de ácido e 50 °C a temperatura. Ainda para a solução 8 com 13,01 ° Brix foram utilizadas as condições máximas (15 g; 10%; 50 °C) do pré-tratamento.

Segundo os efeitos obtidos a partir dos resultados do índice de refração, conclui-se que o único efeito principal significativo é o aumento da concentração de ácido que aumenta o índice de refração. Entretanto, as interações massa/ácido, ácido/temperatura e ácido/massa/temperatura são significativas. O aumento do ácido e da massa diminui o valor de índice de refração, já o aumento de ácido e da temperatura incrementam o índice de refração. Por último, o efeito entre as interações das 3 variáveis estudadas causa um aumento no valor médio do Brix.

Nos resultados obtidos por cromatografia líquida, conseguimos identificar a presença de glicose, xilose e celobiose nas soluções e concluir que a condição que resultou numa maior extração de açúcares foi: 15 g de biomassa, 10% de concentração de ácido e temperatura a 50 °C. Com a concentração do ácido no limite superior (10%) a extração de açúcares nesse trabalho foi significativa com 13,025 g L⁻¹ (solução 8).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGBOR, V. L. et al. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. **Biotechnology Advances**. v. 29, p. 675-685, May. 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.005>>. Acesso em: 13 jun. 2018.
- AGUILAR, R. et al. Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. **Journal of Food Engineering**, v.55, p. 309-318, 2002.
- AHMED, F. M. et al. Saccharification of sugarcane bagasse by enzymatic treatment for bioethanol production. **Malays J Microbiol**, v. 8, n. 2, p. 97-103, 2012.
- ALVES, R. E. **Caracterização de fibras lignocelulósicas pré-tratadas por meio de técnicas espectroscópicas e microscópicas ópticas de alta resolução**. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. 2011.
- AMORES, I. et al. Ethanol production from sugarcane bagasse pretreated by steam explosion. **Electronic Journal of Energy & Environment**, Temuco, v. 1, n. 1, 2013.
- ANTUNES, F. A. F. et al. Bioethanol production from sugarcane bagasse by a novel brazilian pentose fermenting yeast *Scheffersomyces shehatae* UFMG-HM 52.2: Evaluation of fermentation medium. **International Journal of Chemical Engineering**, v. 2014, p. 1-8, 2014.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. NBR 6023:2002. **Informação e documentação – Referências – Elaboração**. Rio de Janeiro, 2002. 24 p.
- ASSUMPÇÃO, S. M. N. **Pré-tratamento químico combinado do bagaço da cana visando a produção de etanol de segunda geração**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal da Bahia. 2015.
- AYALA, O. L. B. **Avaliação de pré-tratamento para hidrólise enzimática de palha de cana-de-açúcar considerando a produção de etanol**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas. 2012.
- BALAT, M.; BALAT, H.; CAHIDE, O. Progress in bioethanol processing. **Progress in energy and combustion science**, v. 34, n. 5, p. 551-573, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pecs.2007.11.001>>. Acesso em: 15 jun. 2018.
- BANSAL, A. et al. Economic competitiveness of ethanol production from cellulosic feedstock in Tennessee. **Renewable Energy**, v.59, p.53-57, 2013.
- BARCELOS, C. A. et al. The essentialness of delignification on enzymatic hydrolysis of sugar cane bagasse cellulignin for second generation ethanol production. **Waste Biomass Valor**, 2012.

BEHERA, S. et al. Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 91–106. 2014.

BETANCUR, G. J. V.; PEREIRA JR. N. Sugar cane bagasse as feedstock for second generation ethanol production. Part I: Diluted acid pretreatment optimization. **Electron. J. Biotechnol**, v. 13, n. 3, 2010.

BISWAS, R., UELLENDahl, H., AHRING, B.K. Wet explosion pretreatment of sugarcane bagasse for enhanced enzymatic hydrolysis. **Biomass and bioenergy**, v. 61, p. 104-113, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.11.027>>. Acesso em: 15 jun. 2018.

BRIENZO, M. et al. Comparison Study on the Biomass Recalcitrance of Different Tissue Fractions of Sugarcane Culm. **BioEnergy Research**, 7(4), 1454-1465. 2014.

BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, W. D.; SOUZA, A. P. As Rotas para o Etanol celulósico no Brasil. **Bioetanol da cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade**, Butantã, SP. p. 365-380, 2010.

