

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GABRIELA BONAN HERMSDORFF

PRÉ-TRATAMENTO ORGANOSOLV DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR
EMPREGANDO ETANOL E ÁCIDOS ORGÂNICOS NA PRESENÇA DE CO₂
SUPERCRÍTICO

CURITIBA

2021

GABRIELA BONAN HERMSDORFF

PRÉ-TRATAMENTO *ORGANOSOLV* DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR
EMPREGANDO ETANOL E ÁCIDOS ORGÂNICOS NA PRESENÇA DE CO₂
SUPERCRÍTICO

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química – PPGEQ, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos

Co-orientador: Prof. Dr. Arion Zandoná Filho

CURITIBA

2021

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

H555p

Hermsdorff, Gabriela Bonan

Pré-tratamento organosolv de bagaço de cana-de-açúcar empregando etanol e ácidos orgânicos na presença de CO₂ supercrítico [recurso eletrônico] / Gabriela Bonan Hermsdorff. – Curitiba, 2021.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2021.

Orientador: Luiz Pereira Ramos – Coorientador: Arion Zandoná Filho.

1. Biomassa. 2. Bagaço de cana. 3. Solventes. 4. Dióxido de carbono. I. Universidade Federal do Paraná. II. Ramos, Luiz Pereira. III. Zandoná Filho, Arion. IV. Título.

CDD: 665.776

Bibliotecário: Elias Barbosa da Silva CRB-9/1894

ATA Nº158

ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE MESTRADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA

No dia trinta de agosto de dois mil e vinte e um às 08:15 horas, na sala Microsoft Teams, Plataforma online, em função da portaria 754/2020 da Reitoria - UFPR, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de dissertação da mestranda **GABRIELA BONAN HERMSDORFF**, intitulada: **PRÉ-TRATAMENTO ORGANOSOLV DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR EMPREGANDO ETANOL E ÁCIDOS ORGÂNICOS NA PRESENÇA DE CO₂ SUPERCRÍTICO**, sob orientação do Prof. Dr. LUIZ PEREIRA RAMOS. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: LUIZ PEREIRA RAMOS (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), JURGEN ANDREAUS (UNIVERSIDADE REGIONAL DE BLUMENAU), ALEXANDRE FERREIRA SANTOS (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ). A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela APROVAÇÃO. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga de título de mestre está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, LUIZ PEREIRA RAMOS, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

CURITIBA, 30 de Agosto de 2021.

Assinatura Eletrônica

30/08/2021 11:40:27.0

LUIZ PEREIRA RAMOS

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

30/08/2021 21:40:18.0

JURGEN ANDREAUS

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE REGIONAL DE BLUMENAU)

Assinatura Eletrônica

30/08/2021 11:42:20.0

ALEXANDRE FERREIRA SANTOS

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **GABRIELA BONAN HERMSDORFF** intitulada: **PRÉ-TRATAMENTO ORGANOSOLV DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR EMPREGANDO ETANOL E ÁCIDOS ORGÂNICOS NA PRESENÇA DE CO₂ SUPERCRÍTICO**, sob orientação do Prof. Dr. LUIZ PEREIRA RAMOS, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa. A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 30 de Agosto de 2021.

Assinatura Eletrônica

30/08/2021 11:40:27.0

LUIZ PEREIRA RAMOS

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

30/08/2021 21:40:18.0

JURGEN ANDREAUS

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE REGIONAL DE BLUMENAU)

Assinatura Eletrônica

30/08/2021 11:42:20.0

ALEXANDRE FERREIRA SANTOS

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me proporcionar saúde, força e determinação para a conclusão deste trabalho.

Agradeço a minha família pelo amparo, carinho e amor. Em especial, aos meus pais, Wendel e Marcia, pela dedicação, esforço, ensinamentos e incentivos para que eu pudesse buscar e atingir meus objetivos.

Ao meu orientador, Professor Dr. Luiz Pereira Ramos, por todo empenho, oportunidades de aprendizado e conhecimentos compartilhados, que tornaram possível a realização deste trabalho e que muito contribuíram para minha formação profissional.

À UFPR e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química (PPGEG) por todo suporte e ensinamentos, em especial, aos Professores Arion Zandoná Filho e Marcos Lúcio Corazza, que muito contribuíram para a realização desta pesquisa.

Aos meus colegas de CEPESQ e LACTA, pelo convívio diário e pela ajuda nas análises, nos experimentos e nos procedimentos de laboratório, em especial para Thiago Alexandre da Silva, Antônio Magalhães, Damian Fetzner, Priscila Dayane Fernandes, Maria Juliane Suota, Luís Ricardo S. Kanda, Fabiane Hamerski, Diego Trevisan Melfi e Estephania Laura Nottar Escobar.

Aos meus colegas de turma de mestrado pela amizade, companheirismo e por todos os momentos bons de descontração, em especial, Giulia Herbst, João Carlos Segatto Leite, José Amorim, Lucas Leocadio Battiston e Maria Alice Antoniassi.

Às minhas amigas de longa data, Ana Laura Maiello, Débora Fazolin, Paula Mayara e Thaís Mazzotti, que sempre me apoiaram e me incentivaram mesmo de longe.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

Enfim, a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para que me tornasse Mestre em Engenharia Química.

RESUMO

Uma nova tecnologia de pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar foi desenvolvida empregando um processo *organosolv* com catalisadores ácidos na ausência e presença de scCO_2 em diferentes condições de processos, sendo que os parâmetros de decisão para o melhor pré-tratamento foram pautados nas taxas de recuperação mássica de glucanas e de deslignificação do material de origem. Primeiramente foi estudado o melhor catalisador (ácidos acético, cítrico e oxálico) na deslignificação nas condições de 170 °C, 60 min de reação, 60% de etanol em água e 25 g de CO_2 . Todos os catalisadores adicionados ao pré-tratamento aumentaram a taxa de remoção de hemiceluloses e, por consequência, de lignina. Porém, os maiores rendimentos de deslignificação vieram dos pré-tratamentos com ácido oxálico na ausência e na presença de scCO_2 , com valores de $86 \pm 1\%$ e $85,6 \pm 0,3\%$, respectivamente, que foram acompanhados por altos rendimentos de recuperação de glucanas. Também foram avaliadas as cargas de CO_2 (0, 25, 35 e 50 g) injetadas a pré-tratamentos com 60% de etanol em água e ácido oxálico em 170 °C e 60 min. As maiores quantidades de CO_2 adicionadas ao pré-tratamento não causaram aumento na recuperação de glucanas e nem maior remoção de lignina do bagaço de cana, sendo que a deslignificação continuou em cerca de 86%. Porém, como vantagens do emprego do CO_2 , os pré-tratamentos apresentaram maior homogeneidade do sistema, devido ao maior poder de difusão do solvente. Quando comparados os pré-tratamentos em 60 e 15 min de reação, notou-se que o menor tempo em experimentos assistidos por CO_2 atingiram os 86% de deslignificação, enquanto o pré-tratamento realizado na ausência de CO_2 removeu 68% de lignina. Portanto, em menores tempos de reação, o emprego de CO_2 se mostrou vantajoso. O trabalho também avaliou a quantidade de etanol (0%, 40%, 60% e 80%) adicionada em água a 170 °C por 15 min de reação, na ausência e presença de 25 g de CO_2 . O pré-tratamento empregando 60% etanol em água e ácido oxálico na presença de CO_2 removeu 86% de lignina, sendo esse o melhor resultado de deslignificação. Por fim, um planejamento experimental foi realizado para determinar o efeito da temperatura (150-190 °C), do tempo de reação (0-30 min) e da concentração de ácido oxálico (0,5-1,5 m/v) no processo *organosolv* assistido por scCO_2 . A melhor condição foi de 170 °C por 15 min empregando 1% (m/v) de ácido oxálico, que apresentou alta recuperação mássica de glucanas ($89 \pm 4\%$) e bons níveis de deslignificação ($86 \pm 2\%$). O bagaço de cana pré-tratado nessas condições foi o escolhido para a realização da etapa de hidrólise enzimática, que resultou em na conversão de $74,3 \pm 0,2\%$ das glucanas em glucose após 96 h de incubação. Esse valor foi cerca de 11 vezes maior que o rendimento do bagaço não tratado, que se mostrou mais recalcitrante à hidrólise enzimática. Portanto, o pré-tratamento foi fundamental para alterar a estrutura do bagaço de cana-de-açúcar e tornar as glucanas, majoritariamente presentes na forma de celulose, mais disponíveis à conversão por processos como a hidrólise enzimática. Os licores concentrados oriundos do pré-tratamento permitiram a recuperação da lignina em condições para ser aproveitada em outras aplicações, e os sobrenadantes derivados desse processo apresentaram-se em boas condições para processos fermentativos como para a produção de etanol celulósico.

Palavras-chave: Biomassa lignocelulósica. Bagaço de cana-de-açúcar. Pré-tratamento. Solventes orgânicos. Dióxido de carbono supercrítico.

ABSTRACT

A new scCO₂-assisted acid-catalysed *organosolv* pretreatment technology was developed for sugarcane bagasse. Different process conditions were tested, and the decision parameters for the best pretreatment configuration were based on both glucan retention in pretreated materials and the extent of biomass delignification. Firstly, the best organic acid catalyst (acetic, citric and oxalic acids) was identified in reactions carried out at 170 °C for 60 min using 60% ethanol in water and 25 g of CO₂. All catalysts added to the pretreatment increased hemicellulose and some lignin removal, but the highest delignification performances were obtained with oxalic acid in the absence and presence of scCO₂ (yields of 86 ± 1% and 85.6 ± 0.3%, respectively), always with high glucan retention rates. Next, the CO₂ load (0, 25, 35 and 50 g) was assessed for pretreatments carried out with 60% ethanol in water and oxalic acid at 170 °C and 60 min. An increase in the amount of CO₂ injected in the reaction system had no apparent effect on glucan recovery and lignin removal from sugarcane bagasse, where delignification continued at around 86%. However, CO₂ injection was advantageous because pretreatment was more homogeneous due to its power of diffusion into the solvent. When different pretreatment times (60 min and 15 min) were compared for experiments carried out in the presence of CO₂, the shortest pretreatment managed to reach 86% delignification of the starting material, while the pretreatment in the absence of CO₂ removed only 68% lignin. Therefore, the use of CO₂ proved to be more advantageous for shorter reaction times. The ideal amount of ethanol (0%, 40%, 60% and 80%) added to water was also evaluated in pretreatments carried out at 170 °C for 15 min, in the absence and presence of 25 g of CO₂. Pretreatment using 60% ethanol in water and oxalic acid in the presence of CO₂ removed 86% of lignin, which was the best delignification achieved in this study. Finally, an experimental design was carried out to study the effect of variables such as temperature (150-190 °C), reaction time (0-30 min) and oxalic acid concentration (0.5-1.5, w/v) in the scCO₂-assisted *organosolv* pretreatment process. The best condition was 170 °C for 15 min using 1% (w/v) of oxalic acid, in which high delignification levels (86 ± 2%) were obtained along with high mass recovery of glucans in pretreated materials (89 ± 4%). Then, cellulose accessibility was assessed in pretreated materials that were obtained under these experimental conditions using Cellic CTec3 from Novozymes. Enzymatic hydrolysis resulted in a glucose yield of 74.3 ± 0.2% after 96 h, which was about 11 times greater than the yield obtained from untreated, Wiley-milled sugarcane bagasse. Therefore, this scCO₂-assisted acid-catalysed *organosolv* pretreatment changed the structure of sugarcane bagasse, providing high delignification yields while making glucans (mostly present in cellulose) more available for conversion processes such as enzymatic hydrolysis. The concentrated liquors from the pretreatment allowed the recovery of lignin in high yields to be used in other applications, and the supernatants derived from this process contained low contamination with fermentation inhibitors that are known to be detrimental for cellulosic ethanol production.

Keywords: Lignocellulosic biomass. Sugarcane bagasse. Pre-treatment. Organic solvents. Supercritical carbon dioxide.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESQUEMA SIMPLIFICADO DE UMA BIORREFINARIA LIGNOCELULÓSICA.	22
FIGURA 2 - ALGUNS PRODUTOS POTENCIAIS OBTIDOS NA BIORREFINARIA DE MATERIAL LIGNOCELULÓSICO PROCESSADOS POR DIFERENTES ROTAS.	23
FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DE UMA FIBRA VEGETAL.....	28
FIGURA 4 - LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO INTRA E INTERMOLECULAR DA ESTRUTURA SUPRAMOLECULAR DA CELULOSE.....	30
FIGURA 5 - MODELO DE HEMICELULOSES ENCONTRADAS EM GRAMÍNEAS: RESÍDUOS DE ANIDRO-D-XILOPIRANOSE (PRETO); RESÍDUOS DE O-ACETIL (AZUL); RESÍDUOS DE ARABINOFURANOSIL (VERMELHO); RESÍDUOS DE 4-O-METILGLUCURONIL (VERDE); PONTE DIFERÚLICA (CENTRO).	32
FIGURA 6 - OS PRECURSORES DA LIGNINA (A) E AS LIGAÇÕES ENTRE AS UNIDADES DE FENILPROPANO (B).	33
FIGURA 7 - EXEMPLO DE UMA ESTRUTURA DE LIGNINA COM AS LIGAÇÕES 5-5', β - β' , β -O-4', α -O-4', β -5', β -1' e 4-O-5'.	34
FIGURA 8 - SEPARAÇÃO DOS COMPONENTES MACROMOLECULARES DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA POR PRÉ-TRATAMENTO (FIBRAS DE CELULOSE EM PRETO, HEMICELULOSE EM VERMELHO, LIGNINA EM AZUL E PECTINAS EM VERDES).	36
FIGURA 9 - DIAGRAMA DE FASES DE CO ₂	42
FIGURA 10 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS E DE SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO.	46
FIGURA 11 - REPRESENTAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA PELO COMPLEXO CELULOLÍTICO.	48
FIGURA 12 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PRÉ-TRATAMENTO ORGANOSOLV NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO.	56
FIGURA 13 - APARATO EXPERIMENTAL DO REATOR PARR TIPO BATELADA.	56
FIGURA 14 - DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA DO BAGAÇO DE CANA-DE-	

AÇÚCAR.	63
FIGURA 15 - GRÁFICOS DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO INSOLÚVEL DOS BAGAÇOS DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADOS E DA RELAÇÃO COM ACIDEZ (B) EMPREGANDO DIFERENTES CATALISADORES ÁCIDOS NA PRESENÇA DE CO ₂	72
FIGURA 16 - GRÁFICOS DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO INSOLÚVEL DOS BAGAÇOS DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADOS E DA RELAÇÃO COM ACIDEZ (B) EMPREGANDO DIFERENTES CATALISADORES ÁCIDOS NA AUSÊNCIA DE CO ₂	72
FIGURA 17 - RENDIMENTOS DE RECUPERAÇÃO MÁSSICA DOS PRINCIPAIS COMPONENTES DA FRAÇÃO INSOLÚVEL DOS BAGAÇOS DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADOS EM 170 °C, 25 g DE CO ₂ , 60% (v/v) DE ETANOL EM ÁGUA EM 60 min DE REAÇÃO PARA DEFINIÇÃO DO MELHOR CATALISADOR.	73
FIGURA 18 - RENDIMENTOS DE RECUPERAÇÃO MÁSSICA DOS PRINCIPAIS COMPONENTES DA FRAÇÃO INSOLÚVEL DOS BAGAÇOS DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADOS A 170 °C COM 60% (v/v) DE ETANOL EM ÁGUA POR 60 min DE REAÇÃO, SOB DIFERENTES CARGAS DE CO ₂ NO SISTEMA.	81
FIGURA 19 - RENDIMENTOS DE RECUPERAÇÃO MÁSSICA DOS PRINCIPAIS COMPONENTES DA FRAÇÃO INSOLÚVEL DOS BAGAÇOS DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADOS EM 170 °C, 60% (v/v) DE ETANOL EM ÁGUA E 25 g DE CO ₂ EM DIFERENTES TEMPOS.	88
FIGURA 20 - RENDIMENTOS DE RECUPERAÇÃO MÁSSICA DOS PRINCIPAIS COMPONENTES DA FRAÇÃO INSOLÚVEL DOS BAGAÇOS DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADOS EM 170 °C, 15 min DE REAÇÃO e 25 g de CO ₂ PARA DEFINIÇÃO DA MELHOR PROPORÇÃO DE ETANOL EM ÁGUA.	92
FIGURA 21 - EXEMPLO DE ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DA LIGNINA RECUPERADA DO LICOR DE EXTRAÇÃO APÓS PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA COM 60% (v/v) DE ETANOL EM ÁGUA SEM CO ₂ A 170 °C E 60 min DE REAÇÃO.	99
FIGURA 22 – ESPECTROS NO UV-VIS DAS FRAÇÕES HIDROSSOLÚVEIS OBTIDAS APÓS PRECIPITAÇÃO DA LIGNINA, EMPREGANDO PRÉ-	