CALDAS, B. S. et al. Determinação de açúcares em suco concentrado e néctar de uva: comparativo empregando refratometria, espectrofotometria e cromatografia líquida. **Scientia Chromatographica**, Londrina – Pr, v. 7, n. 1, p. 53-63, jul. 2015.

CANILHA, L. et al. A study on the pretreatment of a sugarcane bagasse sample with dilute sulfuric acid. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 38, p.1467-1475, sept. 2011.

CANILHA, L. et al. A study on the pretreatment of a sugarcane bagasse sample with dilute sulfuric acid. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, 38(9), 1467-1475. 2012.

CASQUÍMICA. Ficha de informação: Ácido Sulfúrico. 2011. Disponível em: <<http://www.casquimica.com.br/fispq/acidosulfurico.pdf>> Acesso em: Nov. 2018.

CHATUVERDI, V.; VERMA, P. An overview of key pretreatment processes employed for bioconversion of lignocellulosic biomass into biofuels and value added products. **3 Biotech**. v. 3. n. 5, p. 415–431, oct. 2013.

CHENG, J.J.; TIMILSINA, G.R. Status and barriers of advanced biofuel technologies: A review. **Renewable Energy**, v. 36, n. 12, p. 3541-3549, dec. 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.renene.2011.04.031>>. Acesso em: 17 jun. 2018.

CHENG, K. et al. Sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for ethanol production by acid recovery process. **Biochemical Engineering Journal**, v. 38, n. 1, p. 105-109, 2008.

CHUST, R. B. Introdução à Cromatografia de Líquidos (HPLC), **BOLETIM SPQ**, 39: p 39- 53, 1990.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Fundamentos de cromatografia. Campinas: Ed. Unicamp, 2009.

CONAB. Boletim da safra de cana-de-açúcar. 2018. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar>> Acesso em: Dez. 2018.

COSTA, P. R. O.; DUARTE, F. S. A utilização da biomassa da cana-de-açúcar como fonte de energia renovável aplicada no setor sucroalcooleiro. **Revista de Administração da Fatea**, v. 3, n. 3, p. 2-107, 2010.

ELGHARBAWY, A. A. et al. Ionic liquid pretreatment as emerging approaches for enhanced enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Biochemical Engineering Journal**. 252–267, 2016.

FERNANDES, E. S. **Efeito da granulometria no pré-tratamento ácido, acessibilidade, superfície exposta da lignina e sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação. Mestrado em Ciências Biológicas - UNESP, São Paulo, 2018.

FERNANDES, E. et al. Sugar and ethanol production process from sugarcane. In: MURPHY R. Sugarcane: production systems, uses and economic importance. Nova Iorque: **Nova Science Publishers**, p. 193-216. 2017.

GÁMEZ, S. et al. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. **Journal of Food Engineering**, v. 74: p. 78-88, 2006.

GAO, Y. et al. Effects of different pretreatment methods on chemical composition of sugarcane bagasse and enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 396-400, sept. 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.036>>. Acesso em: Jun. 2018.

GUIMARÃES, L. F. L.; COLLINS, C. H. Cromatografia líquida de alta eficiência. In: **Introdução a métodos cromatográficos**. 7ª ed. Campinas: Editora da UNICAMP, p.183-238, 1997.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v.100, p.10–18, jan. 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.05.027>>. Acesso em: Jun. 2018.

HENRIKSSON, G.; LENNHOLM, H. Cellulose and Carbohydrate Chemistry. In: EK, M.; GELLERSTEDT, G.; HENRIKSSON, G. **Wood chemistry and biotechnology**. Berlin: de Gruyter, 2009.

HICKERT, L. R. **Otimização da hidrólise de casca de arroz (*Oryza sativa*) e avaliação da capacidade de bioconversão deste hidrolisado a etanol e xilitol por leveduras**. Dissertação. Mestrado em Microbiologia Ambiental e Agrícola, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.

ISHIZAWA, C. I. et al. Can delignification decrease cellulose digestibility in acid pretreated corn stover? **Cellulose**, v. 16, p. 677-686, aug. 2009.

KHALIL, S. R.A; ABDELHAFEZ, A. A.; AMER, E. A. M. Evaluation of bioethanol production from juice and bagasse of some sweet sorghum varieties. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 60, n. 2, p. 317-324, 2015.