TRATAMENTOS COM 60% (v/v) ETANOL EM ÁGUA A 170 °C POR 60 min NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE CO ₂	100
FIGURA 23 - ESPECTROS NO UV-VIS DAS FRAÇÕES HIDROSSOLÚVEIS OBTIDAS APÓS PRECIPITAÇÃO DA LIGNINA, EMPREGANDO PRÉ-TRATAMENTOS COM 100% ÁGUA (SEM CO ₂) E 60% (v/v) DE ETANOL EM ÁGUA NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE CO ₂ , 170 °C POR 15 min.....	101
FIGURA 24 - GRÁFICOS DE PARETO PARA A RECUPERAÇÃO MÁSSICA DE ANIDROGLUCOSE (A) E DE DESLIGNIFICAÇÃO (B) DOS BAGAÇOS DE CANA-DE-AÇÚCAR TRATADOS.	110
FIGURA 25 - MODELOS ESTATÍSTICOS DE VALORES OBSERVADOS VS. VALORES PREDITOS PARA RECUPERAÇÃO MÁSSICA DE ANIDROGLUCOSE (A) E DE DESLIGNIFICAÇÃO (B) DOS BAGAÇOS DE CANA-DE-AÇÚCAR TRATADOS.	111
FIGURA 26 - RENDIMENTOS DAS LIGNINAS RECUPERADAS DO LICOR DE EXTRAÇÃO APÓS PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR COM 60% (v/v) DE ETANOL EM ÁGUA E ÁCIDO OXÁLICO ASSISTIDO POR CO ₂ SUPERCRÍTICO.....	113
FIGURA 27 - CINÉTICAS DAS HIDRÓLISES ENZIMÁTICAS DOS BAGAÇOS DE CANA-DE-AÇÚCAR DE ORIGEM E PRÉ-TRATADO COM 60% (v/v) DE ETANOL EM ÁGUA E 1% DE ÁCIDO OXÁLICO ASSISTIDO POR CO ₂ SUPERCRÍTICO EM 170 °C E 15 min DE REAÇÃO.	118

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - PRINCIPAIS TÉCNICAS DE PRÉ-TRATAMENTO DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA.	37
TABELA 2 - CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA SEGUINDO AS NORMAS DO <i>NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY</i> (NREL).	52
TABELA 3 - NÍVEIS EXPERIMENTAIS UTILIZADOS NO PRÉ-TRATAMENTO ORGANOSOLV DE BAGAÇO DE CANA.	59
TABELA 4 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS BAGAÇOS DE CANA-DE-AÇÚCAR NÃO TRATADO E LIVRE DE EXTRAÍVEIS ETANÓLICOS.	65
TABELA 5 - COMPARAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR EM RELAÇÃO AOS DADOS DISPONÍVEIS NA LITERATURA.	67
TABELA 6 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA E RENDIMENTOS TEÓRICOS DA FRAÇÃO INSOLÚVEL DOS BAGAÇOS DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADOS EM 170 °C, 25 g DE CO ₂ , 60% (v/v) DE ETANOL EM ÁGUA EM 60 min DE REAÇÃO PARA DEFINIÇÃO DO MELHOR CATALISADOR.	71
TABELA 7 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS DOS PRÉ-TRATAMENTOS EM 170 °C, 60% (v/v) DE ETANOL EM ÁGUA E 25 g DE CO ₂ EM 60 min DE REAÇÃO.	76
TABELA 8 - RECUPERAÇÃO MÁSSICA DOS CARBOIDRATOS DA FRAÇÃO SOLÚVEL DOS PRÉ-TRATADOS EM 170 °C, 25 g DE CO ₂ , 60% (v/v) DE ETANOL EM ÁGUA EM 60 min DE REAÇÃO PARA DEFINIÇÃO DO MELHOR CATALISADOR.	77
TABELA 9 - SOMA DOS SÓLIDOS TOTAIS SOLÚVEIS E INSOLÚVEIS E DA LIGNINA RECUPERADA DE CADA PRÉ-TRATAMENTO EM 170 °C, 25 g DE CO ₂ , 60% (v/v) DE ETANOL EM ÁGUA EM 60 min DE REAÇÃO PARA DEFINIÇÃO DO MELHOR CATALISADOR.	78
TABELA 10 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA E RENDIMENTOS TEÓRICOS DA FRAÇÃO INSOLÚVEL DOS BAGAÇOS DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADOS A 170 °C COM 60% (v/v) DE ETANOL EM ÁGUA POR 60 min DE REAÇÃO, SOB DIFERENTES CARGAS DE CO ₂ NO	

SISTEMA.....	80
TABELA 11 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS DOS PRÉ-TRATAMENTOS EM 170 °C, 60% (v/v) ETANOL EM ÁGUA EM 60 min DE REAÇÃO, SOB DIFERENTES CARGAS DE CO ₂ NO SISTEMA. .	83
TABELA 12 - RECUPERAÇÃO MÁSSICA DOS CARBOIDRATOS DA FRAÇÃO SOLÚVEL DOS PRÉ-TRATADOS A 170 °C COM 60% (v/v) DE ETANOL EM ÁGUA POR 60 min DE REAÇÃO, SOB DIFERENTES CARGAS DE CO ₂ NO SISTEMA.	84
TABELA 13 - SÓLIDOS TOTAIS SOLÚVEIS E INSOLÚVEIS E LIGNINA RECUPERADA DE CADA PRÉ-TRATAMENTO A 170 °C, USANDO 60% (v/v) DE ETANOL EM ÁGUA E 60 min DE REAÇÃO SOB DIFERENTES CARGAS DE CO ₂ NO SISTEMA.....	85
TABELA 14 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA E RENDIMENTOS TEÓRICOS DA FRAÇÃO INSOLÚVEL DOS BAGAÇOS DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADOS EM 170 °C, 60% (v/v) DE ETANOL EM ÁGUA E 25 g DE CO ₂ EM DIFERENTES TEMPOS.	86
TABELA 15 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS DOS PRÉ-TRATAMENTOS EM 170 °C, 60% (v/v) ETANOL EM ÁGUA E 25 g DE CO ₂ DE REAÇÃO EM DIFERENTES TEMPOS.	88
TABELA 16 - RECUPERAÇÃO MÁSSICA DOS CARBOIDRATOS DA FRAÇÃO SOLÚVEL DOS PRÉ-TRATADOS EM 170 °C, 60% (v/v) DE ETANOL EM ÁGUA E 25 g de CO ₂ EM DIFERENTES TEMPOS.....	89
TABELA 17 - SOMA DOS SÓLIDOS TOTAIS SOLÚVEIS E INSOLÚVEIS E DA LIGNINA RECUPERADA DE CADA PRÉ-TRATAMENTO EM 170 °C, 60% (v/v) DE ETANOL EM ÁGUA E 25 g DE CO ₂ EM DIFERENTES TEMPOS.	90
TABELA 18 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA E RENDIMENTOS TEÓRICOS DA FRAÇÃO INSOLÚVEL DOS BAGAÇOS DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADOS EM 170 °C, 15 min DE REAÇÃO e 25 g de CO ₂ PARA DEFINIÇÃO DA MELHOR PROPORÇÃO DE ETANOL EM ÁGUA.....	91
TABELA 19 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS DOS PRÉ-TRATAMENTOS EM 170 °C, 15 min DE REAÇÃO E 25 g de CO ₂ PARA DEFINIÇÃO DA MELHOR PROPORÇÃO ETANOL EM ÁGUA.....	94

TABELA 20 – EFEITO DA PROPORÇÃO DE ETANOL EM ÁGUA SOBRE A RECUPERAÇÃO MÁSSICA DOS CARBOIDRATOS DA FRAÇÃO SOLÚVEL ORIUNDA DE PRÉ-TRATAMENTOS REALIZADOS A 170 °C POR 15 min, NA PRESENÇA DE 25 g DE CO ₂	95
TABELA 21 - SOMA DOS SÓLIDOS TOTAIS SOLÚVEIS E INSOLÚVEIS E DA LIGNINA RECUPERADA DE CADA PRÉ-TRATAMENTO EM 170 °C, 25 g de CO ₂ E 15 min PARA A DEFINIÇÃO DA MELHOR PROPORÇÃO ETANOL EM ÁGUA.	96
TABELA 22 - RENDIMENTOS E MASSAS DAS LIGNINAS RECUPERADAS DO LICOR DE EXTRAÇÃO APÓS DIFERENTES CONDIÇÕES DE PRÉ-TRATAMENTOS <i>ORGANOSOLV</i> DO BAGAÇO DE CANA A 170 °C.	98
TABELA 23 - ACIDEZ E CONVERSÃO EM ÉSTERES DE PRÉ-TRATAMENTOS SEM BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR A 170 °C E 25 g DE CO ₂ EM DIFERENTES PROPORÇÕES DE ETANOL EM ÁGUA.	103
TABELA 24 - RENDIMENTO DA RECUPERAÇÃO MÁSSICA E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO INSOLÚVEL DOS BAGAÇOS DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADOS COM 60% (v/v) DE ETANOL EM ÁGUA E ÁCIDO OXÁLICO ASSISTIDO POR CO ₂ SUPERCRÍTICO.....	106
TABELA 25 - RECUPERAÇÃO MÁSSICA RELATIVA DOS PRINCIPAIS COMPONENTES DOS BAGAÇOS DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADOS COM 60% (v/v) DE ETANOL EM ÁGUA E ÁCIDO OXÁLICO ASSISTIDO POR CO ₂ SUPERCRÍTICO.....	107
TABELA 26 - DADOS ANOVA RELACIONANDOS A RECUPERAÇÃO MÁSSICA DE ANIDROGLUCOSE DA FRAÇÃO INSOLÚVEL DOS BAGAÇOS DE CANA-DE-AÇÚCAR TRATADOS SEGUINDO O PLANEJAMENTO ($R^2 = 0,991$).	108
TABELA 27 - DADOS ANOVA RELACIONANDOS A DESLIGNIFICAÇÃO DA FRAÇÃO INSOLÚVEL DOS BAGAÇOS DE CANA-DE-AÇÚCAR TRATADOS SEGUINDO O PLANEJAMENTO ($R^2 = 0,988$).	109
TABELA 28 - RENDIMENTOS E MASSAS DAS LIGNINAS RECUPERADAS DO LICOR DE EXTRAÇÃO APÓS PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR COM 60% (v/v) DE ETANOL EM ÁGUA E ÁCIDO OXÁLICO ASSISTIDO POR CO ₂ SUPERCRÍTICO.....	112
TABELA 29 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS DOS PRÉ-	

TRATAMENTOS DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR COM 60% (v/v) DE ETANOL EM ÁGUA E ÁCIDO OXÁLICO ASSISTIDO POR CO ₂ SUPERCRÍTICO.....	114
TABELA 30 - RECUPERAÇÃO MÁSSICA DOS CARBOIDRATOS DA FRAÇÃO SOLÚVEL DOS PRÉ-TRATAMENTOS DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR COM 60% (v/v) DE ETANOL EM ÁGUA E ÁCIDO OXÁLICO ASSISTIDO POR CO ₂ SUPERCRÍTICO.....	115
TABELA 31 - SOMA DOS SÓLIDOS TOTAIS SOLÚVEIS E INSOLÚVEIS E DA LIGNINA RECUPERADA DE CADA PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR COM 60% (v/v) DE ETANOL EM ÁGUA E ÁCIDO OXÁLICO ASSISTIDO POR CO ₂ SUPERCRÍTICO.....	116

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- BC_{LEE} - Bagaço de Cana Livre de Extraíveis Etanólicos
- BTU - Unidades Térmicas Britânicas (*British Thermal Unit*)
- CBHs - Exoglucanases ou Celobioidrolases
- CEPESQ - Centro de Pesquisa em Química Aplicada
- CGEE - Centro de Gestão e Estudos Estratégicos
- CO₂ - Dióxido de carbono
- CXL - Líquido expandido com CO₂ (*CO₂-expanded liquids*)
- EGs - Endoglucanases
- EtOH - Etanol
- FPU - Unidades de papel de filtro (*Filter Paper Units*)
- FT-IR - Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (*Fourier-Transform Infrared Spectroscopy*)
- GXL - Líquido expandido com gás (*Gas-expanded liquids*)
- HPLC - Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*)
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- IEA - Agência Internacional de Energia (*International Energy Agency*)
- IEO - Perspectivas Energéticas Internacionais (*International Energy Outlook*)
- HMF - Hidroximetilfurfural
- LIA - Lignina Insolúvel em Ácido
- LSA - Lignina Solúvel em Ácido
- LT - Lignina Total
- NaOH - Hidróxido de sódio
- NIST - Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (*National Institute of Standards and Technology*)
- NREL - Laboratório Nacional de Energia Renovável (*National Renewable Energy Laboratory*)
- scCO₂ - Dióxido de carbono supercrítico
- βG - β-glucosidase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	OBJETIVOS.....	24
1.1.1	Objetivo geral.....	24
1.1.2	Objetivos específicos	24
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	26
2.1	CANA-DE-AÇÚCAR	26
2.1.1	Bagaço de cana-de-açúcar.....	26
2.2	MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS	27
2.3	PRÉ-TRATAMENTO DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS	35
2.3.1	<i>Organosolv</i>	39
2.3.2	Dióxido de carbono supercrítico	42
2.3.3	Líquidos expandidos com gás	44
2.4	COMPOSTOS DERIVADOS DA DEGRADAÇÃO DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS	45
2.5	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.....	47
3	METODOLOGIA.....	50
3.1	PREPARO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR	50
3.1.1	Secagem.....	50
3.1.2	Tamanho médio das partículas.....	50
3.2	ANÁLISE QUÍMICA DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA	51
3.2.1	Determinação de teor de extraíveis	51
3.2.2	Determinação do teor de umidade.....	52
3.2.3	Determinação do teor de cinzas	53
3.2.4	Determinação de carboidratos e lignina.....	53
3.3	PRÉ-TRATAMENTO <i>ORGANOSOLV</i> NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO.....	55
3.4	EXPERIMENTOS REALIZADOS.....	57
3.4.1	Definição do melhor catalisador.....	57
3.4.2	Definição da quantidade de CO ₂	58
3.4.3	Definição do tempo de reação	58
3.4.4	Definição da melhor proporção de etanol em água	58
3.4.5	Planejamento experimental	58

3.5	RECUPERAÇÃO DA LIGNINA APÓS PRÉ-TRATAMENTO	59
3.6	ENSAIOS DE CARACTERIZAÇÃO DO SOBRENADANTE OBTIDO APÓS PRECIPITAÇÃO E RECUPERAÇÃO DA LIGNINA	59
3.7	REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO	60
3.8	ENSAIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	61
3.9	ANÁLISES ESTATÍSTICAS E INCERTEZAS	62
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
4.1	CARACTERIZAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	63
4.1.1	Análise granulométrica	63
4.1.2	Composição química do bagaço de cana-de-açúcar.....	64
4.2	PRÉ-TRATAMENTO <i>ORGANOSOLV</i> NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO.....	68
4.2.1	Definição do melhor catalisador.....	68
4.2.2	Definição da quantidade de CO ₂	78
4.2.3	Definição do tempo de reação	85
4.2.4	Definição da melhor proporção de etanol em água	90
4.3	RECUPERAÇÃO DA LIGNINA.....	96
4.4	AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO	102
4.5	PRÉ-OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO	104
4.6	AVALIAÇÃO DO EFEITO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICO SOBRE O MATERIAL TRATADO	116
5	CONCLUSÃO	120
6	PERSPECTIVAS	122
	REFERÊNCIAS.....	123
	APÊNDICE A - DADOS DE CONTROLES DOS PRÉ-TRATAMENTOS	138
	APÊNDICE B - ESPECTROS NO INFRAVERMELHO DE LIGNINA RECUPERADA DO LICOR DE EXTRAÇÃO CONCENTRADO APÓS PRÉ- TRATAMENTO	146
	APÊNDICE C - PERFIS DE ESPECTROFOTOMETRIA NO UV/VISÍVEL DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS DOS PRÉ-TRATAMENTOS.....	147

1 INTRODUÇÃO

A energia é um fator crítico que controla o desenvolvimento socioeconômico de um país. Segundo as estimativas da *International Energy Outlook* (IEO) (2016), acredita-se que a população mundial atinja 8,5 bilhões em 2030 e 9,7 bilhões em 2050. Isto ocasionará um aumento da demanda da energia mundial de 549 quadrilhões de unidades térmicas britânicas (BTU) em 2012 para 815 quadrilhões de BTU em 2040, ou seja, um aumento de 48% do consumo energético mundial nesse período. Cerca de 80% dos recursos energéticos mundiais são advindos de combustíveis fósseis como petróleo, carvão e gases naturais (RAUD *et al.*, 2019) e apenas 19% vêm de outros recursos naturais como as energias solar, hidrelétrica, eólica e de biomassa (KUMAR *et al.*, 2020). Por outro lado, a utilização excessiva de combustíveis fósseis tem resultado em sérias preocupações ambientais incluindo as denominadas mudanças climáticas (ISLAM *et al.*, 2020). Conforme Mercure *et al.* (2018), a relação entre o consumo de combustíveis fósseis e o aumento da temperatura atmosférica ou aquecimento global tem sido amplamente comprovada. Além disso, existem várias outras limitações associadas ao consumo de derivados fósseis, como o fato de as maiores reservas estarem localizadas em regiões politicamente instáveis que motivam constantes oscilações no mercado internacional, comprometendo assim a perspectiva de que combustíveis fósseis possam atender demandas energéticas futuras (ASOMANING *et al.*, 2018).

A disponibilidade de recursos fósseis a baixos custos está em declínio, portanto, é essencial encontrar soluções que reduzam pelo menos em parte o seu consumo. Uma abordagem prospectiva é a conversão gradual de grande parte da economia global em um novo setor econômico, conhecido como bioeconomia, organizado em torno de atividades industriais que se complementam e competem pelo acesso à biomassa como matéria-prima, tendo a economia circular como seu principal pilar. Essa iniciativa tem por objetivo suprir bens de consumo a partir de recursos renováveis, na forma de bioenergia, biocombustíveis, biomateriais e insumos químicos de plataforma (KAMM *et al.*, 2006; MOHAN *et al.*, 2016).

A partir do conceito de economia circular encontram-se projetos sustentáveis de biorrefinaria, que integram processos e equipamentos associados à conversão de biomassa (CHANDEL *et al.*, 2018). Esta indústria não apenas agrega valor à biomassa utilizada, como também abranda os fluxos de resíduos gerados

(AGHBASHLO *et al.*, 2018), operando em um sistema integrado onde o resíduo de uma linha de processamento passa a ser matéria-prima para outros processos, proporcionando o aproveitamento integral da biomassa (CHERUBINI, 2010).

O conceito de biorrefinaria imita a refinaria de petróleo e tem como objetivo a produção simultânea de vários produtos, como biocombustíveis, insumos químicos, vapor e eletricidade, por meio da integração de diferentes tecnologias de conversão de biomassa (RUIZ *et al.*, 2013).

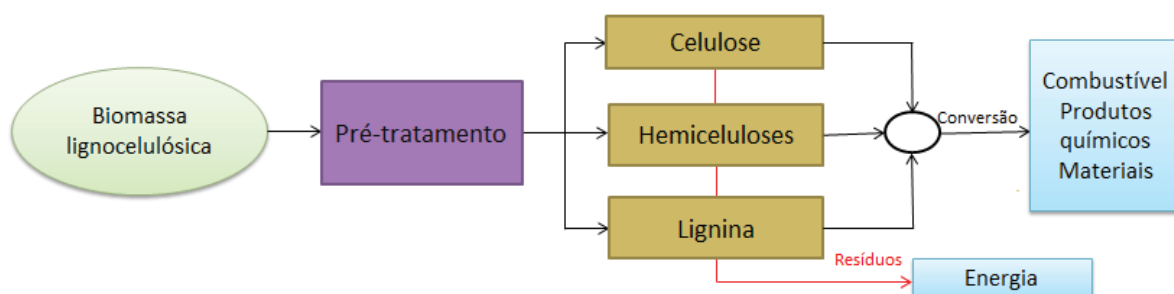
A Agência Internacional de Energia (IEA) classifica as biorrefinarias de acordo com a plataforma, seus produtos, a matéria-prima e os processos envolvidos. As plataformas (carboidratos, *syngas* e biogás) são estruturas organizadas que conectam diferentes sistemas de biorrefinaria e seus processos. O número de plataformas envolvidas é uma indicação da complexidade do sistema. Existem dois tipos de produtos obtidos em uma biorrefinaria: energia (bioeletricidade, etanol, biodiesel e biocombustíveis sintéticos) e produtos (produtos químicos, fertilizantes, materiais, produtos alimentícios e ração animal). As matérias-primas empregadas em uma biorrefinaria foram classificadas por Saha *et al.* (2019) em de primeira, segunda, terceira e quarta gerações. A primeira geração se refere a culturas destinadas à indústria alimentícia como materiais sacarínicos e amiláceos, enquanto as de segunda geração correspondem a matérias-primas que não têm potencial para comprometer a segurança alimentar, como é o caso dos materiais lignocelulósicos. A terceira está relacionada fundamentalmente ao cultivo de microalgas e leveduras, e a quarta geração é resultado de desenvolvimentos em biologia vegetal e biotecnologia (engenharia metabólica) com organismos autotróficos, capazes de capturar carbono atmosférico (SAHA *et al.*, 2019).

Os principais processos de conversão da biomassa podem ser classificados em físicos ou mecânicos (moagem e irradiação), químicos (hidrólise ácida e alcalina, conversão catalítica e processos de extração por solventes), bioquímicos (hidrólise enzimática e fermentação) e termoquímicos (gaseificação e pirólise) (IEA, 2009). Tendo em vista todas essas possibilidades, diversas classificações de biorrefinaria são possíveis. Segundo Ree e Annevelink (2007), existem sete tipos de biorrefinarias: (1) biorrefinarias convencionais, (2) biorrefinarias verdes, (3) biorrefinarias de culturas inteiras, (4) biorrefinarias de material lignocelulósico, (5) biorrefinarias de duas plataformas, (6) biorrefinarias termoquímicas e (7)

biorrefinarias aquáticas.

A biorrefinaria de material lignocelulósico se baseia no fracionamento da biomassa para a produção de correntes intermediárias de celulose, hemiceluloses e lignina, que posteriormente serão processadas por diversas rotas para obtenção de diferentes produtos (FERNANDO *et al.*, 2006.), conforme a FIGURA 1.

FIGURA 1 - ESQUEMA SIMPLIFICADO DE UMA BIORREFINARIA LIGNOCELULÓSICA.



FONTE: A autora (2021).

As matérias-primas lignocelulósicas são representadas predominantemente por palhas de milho, trigo, arroz e cevada, talos de sorgo, cascas de coco e arroz, bagaços de laranja e cana-de-açúcar, aparas e serragem de madeira, dentre outros, sendo estas originadas de diferentes partes das plantas, como folhas, ramos, cascas, colmos, caules e tronco. Estes resíduos, de origem agrícola, agroindustrial, agroflorestal e urbana, não competem com a produção de alimentos, sendo, portanto, abundantes e disponíveis a baixo custo para a produção de bens de consumo (BHOWMICK *et al.*, 2017; DONG *et al.*, 2019).

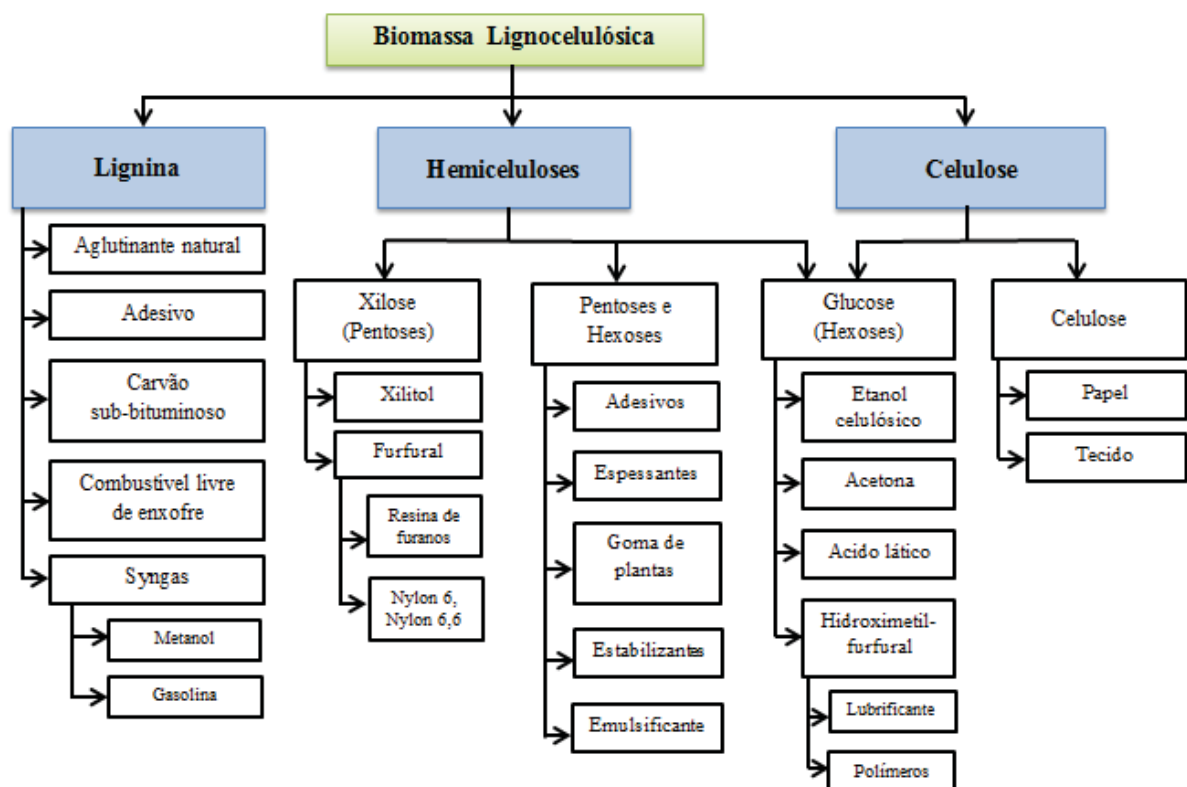
A biomassa lignocelulósica é formada principalmente de componentes macromoleculares como celulose (35 a 50%), hemiceluloses (20 a 35%) e lignina (5 a 30%), que estão presentes na parede celular das plantas. A diferença significativa que existe na composição química dessa matéria-prima em relação ao porte, espécie e parte da planta dificulta e encarece os processos de conversão para o seu aproveitamento (ISLAM *et al.*, 2020).

A conversão de biomassa lignocelulósica inclui uma série de processos unitários, como preparo da matéria-prima, pré-tratamento, hidrólise ácida ou enzimática, fermentação e separação do produto, sendo que os critérios a serem

estabelecidos no projeto estão intimamente relacionados ao tipo de biomassa empregada no processo e à gama de produtos que se deseja produzir (DONG *et al.*, 2019).

Para maximizar os rendimentos de produtos de maior valor agregado, a parede celular da planta precisa ser fracionada por algum tipo de pré-tratamento, que é considerado como a primeira etapa da biorrefinaria (MESA *et al.*, 2016). O pré-tratamento visa o aumento da acessibilidade dos carboidratos à conversão mediante profundas modificações na estrutura da parede celular. Carboidratos e lignina são então convertidos nos produtos desejados por meio de diferentes procedimentos catalíticos (WANG *et al.*, 2019). A FIGURA 2 apresenta alguns produtos oriundos do fracionamento da biomassa lignocelulósica.

FIGURA 2 - ALGUNS PRODUTOS POTENCIAIS OBTIDOS NA BIORREFINARIA DE MATERIAL LIGNOCELULÓSICO PROCESSADOS POR DIFERENTES ROTAS.



FONTE: Adaptado de KAMM *et al.* (2006).

Uma abordagem promissora de pré-tratamento de biomassa lignocelulósica é oferecida pelo processo *organosolv*, que consiste no fracionamento da biomassa

utilizando uma mistura de solventes orgânicos em elevadas temperaturas, na ausência ou na presença de água (ZHAO *et al.*, 2009). A técnica baseia-se no fato da lignina poder ser solubilizada em vários solventes orgânicos, como etanol, podendo então ser recuperada e utilizada para vários propósitos, como na produção de materiais, combustíveis líquidos e bioenergia ou bioeletricidade (MESA *et al.*, 2016). Este processo atrai muito interesse dentre os outros tipos de pré-tratamento, pois produz uma lignina pouco condensada e isenta de contaminantes como o enxofre. O enxofre na lignina é difícil de ser removido e restringe a sua utilização em aplicações como a síntese de polímeros (WILD *et al.*, 2015).

A eficiência do pré-tratamento *organosolv* pode ser aprimorada com adição de CO₂ supercrítico (scCO₂), pois os solventes orgânicos têm a capacidade de dissolver grandes quantidades de CO₂, expandindo-se e alterando suas propriedades, promovendo o aumento de sua difusividade e a diminuição de sua viscosidade e tensão superficial (ESCOBAR *et al.*, 2020). Este trabalho tem como objetivo estudar um processo *organosolv* combinado com scCO₂, visando aprimorar a deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar. O fracionamento da biomassa lignocelulósica foi realizado empregando etanol em água e na presença ou ausência de catalisadores ácidos em diferentes condições experimentais.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Desenvolver uma técnica de pré-tratamento baseada no processo *organosolv* assistido por scCO₂, empregando etanol aquoso na ausência ou na presença de catalisadores ácidos, com o objetivo de desconstruir a parede celular do bagaço de cana-de-açúcar e promover altos níveis de deslignificação, aumentando a acessibilidade de seus polissacarídeos à hidrólise enzimática.

1.1.2 Objetivos específicos

- Caracterizar o bagaço de cana-de-açúcar antes e depois da remoção de seus componentes de baixa massa molar com etanol 95%;
- Identificar o melhor sistema catalisador, quantidade de CO₂, tempo e

concentração de etanol em água que proporcione maior deslignificação e menor perda de celulose em condições fixas de temperatura;

- Baseado nas condições de melhor desempenho, avaliar o pré-tratamento empregado em diferentes condições de operação, tendo como variáveis de processo a temperatura, a concentração do catalisador e tempo de reação;
- Recuperar a lignina do licor de extração e determinar o seu rendimento;
- Investigar a suscetibilidade à hidrólise enzimática do substrato celulósico pré-tratado na condição que proporcionar os melhores rendimentos de recuperação de glucanas e de deslignificação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CANA-DE-AÇÚCAR

A cana-de-açúcar (gênero *Saccharum* sp.) é uma gramínea perene que pertence à mesma família do trigo, do milho, e da aveia, sendo a principal finalidade do seu cultivo a obtenção de sacarose para a produção de açúcar, aguardente e etanol (IBGE, 2017). Trata-se de uma das principais culturas do mundo, cultivada em mais de 100 países, cujo maior produtor mundial é o Brasil com destaque à região Sudeste, que detém mais de 60% de toda a área plantada no país (52% somente no estado de São Paulo), seguida pela região Nordeste, com 21% dessa área. A produtividade média nessas duas regiões é de 78 e 55 t/ha, respectivamente (PROCÓPIO *et al.*, 2015).

2.1.1 Bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço é o resíduo da extração do caldo de cana-de-açúcar para a produção de açúcar e etanol. As quantidades de bagaço produzidas variam de 240 kg a 280 kg por tonelada de cana moída, com umidade aproximada de 50%. A maior parte desse resíduo é consumida nas próprias usinas de açúcar e álcool para fornecimento de energia (HOFSETZ e SILVA, 2012).

Algumas usinas sucroalcooleiras do Brasil são autossuficientes em energia elétrica. Dependendo da capacidade destas usinas, elas conseguem gerar energia excedente para ser vendida à rede e assim incrementar os lucros. Além de gerar energia elétrica, o bagaço geralmente pode ser utilizado para a produção de ração animal e adubo. Com isso, as usinas do setor sucroenergético reduzem os seus custos de produção e o impacto ambiental de suas atividades (CARPIO e SOUZA, 2017).

O bagaço de cana-de-açúcar, enquanto exemplo de biomassa lignocelulósica, é constituído principalmente por glucanas (celulose), hemiceluloses, lignina, extraíveis, substâncias inorgânicas e água, além de outros compostos minoritários (AMERAM *et al.*, 2019). É também um material bastante heterogêneo em relação a sua morfologia e tamanho de partículas. A fração inorgânica é parcialmente decorrente de impurezas minerais arrastadas da colheita mecanizada e do

processamento da cana-de-açúcar. Assim, além das cinzas constitutivas da planta, resíduos de óxidos ferrosos e titânia já foram detectados na sua composição, provavelmente em decorrência do desgaste dos equipamentos de moagem e extração (SZCZERBOWSKI *et al.*, 2014). A composição do bagaço varia de acordo com as metodologias agrícolas e agroindustriais aplicadas, como fatores genéticos, tipo de solo, condições de cultivo e as tecnologias de colheita, armazenamento, limpeza e extração do caldo de cana na indústria (CGEE, 2009).

2.2 MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

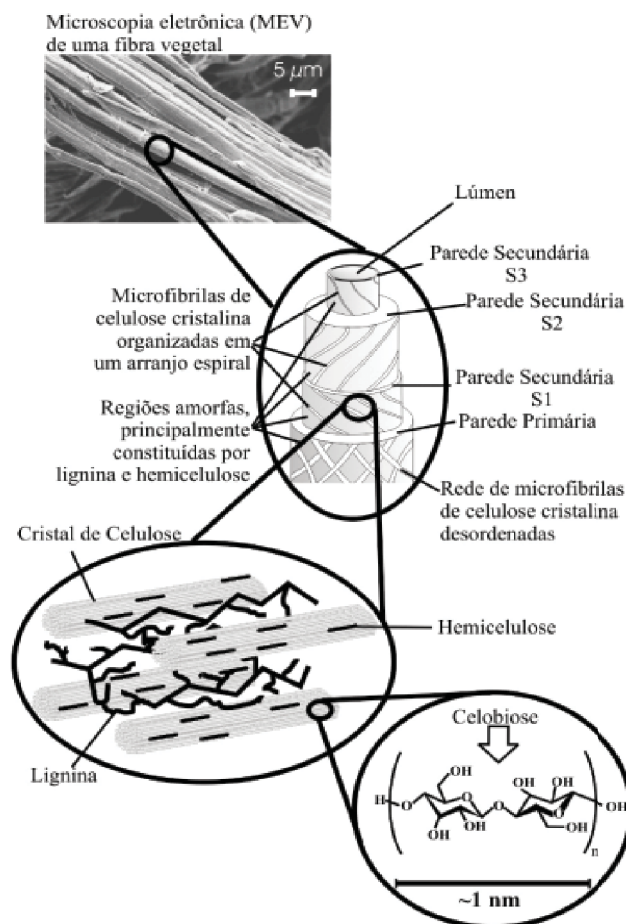
Materiais lignocelulósicos são constituídos majoritariamente por componentes macromoleculares (celulose, hemiceluloses e lignina) e, em minoria, por pectinas, ceras, cinzas, proteínas e entre outros componentes de baixa massa molar (BURUIANA *et al.*, 2014; MCMILLAN, 1994). A organização desses componentes na parede celular forma uma matriz complexa de difícil acesso para o ataque químico ou enzimático. Além disso, a caracterização da composição química da biomassa também é dificultada, pois seus componentes macromoleculares se encontram intimamente associados, exigindo para isso a utilização de mais de um tipo de metodologia analítica (RAMOS, 2003).