KHUONG, L. D. et al. Bioethanol production from alkaline-pretreated sugarcane bagasse by consolidated bioprocessing using *Phlebia* sp. MG-60. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 88, p. 62-68, mar. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.12.008>>. Acesso em: 17 jun. 2018.

KONDO, T., J. POLYM. **Sci: Part B: Polym Phys**, 35, 717, 1997.

LIMA, T. M. **Estudo energético do Bagaço de Diferentes variedades de cana-de-açúcar**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2011.

LIU, T. et al. A constraint-based model of *Scheffersomyces stipitis* for improved ethanol production. **Biotechnology for Biofuels**, Londres, v. 5, n. 72, 2012.

MANZOOR, A. et al. Dilute sulfuric acid: a cheap acid for optimization of bagasse pretreatment. **Science International**, v.24, n.1, p. 41-45, 2012.

MAURYA, D.P., SINGLA, A., NEGI, S. An overview of key pretreatment processes for biological conversion of lignocellulosic biomass to bioethanol. **Biotech** 5:597–609, 2015.

MILANEZ, A. Y. et al. De promessa a realidade: como o etanol celulósico pode revolucionar a indústria da cana-de-açúcar - uma avaliação do potencial competitivo e sugestões de política pública. **BNDES Setorial**, n. 41, 2015.

MILESSI, T. S. S. et al. Rice bran extract: na inexpensive nitrogen source for the production of 2G ethanol from sugarcane bagasse hydrolysate. **3 Biotech**, v. 3, n. 5, p. 373-379, 2012.

MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A.; MELO, D. C. Análise da madeira de pinus oocarpa parte I – estudos dos constituintes macromoleculares e extrativos voláteis. **Revista Árvore**, Viçosa – MG, v. 29: Nº 3, p. 461-470, 2005.

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

MUSSATTO, S. I. et al. Technological trends, global Market, and challenges of bio-ethanol production. **Biotechnol Adv.**, v. 28, p. 817-830, 2010.

NEUREITER, M. et al. Dilute-Acid hydrolysis of sugarcane bagasse at varying conditions. **Applied biochemistry and biotechnology**, p. 98-100, 2002.

NUNES, Cleiton A. et al. Chemoface: a novel free user-friendly interface for chemometrics. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 11, p. 2003-2010, 2012.

OLADI, S.; AITA, G. M. Optimization of liquid ammonia pretreatment variables for maximum enzymatic hydrolysis yield of energy cane bagasse. **Industrial crops and products**, v. 103, p. 122-132, 2017.

OLIVEIRA, E. M. **A coluna de cromatografia líquida na indústria farmacêutica: uso, controles e descarte**. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização) - Instituto de Tecnologia em Fármacos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2016.

OLIVEIRA, F. M.; COSTA, F. E. **Etanol a partir do Bagaço da Cana-de-açúcar**. Rio Claro, SP. UNESP, 2012.

OLIVEIRA, P. A. Caracterizar a Biomassa é fundamental para valorizá-la. 2013. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2013_1/biomassa/index.htm>. Acesso em: Dez. 2018.

OMACHI, I.H. et al. Produção de biomassa florestal para exportação: O caso da Amcel. **Revista Biomassa & Energia**, Viçosa, MG. v. 1, n. 1, p. 29-36, 2004.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of agro- industrial residues: Sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, New York, v. 74, p.69-80, aug. 2000. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00142-X](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00142-X)>. Acesso em: 18 jun. 2018.

PEDERSEN, M.; MEYER, A. S. Lignocellulose pretreatment severity – relating pH to biomatrix opening. **New Biotechnol**, v. 27, n. 6, p. 739-750, 2010.

PEREIRA JR, N. et al. Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production within the context of biorefinery. **Series on Biotechnology**. 1. ed. Rio de Janeiro, v.2, p.1-47, 2008.

PEREIRA, S. C. et al. 2G ethanol from the whole sugarcane lignocellulosic biomass. **Biotechnology for biofuels**, v. 8, n. 1, p. 44, 2015.

PIETROBON, V. C. **Hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido e álcali utilizando enzimas microbianas comerciais**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2008.

PILLING, S. **Refratômetro. Determinação do índice de refração de líquidos**. Físico-Química Experimental II. 2011. Disponível em: <https://www1.univap.br/spilling/FQE2/FQE2_EXP11_Refratometria.pdf>. Acesso em: 16 jul. 2018.

PITARELO, A.P. **Produção de etanol celulósico a partir do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

PRADO, J. M. et al. Hydrolysis of sugarcane bagasse in subcritical water. **Journal of super critical fluids**, v. 86, p. 15-22, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2013.11.018>>. Acesso em: 18 jun. 2018.

QUIRINO, W. F. Utilização energética de resíduos vegetais. **Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis**. Brasília: IBAMA, Laboratório de Produtos Florestais – LPF, p. 31, 2002.

ROSA, S. E. S.; GARCIA, J. L. F. O etanol de segunda geração: limites e oportunidades. **Revista do BNDES**, p. 117- 156, 2009.

ROSSETO, F. R. **Caracterização bioquímica, biofísica e estrutural da principal endoglucanase secretada por Xanthomonas campestris pv. campestris ATCC33913**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2011.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.30, p.279–291, may. 2003.

SANTOS, F. A. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para a produção de etanol. **Química Nova**. Viçosa, MG. v. 35, n.5, p. 1004-1010, 2012.

SANTOS, F.; COLODETTE, J.; QUEIROZ, J. H. Bioenergia e Biorrefinaria – cana-de-açúcar e espécies florestais. **Editores UFV**, Viçosa-MG, 2013.

SARKAR, N. et al. Bioethanol production from agricultural wastes: an overview. **Renewable Energy**, v. 37. p. 19-27, jan. 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.renene.2011.06.045>>. Acesso em: 19 jun. 2018.

SIEGER. **Equipamentos Médicos Laboratoriais**. 2012. Disponível em: <<http://equipolab.com.br/p-607037-BANHO-MARIA-SIEGER-60-TUBOS>>. Acesso em: 18 jul. 2018.

SILVA, A. F. A. **Validação de métodos analíticos para controlo de qualidade de um medicamento, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)**. Dissertação. Mestrado em Engenharia Química e Bioquímica, Universidade Nova de Lisboa. 2016.

SLUITER, A. et al. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. **Laboratory analytical procedure**, v. 1617, p. 1-16, 2008.

SOUZA, R. B. A. et al. **Estudo do pré-tratamento hidrotérmico e hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar**. Tese. Doutorado em Engenharia Química, São Carlos – SP. 2016.

SUN, S. et al. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. **Bioresource technology**, 199, 49-58. 2016.

SUN, Y., CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v.83, p.1–11, may. 2002. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00212-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00212-7)>. Acesso em: 20 jun. 2018.

TAO, L. et al. Process and technoeconomic analysis of leading pretreatment technologies for lignocellulosic ethanol production using switchgrass. **Bioresource technology**, v. 102, n. 24, p. 11105-11114, 2011.

TOGINHO FILHO, D. O., ZAPPAROLI, F. V. D., PANTOJA, J. C. S. Índice de Refração. **Catálogo de Experimentos do Laboratório Integrado de Física Geral Departamento de Física**. Universidade Estadual de Londrina, Setembro, 2008.

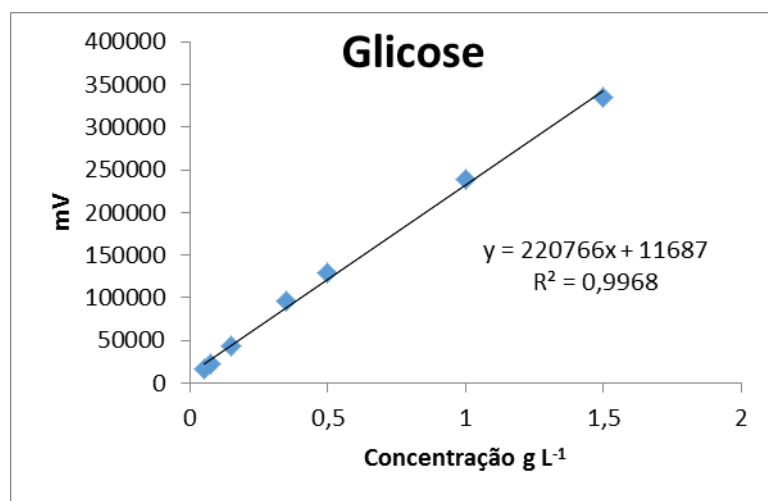
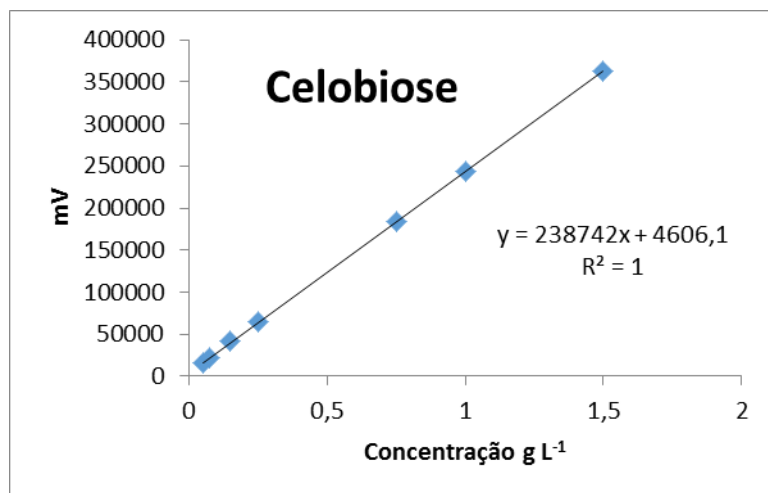
UNICA. Produção de etanol e açúcar. 2018. Disponível em: <<https://bit.ly/2WXXc9g>> Acesso em: Dez. 2018.