A celulose, as hemiceluloses e lignina têm distribuições diferenciadas entre as camadas da parede celular, que são divididas em três: lamela média, parede primária e parede secundária (FIGURA 3). Nas fibras de madeira, a concentração de celulose aumenta da lamela média para a parede secundária, sendo as regiões S2 (camada intermediária) e S3 (camada interna) as que a apresentam em maiores concentrações (AGARWAL, 2006). Segundo McMillan (1994), as hemiceluloses têm sua distribuição parecida com a celulose, concentrando-se na parede secundária. Já a lignina se encontra principalmente na parede secundária, apesar de estar presente em maior concentração na lamela média.

A lamela média corresponde à região de intersecção entre as células e é rica em substâncias pécticas (PEITAK *et al.*, 2007). A parede primária contorna a parede secundária e é a primeira a ser depositada durante o crescimento das células (CARPITA e GIBEAUT, 1993). A parede secundária é constituída por três camadas, S1, S2 e S3. A camada intermediária (S2), que determina as propriedades

mecânicas da fibra, consiste de uma série de microfibrilas de celulose em disposição helicoidal, resultantes do empacotamento de 30 a 100 cadeias de celulose organizadas no sentido da fibra. As microfibrilas de celulose são mantidas unidas por uma matriz de hemiceluloses e lignina que envolve uma rede de ligações de hidrogênio e ligações covalentes (SILVA *et al.*, 2009).

FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DE UMA FIBRA VEGETAL.



FONTE: SILVA *et al.* (2009).

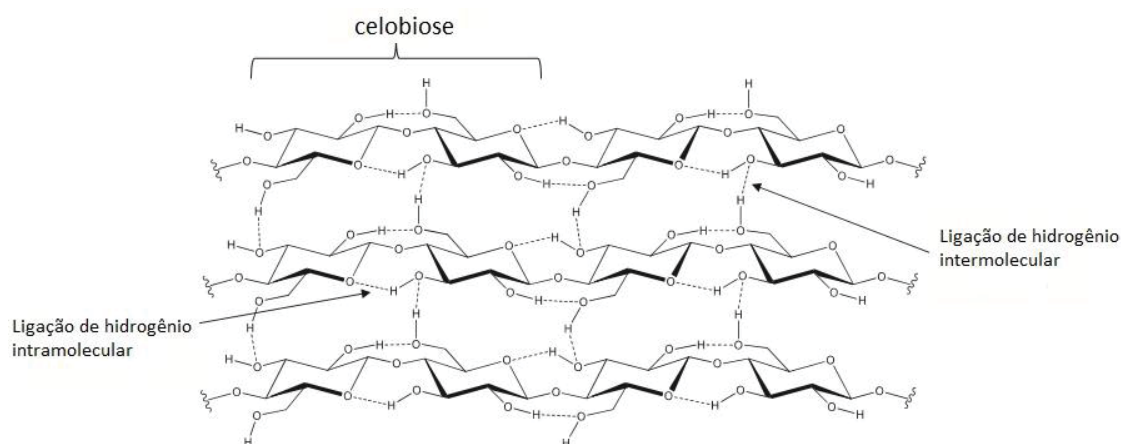
A formação do tecido vascular e a deposição de microfibrilas de celulose dentro da parede celular secundária são resultados da evolução das plantas terrestres, que têm como benefícios a sustentação do crescimento vertical e o transporte de água e micronutrientes absorvidos pela raiz. Como consequência da evolução das plantas, as paredes celulares foram ficando cada vez mais recalcitrantes para atuar como barreira a ataques químicos ou biológicos que, por

consequência, dificulta os processos de conversão de materiais lignocelulósicos em biocombustíveis e bioprodutos (LIU *et al.*, 2019).

A celulose é o biopolímero mais abundante na natureza, pois constitui cerca de 40% a 50% da parede celular de plantas superiores. Normalmente, a celulose se encontra na madeira, folhas e caules das plantas. Embora a celulose esteja principalmente presente em vegetais, alguns organismos também são capazes de produzi-la, como bactérias, fungos e algas. A separação de celulose a partir de matérias-primas celulósicas requer duas etapas: (1) o pré-tratamento de matéria-prima e (2) a separação do material bruto pré-tratado das microfibras de celulose usando tratamentos mecânicos, solventes específicos e hidrólise ácida ou enzimática (PENG *et al.*, 2020).

A celulose é um homopolissacarídeo formado por resíduos de anidro-D-glucopiranoose unidos por ligações glicosídicas do tipo β (1 $\rightarrow$ 4). Sua fórmula geral corresponde a $(C_6H_{10}O_6)_n$, onde n é o número de repetições das unidades de anidroglicose que varia de acordo com a fonte e o método de isolamento da celulose (GALIWANGO *et al.*, 2019). Além disso, para cada cadeia de celulose existe um terminal redutor e um terminal não redutor. O terminal não redutor contém um grupamento hidroxila em C4 e o terminal redutor apresenta um carbono hemiacetalico em C1, também conhecido como carbono anomérico (FRENCH, 2018). A orientação equatorial das hidroxilas anoméricas de anéis piranosídicos em conformação ${}^4C_1$ e as fortes interações intra e intermoleculares envolvendo o oxigênio hemiacetalico e as hidroxilas presentes nos carbonos C2, C3 e C6 (FIGURA 4) resulta em uma estrutura supramolecular estabilizada, onde as cadeias de celulose assumem uma orientação linear cuja unidade conformacional é a celobiose, enquanto que a glucose representa a sua unidade estrutural básica (FENGEL e WEGNER, 1989; BHAT *et al.*, 2019). Pacotes de cadeias de celulose são agregados na forma de fibrilas elementares, nas quais existem regiões altamente ordenadas (cristalinas), que se alternam com as regiões menos ordenadas ou amorfas. A proporção entre as regiões cristalinas e amorfas variam consideravelmente, dependendo da origem da amostra. Como consequência da sua estrutura supramolecular, a celulose possui uma alta resistência à tração e é insolúvel na maioria dos solventes, tornando-se assim um polímero natural de difícil conversão (SJÖSTRÖM, 1993).

FIGURA 4 - LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO INTRA E INTERMOLECULAR DA ESTRUTURA SUPRAMOLECULAR DA CELULOSE.



FONTE: Adaptado de Escobar *et al.* (2020).

As regiões cristalinas da celulose correspondem às áreas de maior organização molecular em relação ao arranjo de interações por ligação de hidrogênio. Já as regiões amorfas correspondem às áreas onde as cadeias estão mais distanciadas e mais acessíveis para interação com outras moléculas como a água. Produtos químicos também podem facilmente penetrar nas regiões amorfas, promovendo o seu inchamento e tornando-as mais suscetíveis a reações químicas como a hidrólise (BHAT *et al.*, 2019).

As hemiceluloses são polissacarídeos heterogêneos presentes na parede celular das plantas. São materiais hidrofílicos que possuem um grau de polimerização entre 80 a 200, sendo que a celulose pode chegar a 10.000 (CHANDEL *et al.*, 2012). As hemiceluloses também exibem menor estabilidade térmica e química, o que lhes confere maior solubilidade e maior susceptibilidade à hidrólise do que a celulose (AJAO *et al.*, 2018).

As hemiceluloses são constituídas por polissacarídeos ramificados cujas cadeias encontram-se ligadas às regiões cristalinas da celulose por ligações de hidrogênio e por forças de van der Waals (COLLARD e BLIN, 2014). Além da celulose, as hemiceluloses estão ligadas a outros componentes da parede celular, como lignina e compostos fenólicos (por exemplo, ácido ferúlico e ácido cinâmico) por ligações covalentes e de hidrogênio (PENG *et al.*, 2012; KIM, J. Y. *et al.*, 2019). Estes heteropolissacarídeos podem ser formados por um ou por vários tipos de

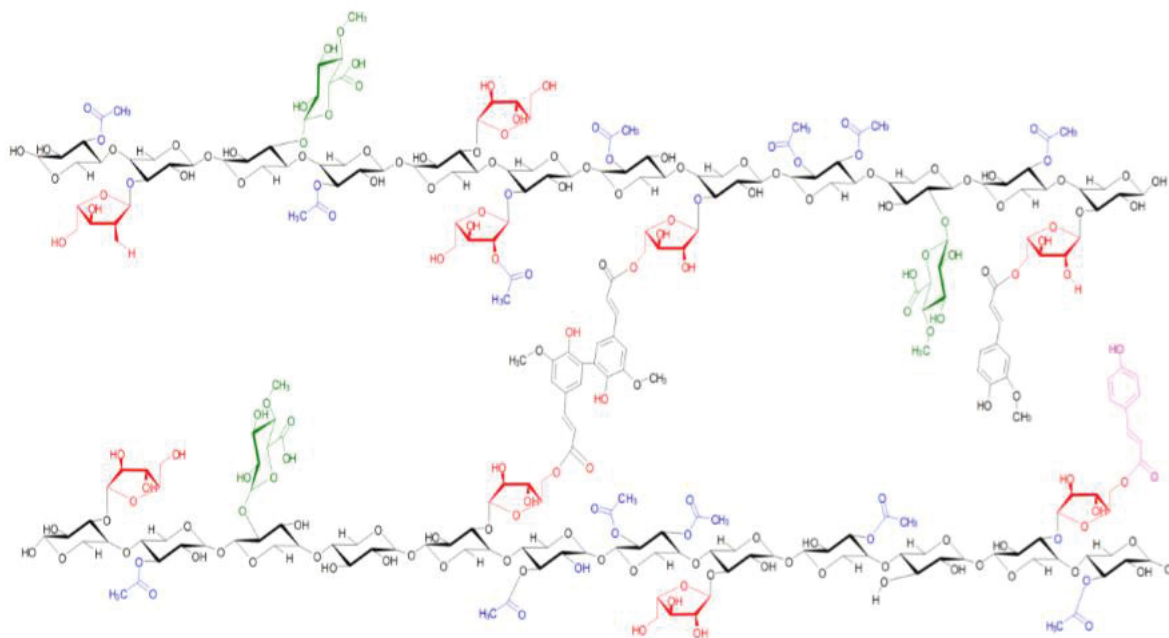
monossacarídeos, que podem ser divididos em hexoses (D-glucose, D-manose e D-galactose), pentoses (D-xilose e L-arabinose) e ácidos urônicos (ácidos D-glucurônico e 4-O-metil-D-glucurônico) e grupos acetila (KUHAD *et al.*, 2011).

As hemiceluloses mais relevantes são as glucomananas e as xilanas, sendo que as últimas são as mais abundantes. Em gramíneas há o predomínio de arabinoglucuronoxilanas, mas também podem ser encontradas xiloglucanas e glucuronoarabinoxilanas (GÍRIO *et al.*, 2010). A FIGURA 5 apresenta um modelo de hemiceluloses encontrada em gramíneas (arabino-O-metilglucuronoxilana), onde a cadeia principal é formada por resíduos de anidro-D-xilopiranoose unidos entre si por ligações glicosídicas do tipo $\beta(1\rightarrow4)$, que podem ser acetilados e/ou parcialmente substituídos por resíduos α -L-arabinofuranosil e α -D-4-O-metilglucuronopiranosil. As cadeias de arabino-O-metilglucuronoxilana podem estar ligadas entre si por meio de ligações covalentes com unidades de ácido ferúlico, formando as chamadas pontes di-ferúlicas (SILVEIRA, 2014).

As hemiceluloses e a lignina, juntas, compreendem 40 a 70% da biomassa vegetal em relação a sua massa seca. Ambos os polímeros são depositados durante a formação da parede celular e conferem às plantas propriedades como resistência mecânica, flexibilidade e recalcitrância à hidrólise enzimática. Devido a essas propriedades, hemiceluloses e lignina podem ser adaptadas como matérias-primas para diferentes produtos, úteis em diversas áreas como as de construção civil, materiais funcionais, alimentos e de intermediários químicos (TERRET e DUPREE, 2019).

A lignina atua principalmente como um componente estrutural da parede celular das plantas que lhes fornece resistência e rigidez, mas também permite o transporte de água e solutos através de sistemas vasculares e fornece barreiras físicas contra a invasão por fitopatógenos. A lignina é mais resistente à maioria das formas de ataque do que a celulose e outros polissacarídeos estruturais da parede celular das plantas (FIGUEIREDO *et al.*, 2018). Esse biopolímero constitui de 15 a 40% da massa seca de vegetais superiores e pode ser encontrado em todas as plantas vasculares. Enquanto a celulose e as hemiceluloses são hidrofílicas, a lignina apresenta comportamento majoritariamente hidrofóbico (GHAFFAR e FAN, 2013).

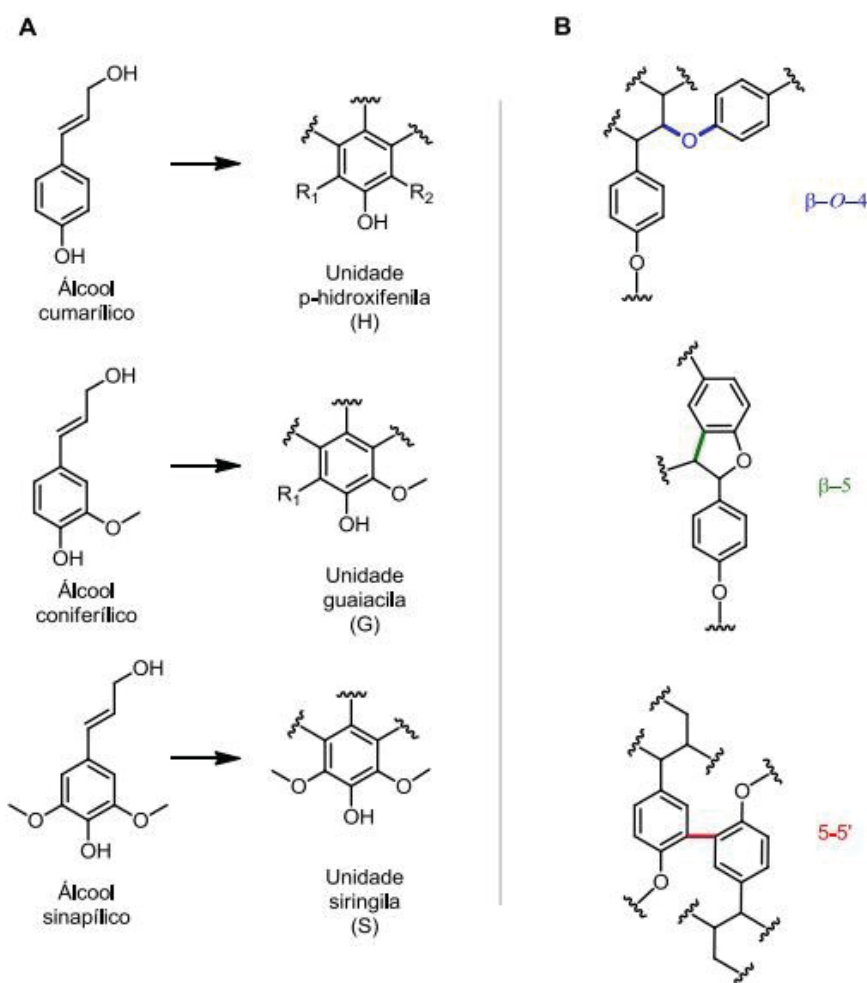
FIGURA 5 - MODELO DE HEMICELULOSES ENCONTRADAS EM GRAMÍNEAS: RESÍDUOS DE ANIDRO-D-XILOPIRANOSE (PRETO); RESÍDUOS DE O-ACETIL (AZUL); RESÍDUOS DE ARABINOFURANOSIL (VERMELHO); RESÍDUOS DE 4-O-METILGLUCURONIL (VERDE); PONTE DIFERÚLICA (CENTRO).



FONTE: SILVEIRA (2014).

A lignina é uma macromolécula complexa, amorfa e tridimensional. Trata-se de um poliéter aromático irregular e aleatoriamente reticulado, composto por três monômeros primários ou monolignóis, p-hidroxifenila (H), guaiacila (G) e siringila (S), que derivam de álcoois p-hidroxicinâmicos com diferentes graus de metoxilação, sendo eles os álcoois cumarílico (não metoxilado), coniferílico (monometoxilado) e sinapílico (dimetoxilado), respectivamente (VANHOLME *et al.*, 2019) (FIGURA 6A). Dependendo do tipo de planta, o teor de lignina e a sua composição podem variar substancialmente. Madeiras macias possuem o maior teor em lignina e sua composição é principalmente formada pelo álcool coniferílico (lignina tipo G), enquanto a lignina de madeira dura contém os álcoois coniferílico e sinapílico (lignina do tipo GS). Já a lignina de gramíneas e plantas herbáceas contém unidades de álcoois coniferílico, sinapílico e cumarílico (lignina do tipo GSH) em diferentes proporções (BECKER e WITTMANN, 2019).

FIGURA 6 - OS PRECURSORES DA LIGNINA (A) E AS LIGAÇÕES ENTRE AS UNIDADES DE FENILPROPANO (B).