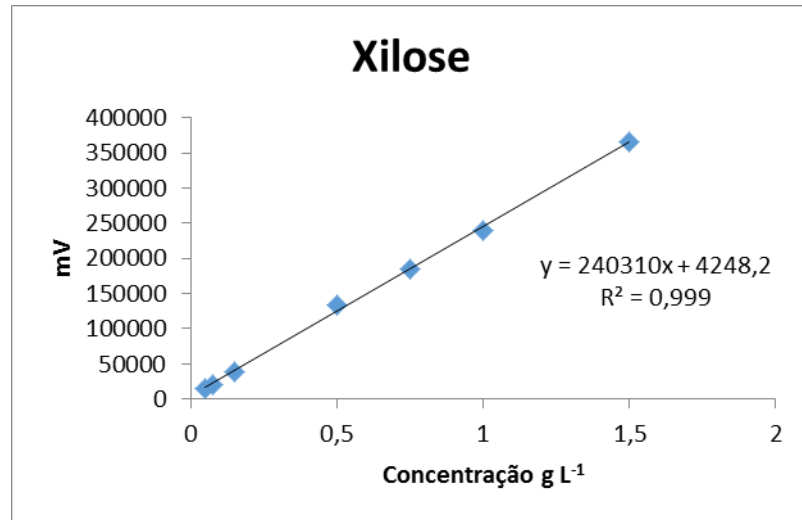
USLU, B. et al. Analytical Method Development and Validation of Pharmaceutical Analysis Using Chromatographic Techniques. **Hindawi Publishing Corporation Chromatography Research International**. v. 2012, 2012.

ZHAO, X.; ZHANG, L.; LIU, D. Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr**, Hoboken v. 6, n. 4, p. 465-482, 2012.

APÊNDICES

Apêndice A. Curva padrão da concentração de celobiose, glicose e xilose.