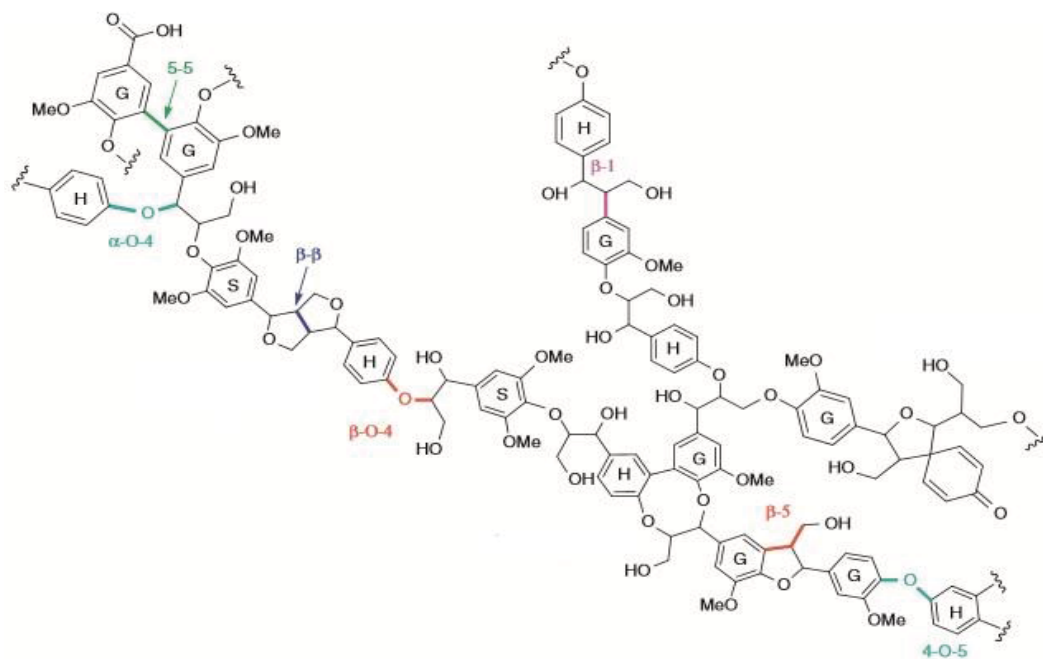


FONTE: CHIARELLO, 2017.

A biossíntese da lignina acontece a partir da desidrogenação enzimática dos álcoois cumarílico, coniferílico e sinapílico formando radicais passíveis de deslocalização eletrônica com possibilidades ilimitadas de combinação. Esses radicais se unem entre si e formam a sua estrutura macromolecular (PONNUSAMY *et al.*, 2019). As ligações predominantes na lignina são do tipo β -O-4', que correspondem a aproximadamente 40-60%, enquanto as ligações do tipo β -5' e 5-5' representam juntas cerca de 20% (FIGURA 6B) (GHAFAR e FAN, 2013). Outros tipos de ligações também podem ser encontrados na estrutura da lignina, como as ligações éter do tipo α -O-4' que envolvem cadeias alifáticas e anéis aromáticos e as ligações carbono-carbono que ocorrem entre as cadeias alifáticas C3 (β - β' , α - α' , α - β'), entre as cadeias alifáticas e os anéis aromáticos (β -5', β -1', α -1', β -6') e entre

carbonos aromáticos (5-5') (ARNI, 2018; RALPH *et al.*, 2019). A FIGURA 7 representa um modelo estrutural de um fragmento de lignina.

FIGURA 7 - EXEMPLO DE UMA ESTRUTURA DE LIGNINA COM AS LIGAÇÕES 5-5', β - β ', β -O-4', α -O-4', β -5', β -1' e 4-O-5'.



FONTE: Joffres *et al.* (2013).

A pesquisa sobre lignina aumentou significativamente devido a sua renovabilidade, disponibilidade, inércia química e por ser o ponto de partida para a obtenção de produtos de valor agregado, capazes de substituir produtos de origem tradicionalmente petroquímica (ESPINOZA-ACOSTA *et al.*, 2018). No entanto, sua conversão é dificultada pela complexidade de sua estrutura molecular. Diferentes métodos já foram desenvolvidos para a extração de lignina e esses resultam em produtos de diferentes propriedades e aplicações (FIGUEIREDO *et al.*, 2018). Por isso, a lignina oferece uma plataforma notável de valorização da biomassa lignocelulósica e promoção das biorrefinarias. A lignina pode ser uma fonte potencial de várias substâncias, como compostos aromáticos, agente de reforço ou carga para mistura de polímeros. A oxidação da lignina sob diferentes condições produz ácidos alifáticos, ácidos e aldeídos aromáticos e quinonas, dentre outros. A lignina também pode ser convertida em hidrocarbonetos aromáticos como benzeno, tolueno e xileno, além de fenóis ou polióis substituídos (PONNUSAMY *et al.*, 2019). Além disso, há

um grande interesse na exploração deste biopolímero como dispositivo para o armazenamento de energia, em pseudo-capacitores eletroquímicos, e para alimentar diferentes tipos de célula a combustível (WANG *et al.*, 2019). Derivados da lignina podem ainda apresentar propriedades antioxidantes, atividades antifúngica e antimicrobiana (FIGUEIREDO *et al.*, 2018).

Os componentes de baixa massa molar da parede celular de plantas superiores são divididos em substâncias inorgânicas e orgânicas (FENGEL e WEGNER, 1989). As cinzas são compostas por materiais inorgânicos que possuem funções específicas no metabolismo das plantas. Biomassas como o bagaço de cana-de-açúcar ainda apresentam quantidades variáveis de sílica, que é absorvida do solo pelas raízes. As cinzas obtidas por combustão da biomassa podem ser incorporadas na construção de estradas e materiais cimentantes, e aplicadas no solo como fertilizante para a correção do pH (CRUZ *et al.*, 2019).

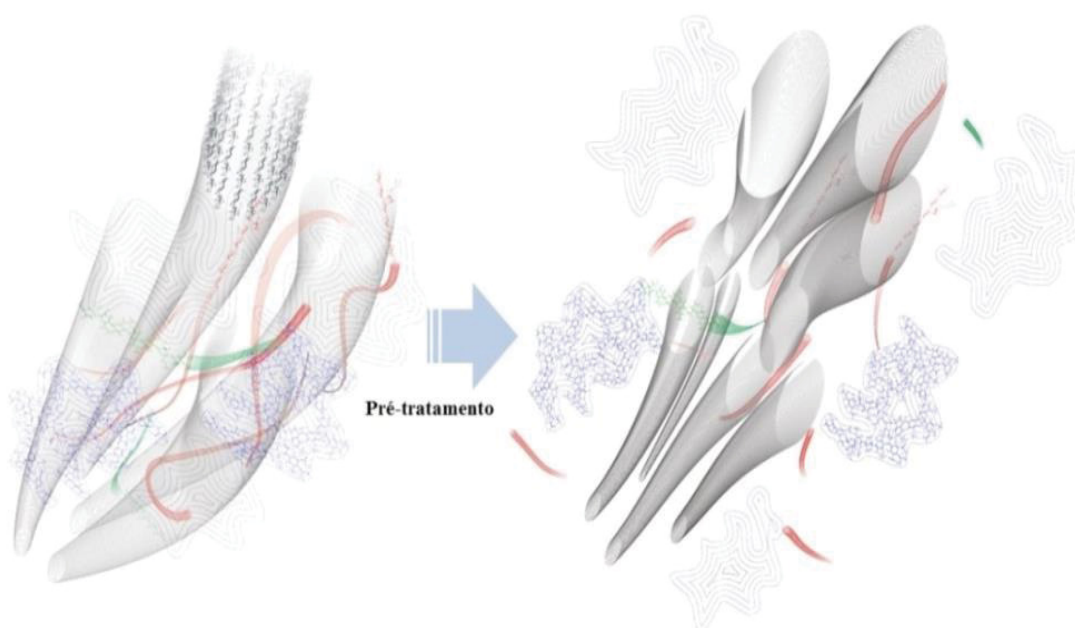
Os extrativos são moléculas orgânicas não estruturais de baixa massa molar que, embora minoritários, estão presentes em quantidades variáveis nas plantas. Estes compostos podem ser removidos por solventes e assim classificados em dois grupos: (1) compostos alifáticos e alicíclicos (terpenos, ácidos resinosos e esteróides, ésteres de ácidos graxos, ácidos graxos e álcoois, alcanos) e (2) compostos fenólicos (fenóis simples, estilbenos, lignanas, isoflavonas, taninos condensados, flavonóides e taninos hidrolisáveis). A composição dos extrativos nas plantas depende da espécie, da origem geográfica e das condições de crescimento e cultivo. Em madeiras, a maior parte dos extrativos está localizada no cerne, que é responsável pela sua cor, odor e durabilidade (VALETTE *et al.*, 2017).

2.3 PRÉ-TRATAMENTO DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

O pré-tratamento é um processo importante para alterar a estrutura da biomassa lignocelulósica (FIGURA 8) e tornar os polissacarídeos mais disponíveis à bioconversão por processos como a hidrólise enzimática (MOSIER *et al.*, 2005). Dependendo da sua natureza química, o pré-tratamento pode promover a remoção da lignina e das hemiceluloses, aumentar a porosidade da biomassa e reduzir a cristalinidade da celulose, melhorando a sua acessibilidade química e enzimática (BENJAMIN e GÖRGENS, 2014).

Para ser eficiente, o pré-tratamento deve (1) evitar perdas mássicas pela degradação de carboidratos, (2) evitar a formação de inibidores de hidrólise e fermentação, (3) permitir a recuperação de componentes como a lignina em boa qualidade e alto rendimento e (4) ser ambiental e economicamente viável (SUN e CHENG, 2002). Além disso, o pré-tratamento deve ser realizado em condições operacionais de baixo risco (PULIGUNDLA *et al.*, 2016).

FIGURA 8 - SEPARAÇÃO DOS COMPONENTES MACROMOLECULARES DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA POR PRÉ-TRATAMENTO (FIBRAS DE CELULOSE EM PRETO, HEMICELULOSE EM VERMELHO, LIGNINA EM AZUL E PECTINAS EM VERDES).



FONTE: Adaptado de Silveira *et al.* (2015a).

Diversas técnicas de pré-tratamento já foram descritas na literatura para o aproveitamento de materiais lignocelulósicos. Essas técnicas podem ser classificadas em processos biológicos, físicos e químicos, ou na combinação desses conforme a TABELA 1 (SILVEIRA *et al.*, 2015a). Dentre estes, destacam-se a hidrólise ácida (QIN *et al.*, 2012; QIAO *et al.*, 2019), a hidrólise ou extração alcalina (BURATTI *et al.*, 2018; CHANG *et al.*, 2018), a explosão a vapor (LIU *et al.*, 2013; RAMOS *et al.*, 2015) e os processos *organosolv* (RUIZ *et al.*, 2018; ROMANÍ *et al.*, 2019).

TABELA 1 - PRINCIPAIS TÉCNICAS DE PRÉ-TRATAMENTO DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA.

	Processo	Descrição	Referência
BIOLÓGICO	Bactérias Fungos Enzimas	Biodegradação eficaz da biomassa lignocelulósica para melhorar a sua eficiência de hidrólise. Os fungos podres brancos são os mais usados, pois degradam a lignina, consomem menos energia e causam menos danos ao meio ambiente	Sindhu <i>et al.</i> , 2016
	Moagem	Diminuição do tamanho da partícula e aumento da área superficial, expondo a estrutura lignocelulósica a reagentes em outras etapas do tratamento	Kucharska <i>et al.</i> , 2018.
FÍSICO	Microondas	Intensificação de processo para o aumento da área de superfície acessível à hidrólise enzimática	Puligundla <i>et al.</i> , 2016.
	Ultrassom	Modificação da estrutura lignocelulósica através do processo de cavitação (eficaz na remoção da lignina)	Bussemaker <i>et al.</i> , 2013.
QUÍMICO	Hidrólise ácida	A fração de hemiceluloses da biomassa é parcialmente hidrolisada e parte da lignina é solubilizada, causando um aumento da acessibilidade da celulose	Jiang <i>et al.</i> , 2013.
	Hidrólise alcalina	Redução da cristalinidade da celulose, extração da lignina, desacetilação e hidrólise do ácido urônico presente nas hemiceluloses	Kumar <i>et al.</i> , 2009.
	Líquido iônico	Agentes deslignificantes que estabelecem fortes interações intermoleculares com a matriz, podendo também atuar sobre a celulose	Silveira <i>et al.</i> , 2015b.
	CO ₂ supercrítico	Hidrólise ácida parcial de hemiceluloses, com redução da cristalinidade da celulose e aumento de sua acessibilidade à hidrólise enzimática	Serna <i>et al.</i> 2016.
COMBINAÇÃO	Explosão a vapor	Desconstrução da estrutura da parede celular pela hidrólise ácida de hemiceluloses e modificação e redistribuição de lignina. Pode ser realizada na ausência ou na presença de catalisadores ácidos ou básicos	Agbor <i>et al.</i> , 2011.
	Organosolv	Extração seletiva da lignina, sendo que o uso de catalisadores ácidos pode melhorar o processo de deslignificação	Zhao <i>et al.</i> , 2009.
	AFEX (<i>Ammonia fibre expansion</i>)	Rompimento físico de fibras de biomassa com descristalização de celulose, convertendo-a em celulose III; remoção parcial de hemiceluloses com potencial para modificar quimicamente a lignina	Silveira <i>et al.</i> , 2015a.
	Hidrotermólise Extração com água a quente	Hidrólise ácida parcial das hemiceluloses, que são recuperadas como oligossacarídeos hidrossolúveis; também promove a fragmentação e a redistribuição parcial da lignina	Zhuang <i>et al.</i> , 2016.

FONTE: Adaptado de Ramos *et al* (2019).

Os pré-tratamentos com ácido são normalmente usados para hidrolisar a fração hemicelulósica e aumentar a porosidade da biomassa, melhorando a sua suscetibilidade à hidrólise enzimática. A lignina dificilmente se dissolve no pré-tratamento com ácido, mas é clivada, levando a um aumento da suscetibilidade da celulose às enzimas (JIANG *et al.*, 2013). A literatura relata o uso de vários ácidos em pré-tratamentos de biomassa lignocelulósica, como os ácidos clorídrico, nítrico, fosfórico, e sulfúrico, sendo estes dois últimos os mais utilizados por serem mais baratos e eficientes na hidrólise das hemiceluloses. A desvantagem da hidrólise ácida é que ácidos inorgânicos são perigosos, corrosivos e tóxicos (MOSIER *et al.*, 2005).

O pré-tratamento alcalino de materiais lignocelulósicos emprega bases, incluindo hidróxido de sódio, hidróxido de cálcio, hidróxido de potássio, hidróxido de amônia, e amoníaco aquoso, entre outras. Este pré-tratamento rompe a parede celular da biomassa dissolvendo a lignina e as hemiceluloses mais facilmente acessíveis (KUMAR *et al.*, 2009). Embora os hidróxidos utilizados no pré-tratamento alcalino não sejam caros, a principal desvantagem desta técnica é o consumo excessivo de ácido e água para neutralizar e/ou remover os sais de cálcio ou sódio incorporados na biomassa (CHATURVEDI e VERMA, 2013). As vantagens do uso de pré-tratamentos alcalinos sobre os ácidos residem em uma maior eficiência na remoção da lignina, no aumento da acessibilidade da celulose à hidrólise, no uso de condições mais suaves de temperatura e pressão e no menor índice de degradação dos polissacarídeos da biomassa (BALAT, 2011).

A explosão a vapor é um dos métodos mais eficientes para a desconstrução da organização estrutural da parede celular das plantas (RAMOS *et al.*, 2015; BRIENZO *et al.*, 2017). Este pré-tratamento ocorre a altas temperaturas e pressões em tempos de reação relativamente curtos, gerando efeitos químicos e físicos sobre a biomassa lignocelulósica (RAMOS *et al.*, 2003). O pré-tratamento pode acontecer na ausência ou na presença de um ácido exógeno, a fim de aumentar a eficiência da hidrólise ácida das hemiceluloses (AGBOR *et al.*, 2011). A explosão a vapor, realizada na ausência de nenhum catalisador exógeno, provoca a autohidrólise de todos os componentes da biomassa. Esse processo depende da liberação de ácido acético a partir da hidrólise dos grupos acetila das hemiceluloses, que catalisa a sua hidrólise resultando na liberação de oligômeros e monômeros como glucose e xilose

(DUFF e MURRAY, 1996). Além do ácido acético, os ácidos fórmico e levulínico também são formados a partir de pentoses e hexoses sob condições mais altas de pressão e temperatura, bem como furfural e 5-hidroximetilfurfural (HMF). Em relação à lignina, sua fusão ocorre em temperaturas da ordem de 190-200°C que induzem a quebra de ligações aril-éter do tipo α -O-4' ou β -O-4' (TANSHASHI, 1990; RAMOS, 2003). As principais desvantagens da explosão a vapor são a degradação parcial das hemiceluloses e a formação de compostos inibitórios aos processos de hidrólise enzimática e fermentação (OLIVA *et al.*, 2003).

2.3.1 Organosolv

O processo *organosolv* é considerado um dos mais eficazes para o isolamento da celulose e recuperação de uma lignina com menores alterações químicas. O pré-tratamento é realizado com um ou mais solventes orgânicos na presença ou na ausência de água e de catalisadores ácidos ou básicos (WEI-KIT *et al.*, 2017), em elevadas temperaturas, para a remoção de hemiceluloses e lignina (SERRANO-RUIZ, 2015). Vários solventes orgânicos se encontram relatados na literatura, porém, os mais utilizados são a acetona (KALOGIANNIS *et al.*, 2019), o etanol (ROMANÍ *et al.*, 2019), o metanol (YUAN *et al.*, 2018) e o ácido fórmico (DIMOS *et al.*, 2019).

O etanol é o solvente mais utilizado em trabalhos científicos, pois apresenta baixo custo, miscibilidade em água e baixo ponto de ebulição, o que facilita a sua recuperação e reuso, reduzindo os custos operacionais do processo (BARUAH *et al.*, 2018). Além das características citadas acima para o etanol, é também desejável que o solvente escolhido não cause limitações nos fenômenos de transporte de massa, não promova reações indesejadas com os equipamentos (corrosão) e com os componentes da biomassa, e favoreça as reações de interesse por reduzir as suas respectivas energias de ativação (ZHANG *et al.*, 2016; ZHAO *et al.*, 2009).

O pré-tratamento *organosolv* tem como as principais vantagens ser altamente eficaz para o fracionamento de biomassa lignocelulósica, permitir a recuperação da lignina com menor grau de modificação química e promover altos índices de deslignificação, gerando fibras celulósicas de menor grau de desagregação e menor perda de propriedades (ZHANG *et al.*, 2016; HALLAC *et al.*, 2010).

A fração celulósica obtida pelo pré-tratamento *organosolv* é facilmente hidrolisada pelas celulasas, gerando altos rendimentos em glucose em tempo relativamente curtos. Além disso, permite uma redução na quantidade do coquetel enzimático empregado na hidrólise, contribuindo à redução no custo operacional do processo. A partir da glucose, inúmeros produtos podem ser obtidos por rotas química, enzimática ou microbiana (PAN *et al.*, 2005; PAN *et al.*, 2006).

Na ausência de um catalisador exógeno, a lignina obtida pelo processo *organosolv* apresenta baixa massa molar, elevado grau de pureza, elevada reatividade química e baixo teor de enxofre (se presente), o que a torna uma matéria-prima adequada à síntese de produtos de valor agregado (WEN *et al.*, 2013; YÁÑEZ *et al.*, 2014).

O pré-tratamento *organosolv* usa uma grande quantidade de solvente no processo de deslignificação. Portanto, para que seja economicamente competitivo, faz-se necessária a recuperação e reuso do solvente. Outra desvantagem desse tipo de pré-tratamento está relacionada à presença de furfural, HMF e fenóis solúveis derivados da lignina no hidrolisado obtido após o pré-tratamento. Além disso, o custo de capital do processo é alto, devido à necessidade de equipamentos com especificações apropriadas ao uso de materiais inflamáveis e aos riscos de explosão e poluição ambiental, devido ao emprego de solventes orgânicos voláteis em altas temperaturas (PERAL, 2016).

As variáveis que influenciam os resultados do pré-tratamento *organosolv* incluem o tamanho das partículas da biomassa, a temperatura, o tempo de reação, a presença ou ausência de catalisadores exógenos e o tipo e a concentração do solvente orgânico empregado (PAN *et al.*, 2006).

O consumo de energia durante a etapa de cozimento está relacionado ao tamanho de partícula da biomassa, pois quanto menor o valor, mais fácil será a absorção do solvente e, conseqüentemente, mais rápido o fracionamento da biomassa (ZHU *et al.*, 2010).

A extração da lignina da matriz celulósica exige o emprego de temperaturas relativamente altas, porém, acima de 200 °C, celulose, as hemiceluloses e lignina podem sofrer diferentes níveis de degradação química (CHIN *et al.*, 2021). No entanto, a temperatura tem que ser elevada o suficiente para remover as hemiceluloses, aumentar a área superficial e a porosidade da biomassa, fragmentar

a lignina para facilitar a sua remoção e comprometer a estrutura cristalina da celulose, reduzindo o seu grau de polimerização, tudo isso com vistas a melhorar a acessibilidade das enzimas durante a hidrólise (HALLAC *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2016).

O tempo de pré-tratamento também pode variar de minutos a horas, porém, um tempo excessivo leva a um aumento da degradação dos polissacarídeos da biomassa, causando, por exemplo, o acúmulo de produtos de desidratação. Tais produtos como furfural e HMF, podem reagir entre si ou com componentes da lignina, aumentando a sua massa molar, ou permanecer como contaminante das frações de lignina solúvel em ácido (GASSON *et al.*, 2012).

O processo *organosolv* pode ocorrer na presença ou na ausência de catalisadores exógenos. Os catalisadores usualmente utilizados são: ácido sulfúrico (ROMANÍ *et al.*, 2019), hidróxido de sódio (YUAN *et al.*, 2018), cloreto de alumínio (RUIZ *et al.*, 2018) e ácido oxálico (KALOGIANNIS *et al.*, 2019), entre outros. No entanto, seu uso tem como principais desvantagens a possibilidade de corrosão de equipamentos, etapas adicionais para recuperação e reuso dos catalisadores, contaminação da lignina extraída e elevação do custo de produção (WU *et al.*, 2014).

Kim, T. H. *et al.* (2019) analisaram o fracionamento dos três componentes principais da casca de arroz em temperaturas de 170–190 °C, concentrações de etanol de 50% a 70% (v/v) e de ácido sulfúrico de 0% a 0,7% (m/v), tempo de reação de 60 min e a relação líquido:sólido 1:10. As melhores condições foram de 180 °C, 60% (v/v) de etanol e 0,25% (m/v) de ácido sulfúrico para a remoção de 86,8% de xilanas e 77,5% da lignina da casca de arroz, e na fração líquida foram obtidos rendimentos de 67,6% de xilose e 49,8% de lignina. Além disso, a hidrólise enzimática da casca de arroz fracionada rendeu de 85,2% de glucose empregando uma carga enzimática de 15 FPU (unidades de papel de filtro) por grama de glucana.

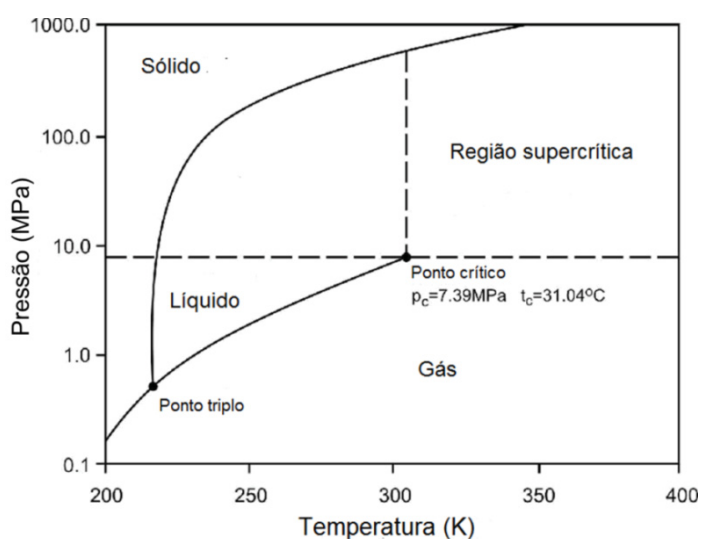
Chotirotsuko *et al.* (2019) estudaram os efeitos do glicerol e do ácido oxálico na eficiência e seletividade do processo *organosolv* na palha de cana-de-açúcar. Os autores observaram que o maior teor de glicerol promoveu maiores índices de designificação. O pré-tratamento a 170 °C com 80% (v/v) de glicerol e 300 mmol/L de ácido oxálico seguido de extração de acetona a 30 °C resultou na recuperação de

71,7% de glucanas, enquanto 96,8% e 83,9% das hemiceluloses e lignina foram transferidas do material tratado para as frações aquosas de glicerol e acetona, respectivamente.

2.3.2 Dióxido de carbono supercrítico

Fluido supercrítico é qualquer solvente que se encontra acima das condições críticas de temperatura e pressão, e que por isso apresenta propriedades de líquidos como a densidade e de gases como a compressibilidade (SERNA *et al.*, 2016). A FIGURA 9 apresenta o diagrama de fases do CO₂, em que as curvas representam a temperatura e a pressão onde duas fases coexistam no equilíbrio. A curva de equilíbrio gás-líquido termina no ponto crítico e a região de fluido supercrítico está acima deste ponto, em que as fases líquida e gasosa são indistinguíveis (DOANE-WEIDEMAN e LIESCHESKI, 2004).

FIGURA 9 - DIAGRAMA DE FASES DE CO₂.



FONTE: Adaptado de Witkowski *et al.* (2014).

Em relação a solventes orgânicos, o CO₂ não é tóxico e nem inflamável, é inerte, tem baixa viscosidade, possui alta capacidade de difusão em matéria orgânica, baixo custo e suas condições críticas de temperatura e pressão (31,04 °C e 7,39 MPa, respectivamente) são relativamente baixas em relação a outros solventes como a água, o que o torna ideal para extração de materiais termolábeis

(ALONSO, 2018; JIÃO e POUR, 2018). Além disso, esse método não gera resíduos químicos e o solvente pode ser facilmente removido dos produtos por um processo de despressurização, tornando o seu uso adequado nas indústrias de medicamentos, alimentícia e farmacêutica. É amplamente empregado para extração de componentes não polares de matrizes vegetais, como ácidos graxos, esteróis e terpenos, sem a necessidade do uso de modificadores polares (DURDEVIC *et al.*, 2017). A baixa polaridade do CO₂ pode ser superada pelo uso de cossolventes, que alteram a sua polaridade e aumentam o seu poder de solvatação em relação aos analitos de interesse (HERRERO *et al.*, 2010).

Segundo Li (1988), o CO₂ tem sido utilizado em condições subcríticas ou supercríticas para o pré-tratamento de biomassa lignocelulósica desde 1988. O efeito da deslignificação, produzido por esse tipo de pré-tratamento, foi testado em diferentes tipos de matérias-primas, como aspen (*Populus tremula*) e pinheiro amarelo do sul (*Pinus palustres*) (KIM e HONG, 2001), bagaço de cana-de-açúcar e aparas de *Pinus taeda* (PASQUINI *et al.*, 2005a), palha de arroz (GAO *et al.*, 2010), palha de milho (LV *et al.*, 2013) e *switchgrass* (NARAYANASWAMY *et al.*, 2011) e entre outros. Os parâmetros mais importantes que foram investigados nestes estudos são a umidade, a temperatura, a pressão e o tempo de pré-tratamento.

Uma das vantagens de utilizar scCO₂ em pré-tratamento de biomassa lignocelulósica é a possibilidade de recuperar a lignina com pureza apreciável (ALVIRA *et al.*, 2010). Outra vantagem do uso de scCO₂ em pré-tratamento é que ele não produz compostos tóxicos e inibidores às etapas de hidrólise enzimática e fermentação (KUMAR *et al.*, 2009).

A presença de CO₂ em pré-tratamentos *organosolv* proporciona uma maior difusão do solvente orgânico no material lignocelulósico, melhorando inclusive a impregnação de catalisadores ácidos ou básicos quando esses estão presentes no sistema de reação (NARAYANASWAMY *et al.*, 2011; SERNA *et al.*, 2016). Já quando o solvente orgânico empregado contém água em sua composição, a taxa de deslignificação aumenta devido à remoção mais eficiente das hemiceluloses, que pode ou não estar relacionada com a formação de ácido carbônico no meio. Com isso, há um aumento da acessibilidade da celulose e um aumento da solubilização de fragmentos de lignina (HUI SHENG *et al.*, 2013).

Pasquini *et al.* (2005a) utilizaram scCO₂ com misturas de etanol-água para a

extração da lignina do bagaço de cana e lascas de *Pinus taeda*. Os rendimentos de deslignificação foram de 83,1% para aparas de *Pinus taeda* e 93,5% para bagaço de cana-de-açúcar empregando 50% (v/v) de etanol/água a 19 MPa e 170 °C por 60 min de reação.

Pasquini *et al.* (2005b) empregaram scCO₂ na presença de 60% (v/v) de 1-butanol/água para o pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar e obtiveram rendimentos de deslignificação de 94,5% após 105 min a 190°C e 7 MPa.

LV *et al.* (2013) estudaram a influência da temperatura, da pressão e do tempo de reação no fracionamento de palha de milho empregando scCO₂ e etanol/água na razão volumétrica de 2:1. As condições operacionais envolveram temperaturas entre 160 e 200 °C, pressões entre 13 e 17 MPa e tempos de reação entre 40 e 80 min. A maior taxa de deslignificação (90,05%) foi obtida a 200 °C e 13 MPa após 80 min de pré-tratamento.

Serna *et al.* (2016) empregaram etanol/água e scCO₂ no pré-tratamento da casca de arroz, atingindo uma deslignificação de 90,6% em biomassas com 75% de umidade. Na presença de celulasas (endoglucanases e exoglucanases), a hidrólise da casca de arroz não tratada resultou em um rendimento de 4,11% g de açúcar/ g de glucanas, enquanto o pré-tratamento *organosolv* a 80 °C e 270 bar aumentou esse rendimento para 7,16% g de açúcar/ g de glucanas.

2.3.3 Líquidos expandidos com gás

Líquidos expandidos com gás (GXL) constituem uma mistura de um gás compressível dissolvido em um solvente orgânico. Assim, GXL corresponde a um líquido cujo volume é expandido quando pressurizado com um gás condensável. Líquidos expandidos com CO₂ (CXLs) são a classe mais empregada de GXLs devido às vantagens do CO₂ em relação à segurança e economia. Nessa mistura, o CO₂ aumenta a solubilidade do gás e os fenômenos de transferência de massa do sistema, enquanto solventes orgânicos melhoram a solubilidade de sólidos e líquidos (HERRERO *et al.*, 2017). Um GXL é formado quando um gás compressível é dissolvido em um solvente, onde causa a expansão volumétrica da fase líquida. Porém, diferentes solventes apresentam diferentes capacidades de dissolver gases como o CO₂. Jessop e Subramaniam (2007) classificaram esses solventes em três

classes: I, II e III.

Os solventes da classe I, como a água, têm a baixa capacidade de dissolver CO_2 , portanto, não expandem significativamente e suas propriedades não são alteradas significativamente, com exceção da acidez devido à formação de ácido carbônico. Na classe II estão os solventes orgânicos tradicionais como etanol, metanol e hexano, que dissolvem grandes quantidades de CO_2 , expandindo-se bastante e, conseqüentemente, causando grandes mudanças em suas propriedades físicas. Os líquidos da classe III como líquidos iônicos, polímeros líquidos e petróleo bruto dissolvem quantidades moderadas de CO_2 , expandindo-se moderadamente em volume e resultando na alteração de propriedades como a viscosidade, enquanto a polaridade permanece inalterada.

Os líquidos expandidos com gás, quando comparados aos processos tradicionais de fase líquida, oferecem menor viscosidade, maior difusividade e maior segurança devido ao meio não ser inflamável (ou inerte pela atmosfera de CO_2). Contudo, os líquidos expandidos com gás também foram identificados como solventes promissores para extrações que empregam biomassa como matéria-prima, pois suas baixas viscosidades e altas difusividades facilitam a penetração em paredes celulares e aumentam as taxas de extração. Além disso, as extrações podem ser operadas em temperaturas mais baixas, permitindo que compostos sensíveis à temperatura sejam extraídos sem decomposição térmica (CLARKE *et al.*, 2018).

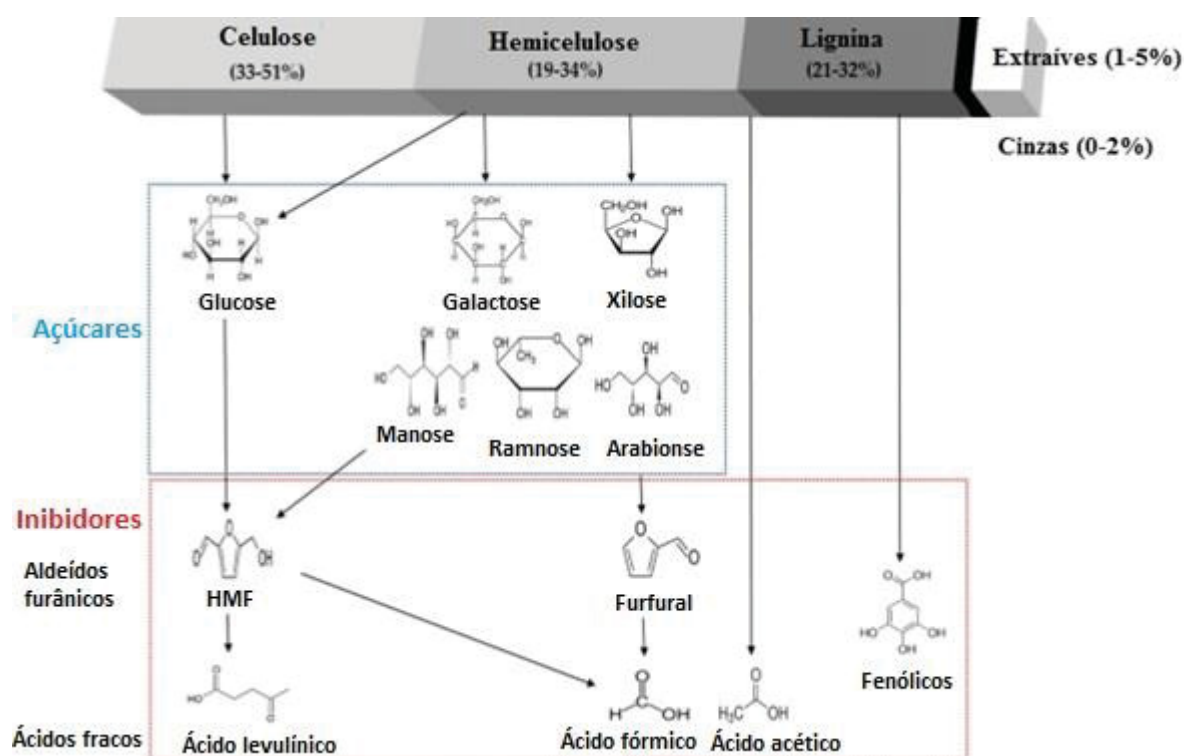
O líquido expandido com gás se aproxima de um fluido supercrítico, pois, em ambos os casos, a taxa de expansão de volume aumenta com a pressão. Na medida em que o ponto crítico da mistura é alcançado, as fases vapor e líquido se fundem dando origem a um fluido supercrítico modificado com cossolvente, ou seja, o emprego de solvente orgânico em concentração elevada é o que permite trabalhar na região de líquido expandido com gás (JESSOP e SUBRAMANIAM, 2007).