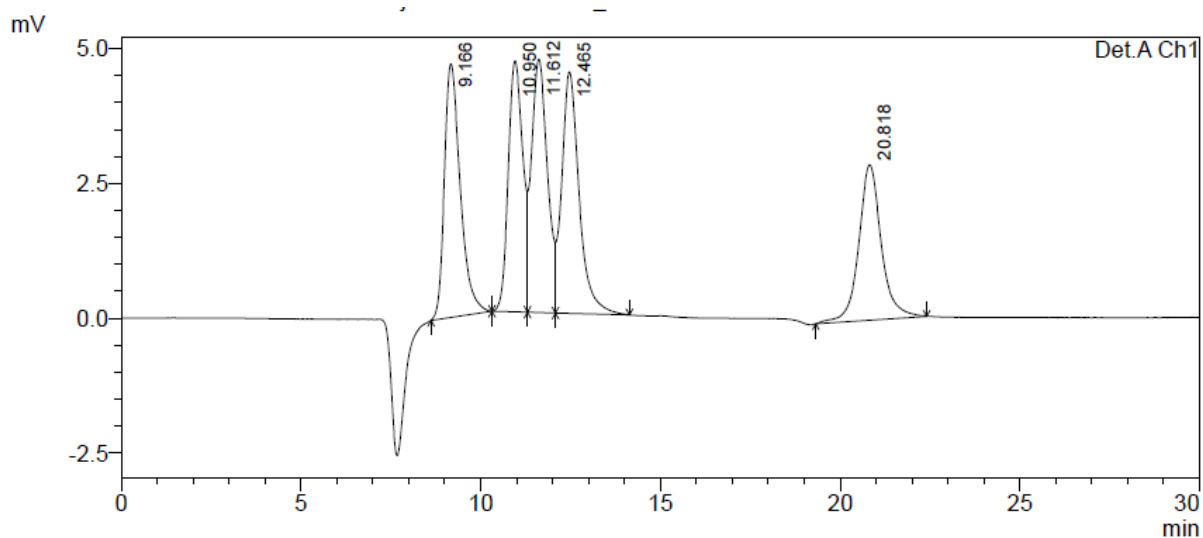


Apêndice B. Cromatogramas obtidos e suas respectivas áreas e os tempos de retenção de cada açúcar.

Tempos de retenção dos açúcares (cromatograma):

- 9.166 = celobiose
- 10.950 = glicose
- 11.612 = xilose
- 12.465 = arabinose

- **Cromatograma da curva padrão dos açúcares**



1 Det.A Ch1/

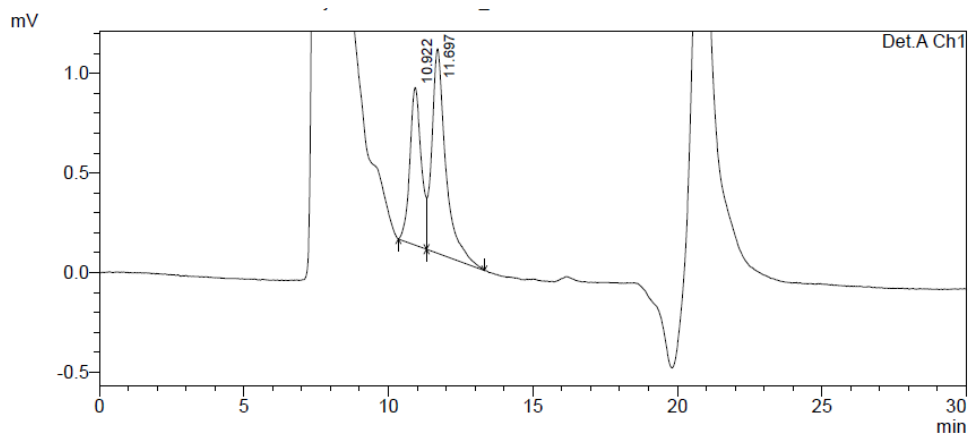
PeakTable

Detector A Ch1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	9.166	144321	4702	20.683	21.956
2	10.950	131577	4655	18.857	21.736
3	11.612	145591	4701	20.865	21.953
4	12.465	150775	4476	21.608	20.901
5	20.818	125502	2881	17.986	13.454
Total		697767	21416	100.000	100.000

- Cromatogramas da solução 3 feitas em duplicata

1

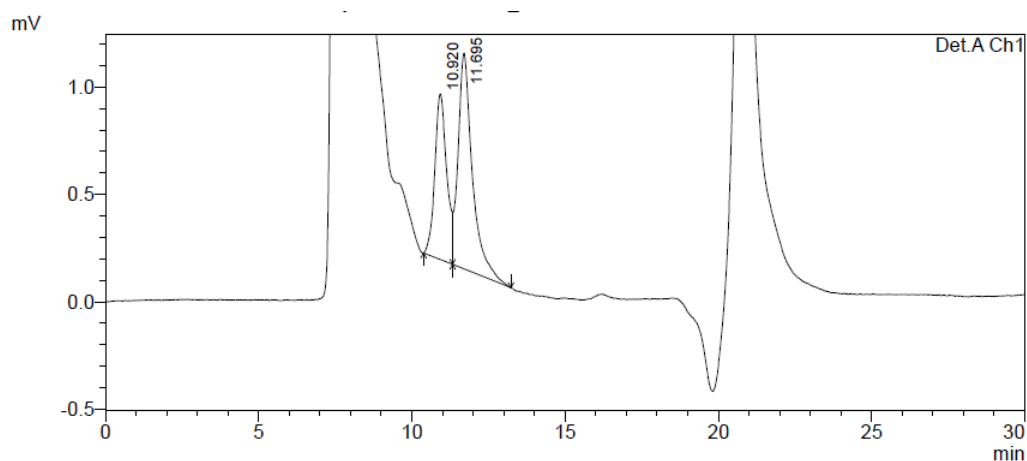


1 Det.A Ch1/

PeakTable

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	10.922	21715	791	38.683	43.517
2	11.697	34421	1027	61.317	56.483
Total		56136	1818	100.000	100.000