2.4 COMPOSTOS DERIVADOS DA DEGRADAÇÃO DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

Os processos de pré-tratamento como os citados na seção 2.3 permitem a remoção de grande parte das hemiceluloses e a solubilização da lignina presente na matriz lignocelulósica. Estes pré-tratamentos também aumentam a suscetibilidade

do componente celulósico à hidrólise enzimática (ZHANG e LYND, 2004). No entanto, compostos derivados de materiais lignocelulósicos também podem ser formados durante o pré-tratamento, como os aldeídos furânicos (furfural e 5-hidroximetilfurfural), ácidos orgânicos (ácido fórmico e ácido levulínico) e compostos fenólicos (KIM, 2018), conforme demonstrado na FIGURA 10. Estes compostos inibem a hidrólise enzimática e o crescimento microbiano durante o processo de fermentação para a produção de produtos como o etanol celulósico (SINGH *et al.*, 2017).

FIGURA 10 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS E DE SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO.



FONTE: Traduzido de Kim (2018).

Os produtos de degradação de biomassas lignocelulósicas estão presentes nos hidrolisados pré-tratados e são categorizados em quatro grupos, sendo eles: (1) compostos fenólicos, formados predominantemente a partir da lignina; (2) aldeídos furânicos, produzidos pela desidratação de pentoses e hexoses; (3) ácidos carboxílicos fracos derivados principalmente das hemiceluloses e de aldeídos furânicos; e (4) açúcares solúveis, liberados por hidrólise ácida de polissacarídeos na forma de oligo e monossacarídeos (DEMIRBAS, 2008; RASMUSSEN *et al.*,

2014). A formação destes compostos depende do tipo de matéria-prima (composição química), da técnica de pré-tratamento (físico, químico e biológico) e de sua drasticidade (temperatura, tempo de reação, pressão, pH, tipo de solvente e adição de catalisador, dentre outros) (KIM, 2018).

Os mecanismos de reações paralelas envolvidas na desconstrução da parede celular de materiais lignocelulósicos são de grande interesse, pois as mesmas moléculas que atuam como inibidores de enzimas e microrganismos também são produtos químicos valiosos (RASMUSSEN *et al.*, 2014). Exemplo disto é o furfural, produto formado a partir de hemiceluloses como as xilanas, que é considerado um produto essencial para o desenvolvimento de biorrefinarias lignocelulósicas, com possibilidade de ser transformado em combustíveis e produtos químicos de interesse industrial amplamente utilizado nas indústrias de refino de petróleo, plásticos, farmacêutica e agroquímica (LUO *et al.*, 2019).

2.5 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

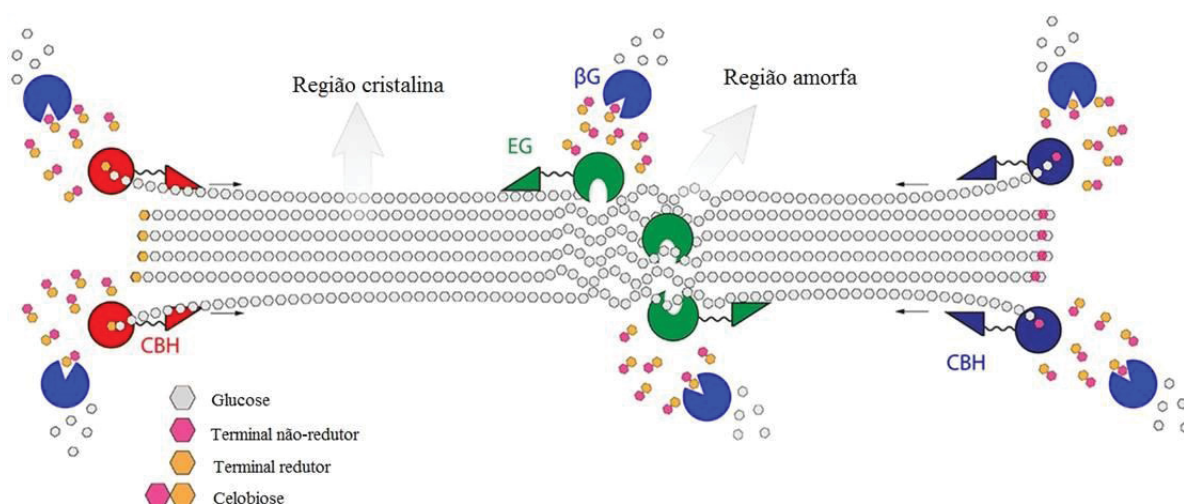
A hidrólise enzimática da celulose é realizada por três classes de hidrolases, endoglucanases (EGs), exoglucanases ou celobioidrolases (CBHs) e β -glucosidases (β G), cuja ação sinérgica visa converter as glucanas disponíveis no substrato em açúcares fermentescíveis. Para a hidrólise de outros polissacarídeos como as hemiceluloses, outras classes de enzimas podem ser necessárias para a conversão, como endoxilanas, endomananas, α -arabinofuranosidases, feruloil esterases e α -glucuronosidases, dentre outras (OGEDA e PETRI, 2010).

O complexo enzimático celulásico pode ser produzido por vários fungos e bactérias, sendo que destes o fungo filamentoso *Trichoderma reesei* é um dos mais estudados (ACHARYA e CHAUDHARY, 2012). Esse fungo produz endoglucanases (TrCel7B, TrCel5A, TrCel12A e TrCel45A), CBHs (TrCel7A ou CBH-I e TrCel6A ou CBH-II) e pelo menos dois tipos de β Gs (SILVEIRA *et al.*, 2015a).

As EGs são enzimas que agem nas regiões de menor organização molecular (amorfas) da celulose. Essas enzimas apresentam sítio catalítico em forma de fenda que acomodam as cadeias de celulose e hidrolisam as ligações $\beta(1\rightarrow4)$ internas. Já, as exoglucanases ou CBHs possuem o sítio catalítico em forma de túnel e atuam nas regiões cristalinas das cadeias de celulose, formando celobiose a partir das

extremidades redutoras e não-redutoras. Estas enzimas podem ser classificadas em CBH-I e CBH-II, respectivamente. Por fim, a celobiose e oligômeros de baixa massa molar são convertidos a glucose pela ação das β Gs (WOOD e MCGRAE, 1979). Uma visão pictórica da atuação dessas enzimas sob o substrato celulósico está apresentada na FIGURA 11. Endoglucanases e exoglucanases interagem mais facilmente com a celulose pela existência de um Módulo de Ligação a Carboidrato em sua estrutura, que corresponde a um peptídeo contendo resíduos de tirosina, triptofano, asparagina e glutamina. Esses resíduos possuem alta afinidade por polissacarídeos e é responsável pela adsorção da enzima na superfície das fibras celulósicas por meio de ligações de hidrogênio e de Van der Waals (NOTENBOOM *et al.*, 2001).

FIGURA 11 - REPRESENTAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA PELO COMPLEXO CELULOLÍTICO.



FONTE: Traduzido de Pirich *et al.* (2020).

Outra classe de enzima que tem ação na hidrólise da celulose corresponde às denominadas mono-oxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs), atualmente classificadas como Atividades Auxiliares da Família 9 (AA9) e, anteriormente, por Glicosil hidrolases da Família 61 (GH61). Essa enzima atua nas regiões cristalinas e amorfas da celulose promovendo a clivagem oxidativa da ligação glicosídica, gerando novas extremidades de cadeia. Essa atividade apresenta alto sinergismo com outros componentes do complexo levando, assim, a altos rendimentos de sacarificação em menores tempos de reação. Além disso, o complexo celulolítico

pode ser auxiliado por proteínas denominadas suoleninas que promovem a quebra das interações entre cadeias de glucanas nas regiões cristalinas da celulose, facilitando a área disponível para a adsorção das celulasas (SILVEIRA *et al.*, 2018).

Vários fatores podem influenciar o processo de hidrólise enzimática, como o sinergismo entre as celulasas e celobiasas, a adsorção e dessorção das enzimas sobre a superfície da celulose, a carga enzimática empregada, a razão existente entre as atividades específicas e outros parâmetros de controle como agitação, temperatura e pH do meio. Algumas propriedades do substrato também podem influenciar a hidrólise, como a cristalinidade, a área superficial de contato e os seus teores de lignina e de hemiceluloses. Essas propriedades podem ser alteradas consideravelmente pela etapa de pré-tratamento (PANDEY *et al.*, 2000).

3 METODOLOGIA

Apresentam-se neste capítulo as metodologias aplicadas na preparação do bagaço de cana-de-açúcar para o pré-tratamento, na caracterização do bagaço antes e após extração com etanol 95% e após pré-tratamento *organosolv*, e na condução dos procedimentos experimentais adotados para as etapas de pré-tratamento e hidrólise enzimática.

O bagaço de cana-de-açúcar foi cedido em março de 2019 pelo grupo francês Tereos da unidade de Severínia (SP), que produz açúcar, etanol e bioenergia por processos de cogeração. Reagentes, padrões e solventes orgânicos foram utilizados em grau analítico ou cromatográfico, dependendo da aplicação.

3.1 PREPARO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

3.1.1 Secagem

O processo de secagem foi realizado seguindo os procedimentos descritos pelo *National Renewable Energy Laboratory* (NREL, Golden, EUA). O bagaço de cana-de-açúcar foi seco em forno de convecção a 40 °C por 24 h, quando o material atingiu um teor de umidade inferior a 10% (HAMES *et al.*, 2008).

3.1.2 Tamanho médio das partículas

O bagaço de cana-de-açúcar foi processado em um moinho de facas (tela de 1 mm) para redução de partícula. A distribuição de tamanho das partículas do bagaço moído foi avaliada em agitador de peneiras (tipo Bertel), cujas peneiras do tipo Tyler apresentavam aberturas de 1,19, 0,85, 0,60, 0,42, 0,172 e 0,075 mm.

As peneiras foram pesadas e posicionadas no agitador mecânico. Cerca de 20 g de bagaço de cana-de-açúcar foram pesados e adicionados na peneira de maior abertura (1,19 mm). Após agitação mecânica por 10 min, cada peneira foi pesada novamente para se obter a fração de massa retirada (X_i) por meio da Equação 1, onde m_{bag} é massa total de bagaço de cana (g), m_i é a massa inicial de cada peneira (g) e m_f é a massa final de cada peneira (g) (GOMIDE, 1983).

$$X_i = \frac{m_f - m_i}{m_{bag}} \quad (1)$$

O diâmetro médio de partícula foi determinado por meio da Equação 2, no qual D_{ps} é o diâmetro médio das partículas (mm), X_i é a fração de massa retida na peneira e D_i é o diâmetro de abertura da peneira (mm). A Equação 2 é conhecida como Diâmetro Médio de Sauter, sendo essa a mais utilizada para estudo de sistemas particulados, de transferência de calor e massa, de cinética e de processos catalíticos de conversão (CREMASCO, 2012).

$$D_{ps} = \frac{1}{\sum_{i=1}^n \left(\frac{X_i}{D_i} \right)} \quad (2)$$

O bagaço de cana-de-açúcar foi armazenado em sacos plásticos tipo zip com fecho hermético e mantido na geladeira a 4 °C, até uso em ensaios de caracterização e remoção dos extraíveis com 95% (v/v) etanol por 12 h de extração via sistema Soxhlet. É importante mencionar que o material usado nos pré-tratamentos foi o bagaço de cana livre de extraíveis etanólicos (BC_{LEE}).

3.2 ANÁLISE QUÍMICA DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

A caracterização inicial foi realizada tanto para o bagaço de cana-de-açúcar não tratado, após secagem e moagem, como para o BC_{LEE} foi realizada seguindo as normas do NREL, conforme indicado na TABELA 2.

3.2.1 Determinação de teor de extraíveis

Cerca de 4 g de bagaço de cana-de-açúcar em massa seca foi submetido a uma extração sequencial realizada em triplicata empregando água destilada por 16 h e etanol 95% (v/v) por 16 h em extrator Soxhlet. Os extraíveis das amostras de bagaço de cana foram secos com o auxílio de um evaporador rotativo modelo IKA RV 10 digital sob pressão reduzida. A massa de extrato foi determinada por gravimetria, sendo o resultado expresso em porcentagem de massa (base seca) do bagaço utilizado no ensaio de acordo com a Equação 3, em que m_{bf} é a massa do

balão com os extratos, m_{bi} é a massa do balão previamente tarado, e m_{bag} é a massa da amostra de bagaço utilizada no ensaio (SLUITER *et al.*, 2008a).

$$Teor\ de\ extraíveis\ (\%) = \frac{m_{bf} - m_{bi}}{m_{bag}} \quad (3)$$

TABELA 2 - CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA SEGUINDO AS NORMAS DO NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY (NREL).

Análises	Técnica	Norma
Extraíveis	Extração água e etanol	NREL/TP-510-42619
Umidade	Secagem em estufa	NREL/TP-510-42621
Cinzas	Calcinação	NREL/TP-510-42622
Lignina insolúvel em ácido	Hidrólise ácida	NREL/TP-510-42618
Lignina solúvel em ácido	Espectrofotometria no ultravioleta dos hidrolisados ácidos	NREL/TP-510-42617
Carboidratos	Cromatografia a líquido de alta eficiência dos hidrolisados ácidos (HPLC)	NREL/TP-510-42618

FONTE: A autora (2021).

3.2.2 Determinação do teor de umidade

O ensaio para a determinação do teor da umidade foi realizado em triplicata. Aproximadamente 1 g de bagaço de cana-de-açúcar foi transferida para pratos de alumínio previamente secos em estufa a 105 °C por 4 h e pesados na temperatura ambiente. Os pratos de alumínio contendo as amostras foram colocados em estufa de convecção forçada a 105 °C por 4 h. Posteriormente, as amostras foram retiradas da estufa e pesadas, na temperatura ambiente, para a realização do cálculo de teor de umidade conforme apresentado na Equação 4, em que m_i é massa de bagaço antes da secagem (g) e m_f é a massa do bagaço após secagem (g).

$$Teor\ de\ umidade\ (\%) = \frac{m_i - m_f}{m_i} \quad (4)$$

As amostras voltaram para a estufa a 105 °C por 1 h para secar até peso constante, ou seja, até que a diferença entre as duas medidas consecutivas do teor

de umidade fosse menor ou igual a 0,1% (SLUITER *et al.*, 2008b).

3.2.3 Determinação do teor de cinzas

A determinação do teor de cinzas do bagaço de cana-de-açúcar foi realizada em triplicata. Cerca de 1 g de amostra de bagaço de cana-de-açúcar foi condicionado em cadinho de porcelana previamente calcinado, tarado e pesado. As amostras foram submetidas a uma rampa de aquecimento em mufla, conforme descrito por Sluiter *et al.* (2008c). Neste procedimento, as amostras foram aquecidas até 575°C, calcinadas por 3 h e depois submetidas a uma rampa de resfriamento até 105 °C, na qual foram mantidas até sua transferência para um dessecador.

As cinzas foram determinadas por gravimetria após pesagem do cadinho calcinado, conforme a Equação 5, onde m_{cf} é a massa do cadinho calcinado contendo as cinzas da amostra, m_{ci} é a massa do cadinho previamente tarado, e m_{bag} é a massa da amostra de bagaço empregada no ensaio. As cinzas obtidas voltaram à mufla para secar a 575 °C até massa constante.

$$Cinzas (\%) = \frac{m_{cf} - m_{ci}}{m_{bag}} \quad (5)$$

3.2.4 Determinação de carboidratos e lignina

A composição química do bagaço de cana-de-açúcar foi determinada de acordo com o método proposto por Sluiter *et al.* (2012), originando os teores de lignina insolúvel em meio ácido, lignina solúvel em meio ácido e carboidratos totais (TABELA 2). O método consistiu na hidrólise de aproximadamente 0,3 g de amostra em tubos de ensaio com 3 mL de ácido sulfúrico 72% (m/m) por 1 h a 30 °C, com maceração e agitação a cada 5 min utilizando um bastão de vidro. Em seguida, o material foi transferido para um frasco de vidro e diluído a 4% adicionando 84 mL de água destilada. Os frascos foram fechados, homogeneizados e condicionados em autoclave a 121 °C por 1 h. Os frascos então foram retirados da autoclave e o conteúdo filtrado a vácuo em cadinho de Gooch de porosidade média. Posteriormente, a massa retida no cadinho foi lavada exaustivamente com água e o filtrado foi transferido para um balão volumétrico de 250 mL.