2



1 Det.A Ch1/

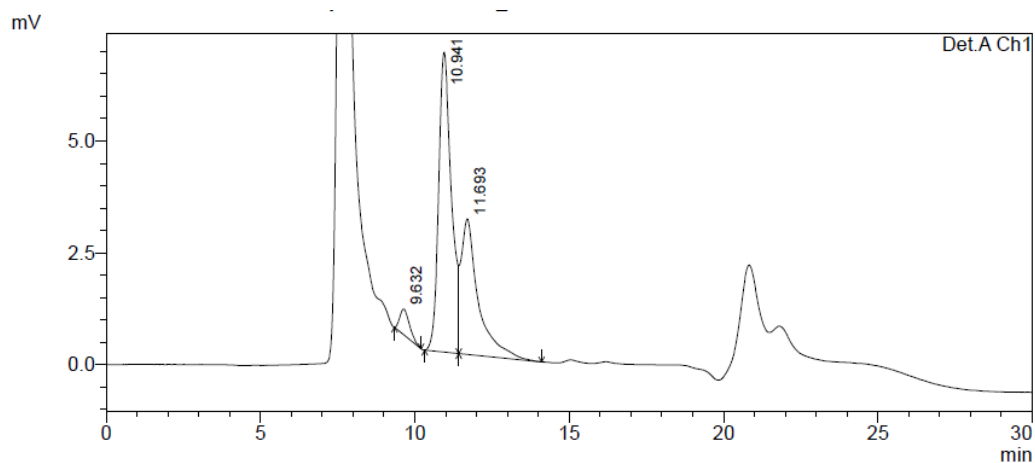
PeakTable

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	10.920	20854	773	39.029	43.415
2	11.695	32579	1007	60.971	56.585
Total		53433	1780	100.000	100.000

Usando o valor da área, substitui-se o y da equação da reta e calcula-se com as equações das curvas padrão a concentração de açúcar para se obter o resultado em g L. Exemplo: = $(21715 - 11687) / 220766 * \text{fator de diluição} = \text{concentração em g L}$.

- Cromatogramas da solução 8 feitas em duplicata

1



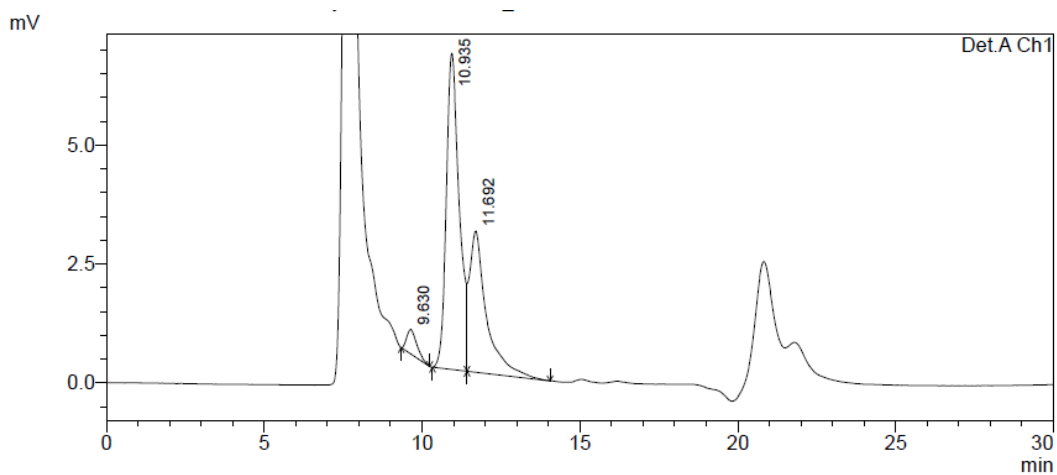
1 Det.A Ch1/

PeakTable

Detector A Ch1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	9.632	12542	571	3.885	5.546
2	10.941	192969	6699	59.774	65.051
3	11.693	117318	3028	36.340	29.403
Total		322829	10298	100.000	100.000

2



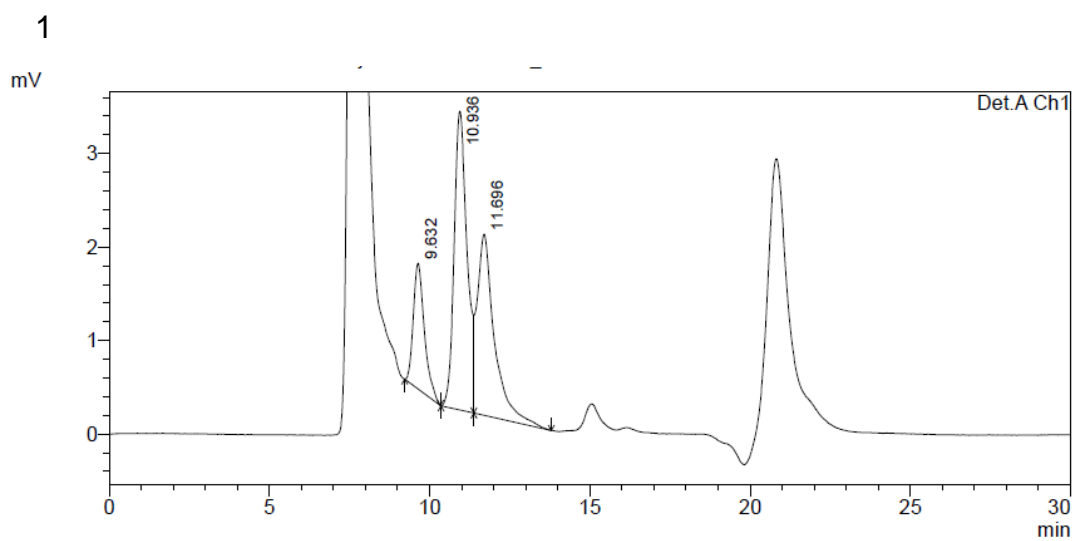
1 Det.A Ch1/

PeakTable

Detector A Ch1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	9.630	11470	510	3.671	5.038
2	10.935	189751	6650	60.729	65.635
3	11.692	111233	2971	35.600	29.327
Total		312454	10131	100.000	100.000

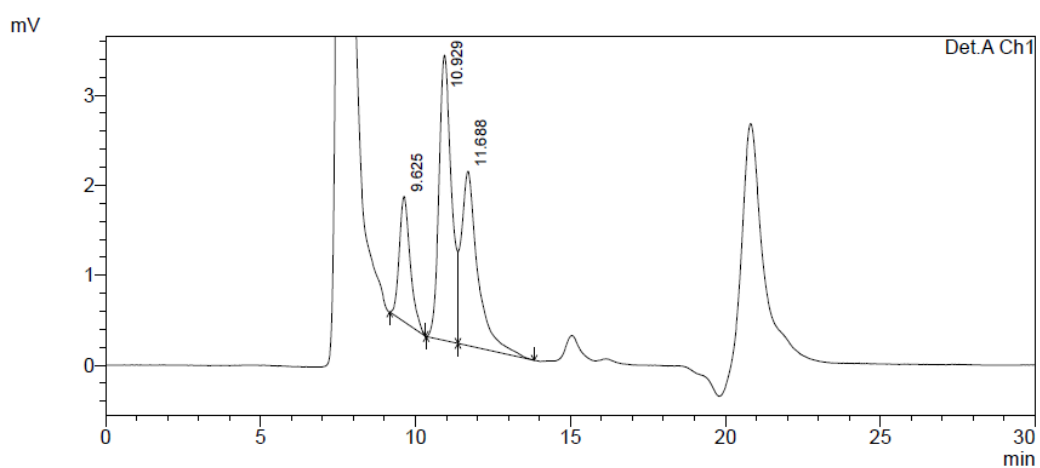
- Cromatogramas do ponto central feitas em duplicata



PeakTable

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	9.632	32230	1343	16.593	20.731
2	10.936	89543	3195	46.099	49.333
3	11.696	72467	1939	37.308	29.935
Total		194240	6476	100.000	100.000

2



PeakTable

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	9.625	34172	1391	17.522	21.397
2	10.929	88614	3171	45.437	48.782
3	11.688	72241	1939	37.042	29.820
Total		195028	6501	100.000	100.000