A massa retida no cadinho de Gooch foi quantificada por gravimetria, gerando a fração denominada Lignina Insolúvel em Ácido (LIA). O cadinho de Gooch foi seco em 105°C por 6 h, pesado e posteriormente utilizado na filtração. Posteriormente, os cadinhos foram novamente secos em estufa a 105 °C por 12 h até massa constante. A massa do resíduo retido no cadinho foi então registrada e utilizada para calcular a porcentagem de LIA da amostra conforme Equação 6, em que m_{cr} é a massa do cadinho de Gooch contendo o resíduo insolúvel, m_{cad} é a massa inicial do cadinho de Gooch, m_c é a massa de cinzas de LIA e m_{bi} é a massa inicial de bagaço empregada no ensaio (base seca).

$$LIA (\%) = \frac{(m_{cr} - m_{cad}) - m_c}{m_{bi}} \quad (6)$$

O filtrado obtido foi então avolumado a 250 mL e submetido à análise espectrofotométrica no comprimento de onda de 240 nm para determinação da Lignina Solúvel em Ácido (LSA), que foi realizada de acordo com a Equação 7 em que A_{240} é a absorbância a 240 nm, V é o volume do filtrado empregado no ensaio, ε é a absorvidade da lignina de bagaço de cana-de-açúcar nesse comprimento de onda (25 L/g·cm) e m_s é a massa seca do material submetido ao ensaio.

$$LSA (\%) = \frac{A_{240} \times V \times \text{Diluição}}{\varepsilon \times m_s} \quad (7)$$

A determinação da lignina total (LT) foi obtida pelo somatório de LSA e LIA, conforme a Equação 8.

$$LT(\%) = LSA (\%) + LIA (\%) \quad (8)$$

O teor de carboidratos foi analisado do hidrolisado ácido do procedimento descrito acima em cromatógrafo Shimadzu modelo LC20AD, equipado com amostrador automático modelo SIL 10A, desgaseificador de fase móvel modelo DGU 14A, aquecedor de coluna modelo CTO 10A e detectores nos modelos RID10A para índice de refração e SPD-M10Avp para espectrofotometria no ultravioleta. A coluna cromatográfica utilizada foi a Aminex HPX-87H (Bio-Rad) (300 x 7,8 mm), precedida

de uma pré-coluna Hi-Plex H. Ambas foram mantidas a 65 °C e eluídas com 5 mmol/L de H₂SO₄ a uma vazão de 0,6 mL/min. As quantificações foram feitas por padronização externa, com base em curvas de calibração construídas para cada componente monitorado (celobiose, glucose, xilose, arabinose e ácido acético), considerando seus respectivos fatores de hidrólise para conversão de cada componente em seu derivado anidro: 0,95 para a celobiose, 0,90 para glucose, 0,88 para xilose e arabinose e 0,72 para ácido acético.

3.3 PRÉ-TRATAMENTO *ORGANOSOLV* NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO

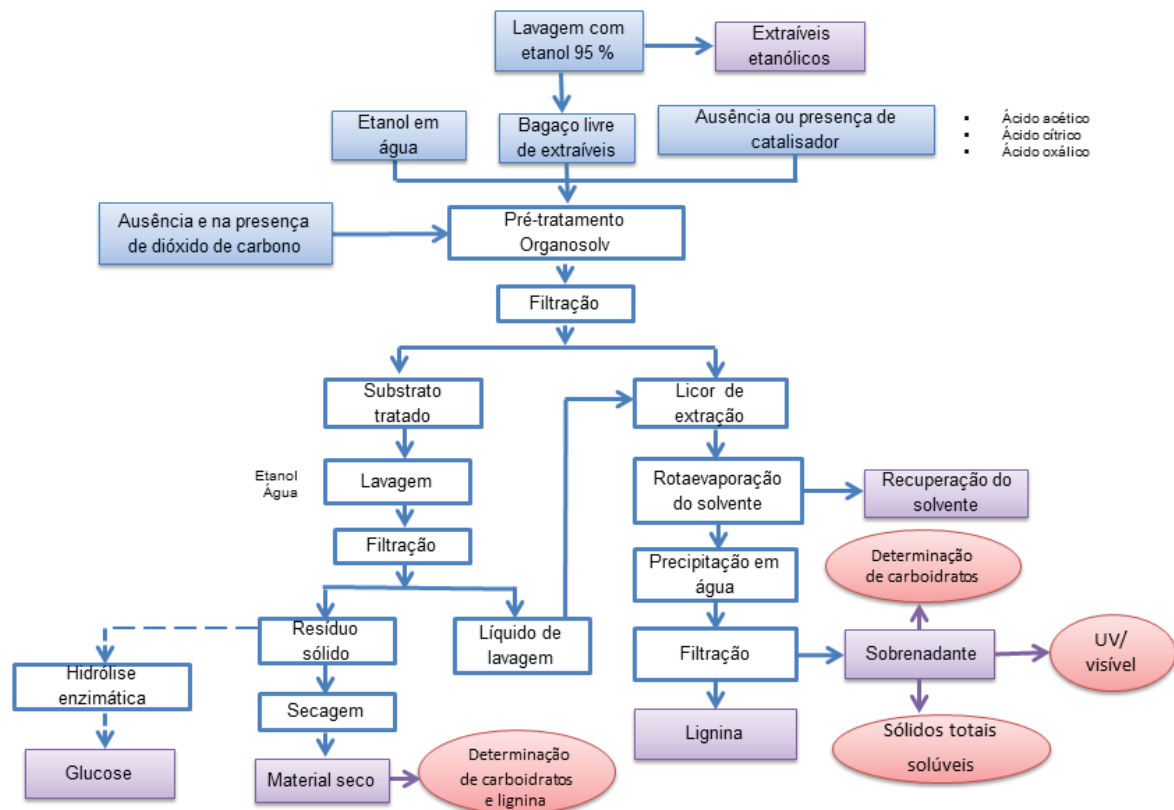
Nesta seção encontra-se descrito o procedimento empregado para o pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar com *organosolv* assistido ou não por scCO₂, cujo fluxograma está representado na FIGURA 12. Inicialmente, o bagaço de cana-de-açúcar foi submetido à extração em aparelho Soxhlet com etanol 95% (v/v) para gerar um material com baixo teor de extrativos (BC_{LEE}). É importante ressaltar que este material foi novamente submetido aos procedimentos de determinação dos teores de umidade, cinzas, extraíveis em água e etanol 95%, ligninas solúvel e insolúvel em ácido e carboidratos por análise cromatográfica. A remoção de extrativos antes da análise das ligninas solúvel e insolúvel em ácido melhora a precisão desses métodos, pois a sua presença pode resultar em artefatos devidos a sua absorvidade molar ou a eventuais reações de condensação envolvendo componentes oxigenados e fragmentos de lignina (SLUITER *et al.*, 2008a).

O fracionamento do bagaço de cana-de-açúcar foi realizado usando reator Parr de 100 mL tipo batelada com agitação mecânica, que estava acoplado a uma bomba de seringa (modelo Teledyne ISCO 260 D) conforme o esquema da FIGURA 13. O vaso do reator era de aço inoxidável, que é excelente para uso com sistemas orgânicos, mas não é adequado para ácidos inorgânicos halogenados devido ao risco de corrosão no equipamento.

O processo de pré-tratamento consistiu na pressurização do reator contendo BC_{LEE} e uma solução de etanol em água. As reações foram realizadas na ausência ou na presença de um catalisador exógeno, sem ou com assistência de scCO₂ conforme descrito na seção 3.4. O reator foi carregado com 6 g de BC_{LEE} e 60 mL da mistura etanol em água além da quantidade de catalisador, quando necessário.

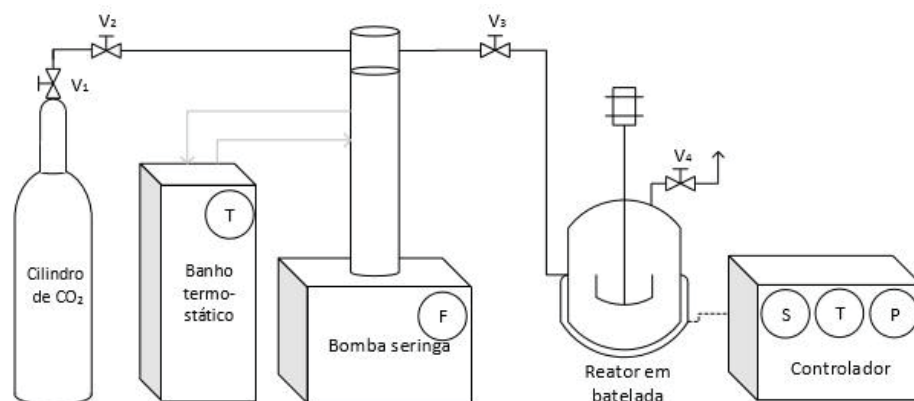
Posteriormente, o reator foi aquecido até a temperatura desejada, mantido sob agitação de 500 rpm nessa condição por um determinado tempo de reação e depois resfriado para amostragem do meio de reação.

FIGURA 12 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PRÉ-TRATAMENTO ORGANOSOLV NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO.



FONTE: A autora (2021).

FIGURA 13 - APARATO EXPERIMENTAL DO REATOR PARR TIPO BATELADA.



FONTE: A autora (2021).

O substrato produzido após o pré-tratamento foi filtrado e a fração sólida (fração insolúvel) obtida foi lavada exaustivamente com etanol e água para remover qualquer solvente não volátil aderido às fibras e para evitar reprecipitação da lignina sobre o material pré-tratado (SILVEIRA *et al.*, 2015b). Em seguida, o substrato foi filtrado em cadinho de Gooch a vácuo e o material retido foi seco em estufa a 60 °C até massa constante. A partir da massa de material obtida (m_f) e da massa seca inicial utilizada para o pré-tratamento (m_i), foi possível calcular a recuperação mássica do pré-tratamento (R_M) em base seca, conforme Equação 9.

$$R_m = \frac{m_f}{m_i} \times 100 \quad (9)$$

A massa de material seco gerado após o pré-tratamento foi submetida às análises para determinação de sua composição química. Os rendimentos mássicos (R_M) e das composições químicas do bagaço livre de extraíveis e dos materiais pré-tratados foram então empregadas para determinar os percentuais de recuperação mássica de cada um dos principais componentes do bagaço de cana-de-açúcar.

3.4 EXPERIMENTOS REALIZADOS

O processo *organosolv* na ausência ou na presença de scCO₂ pode apresentar variações referentes aos seguintes parâmetros de processo: tipo de catalisador (ácido acético, ácido cítrico e ácido oxálico), quantidade de CO₂ (25, 35 e 50 g), tempo de reação, concentração do etanol em água (0 a 80%, v/v), temperatura entre 150 a 190 °C e concentração do melhor catalisador ácido (0,5 a 1,5%, m/v). Outras condições foram fixadas em 60 mL de volume total de reação, 6 g de BC_{LEE} e 500 rpm de agitação.

3.4.1 Definição do melhor catalisador

Testes experimentais foram realizados aplicando o processo *organosolv* sobre o bagaço de cana-de-açúcar, na ausência e na presença de scCO₂, para maximizar a remoção de lignina com o menor percentual de perdas de glucanas.

Os catalisadores empregados foram ácido acético, ácido cítrico e ácido oxálico nas concentrações de 1% (m/v) nas condições de 170 °C, 25 g de CO₂, 60% (v/v) de etanol em água e 60 min de reação. É importante ressaltar que cada experimento foi realizado em triplicata para avaliar a repetitividade dos resultados. A partir da identificação do melhor catalisador para remoção de lignina e recuperação de glucanas da fração insolúvel do material pré-tratado, testes foram realizados variando a quantidade de CO₂, o tempo de reação, a concentração de etanol em água, a temperatura e a concentração do melhor catalisador.

3.4.2 Definição da quantidade de CO₂

Testes foram realizados variando a quantidade de CO₂ em condições fixas de 170 °C, 60 min de reação, 60% (v/v) de etanol em água e 1% (m/v) do melhor catalisador. A quantidade de CO₂ foi calculada por meio da densidade obtida da base de dados NIST e do volume de CO₂ adicionado no reator.

3.4.3 Definição do tempo de reação

Experimentos de pré-tratamento foram realizados em tempos de 60 e 15 min de reação em condições fixas de 170 °C, 60% (v/v) de etanol em água, 1% (m/v) do melhor catalisador e 25 g de CO₂. Os experimentos de 15 min foram realizados para compreender o efeito da presença de CO₂ sobre a deslignificação, pois a sua contribuição não foi visível nos experimentos de 60 min de reação.

3.4.4 Definição da melhor proporção de etanol em água

Experimentos de pré-tratamento foram realizados com adições de 0% a 80% (v/v) em etanol em água, com as demais condições fixadas em 170 °C, 1% (m/v) do melhor catalisador na ausência e presença de 25 g de CO₂ por 15 min de reação.

3.4.5 Planejamento experimental

Baseado no pré-tratamento de melhor desempenho em relação à remoção da lignina e menor perda de glucanas da fração insolúvel, o efeito das variáveis de

temperatura, tempo de reação e concentração do melhor catalisador ácido foi investigado no processo de pré-tratamento *organosolv* do bagaço de cana-de-açúcar. Os experimentos foram realizados segundo um planejamento fatorial com três variáveis em dois níveis (2^3) com triplicata no ponto central, totalizando 11 experimentos conforme apresentado na TABELA 3.

TABELA 3 - NÍVEIS EXPERIMENTAIS UTILIZADOS NO PRÉ-TRATAMENTO ORGANOSOLV DE BAGAÇO DE CANA.

Variáveis	Níveis experimentais		
	Inferior (-1)	Superior (+)	Central (0)
Temperatura (°C)	150	190	170
Tempo (min)	0	30	15
Melhor catalisador % (m/v)	0,5	1,5	1,0

FONTE: A autora (2021).

3.5 RECUPERAÇÃO DA LIGNINA APÓS PRÉ-TRATAMENTO

Para a recuperação da lignina, foi necessário evaporar o solvente do licor de extração obtido no pré-tratamento. Cerca de 250 mL de água destilada foi adicionado ao licor de extração concentrado após evaporação do solvente para precipitação do material nela insolúvel. O material precipitado foi filtrado e seco em estufa a 60 °C por 24 h (SARKANEN, 1980). Algumas amostras dos precipitados obtidos foram então analisadas por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) com o intuito de interpretar se a sua impressão digital seria semelhante ao de ligninas técnicas. Os espectros foram obtidos no laboratório multiusuários do Departamento de Química da UFPR. As pastilhas foram preparadas na concentração de 1% (m/m) de lignina (base seca) em KBr e em seguida analisadas em espectroscopia no FTIR da marca Bomem, no modo transmitância na região de 400 a 4000 cm^{-1} .

3.6 ENSAIOS DE CARACTERIZAÇÃO DO SOBRENADANTE OBTIDO APÓS PRECIPITAÇÃO E RECUPERAÇÃO DA LIGNINA

As frações líquidas dos pré-tratamentos, após precipitação de lignina, foram

analisadas com base no protocolo NREL 510-42623 (SLUITER *et al.*, 2008d). As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 10000G. Com base no pH dos sobrenadantes, foi calculada a quantidade de ácido sulfúrico 72% (m/m) necessária para a diluição do ácido a 4% (m/m) de acordo com as tabelas fornecidas por Sluiter *et al.* (2008d), que foi posteriormente adicionada às alíquotas de 1 mL do meio. A pós-hidrólise foi então realizada a 105 °C por 90 min. Carboidratos e derivados furânicos (furfural e HMF) foram quantificados nessas alíquotas por HPLC (vide item 3.2.4)

A presença de fenólicos e compostos furânicos no sobrenadante da centrifugação foi analisada em espectrofotômetro da marca Global Analyzer, na região do ultravioleta e visível (UV-Vis). Os espectros foram adquiridos por varredura, na faixa de comprimentos de onda de 190 a 490 nm.

Sólidos solúveis totais também foram determinados por análise gravimétrica em todos os sobrenadantes, após centrifugação das frações líquidas de cada pré-tratamento. Após secagem em estufa de uma alíquota de 5 mL da amostra a 105 °C por 24 h, a massa seca obtida foi expressa em relação à massa seca do bagaço de cana-de-açúcar empregado em cada experimento.

3.7 REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO

As reações foram realizadas empregando o mesmo reator e as mesmas condições dos experimentos de pré-tratamento da seção 3.4.5. Experimentos complementares também foram realizados na ausência do bagaço de cana-de-açúcar para investigar a formação de ésteres a partir de ácidos orgânicos e etanol.

A ocorrência de esterificação durante o pré-tratamento foi caracterizada pela observação de mudanças na acidez do meio de reação. A acidez foi determinada por titulação empregando uma solução aquosa padronizada de NaOH a 0,1 mol/L como agente neutralizante e uma solução alcóolica contendo 1% de fenolftaleína como indicador. A solução de NaOH foi padronizada com biftalato de potássio e a acidez foi determinada por meio da Equação 10, onde V_{NaOH} é o volume de NaOH titulado para a neutralização (mL), MM_{ac} é a massa molar do ácido empregado no experimento (g/mol), CM_{NaOH} é a concentração molar da solução padronizada de NaOH (mol/L), 10 é o fator de correção de unidades e m_a é a massa empregada da

amostra coletada (g) para o cálculo da acidez.

$$Acidez = \frac{V_{NaOH} \cdot MM_{ac} \cdot CM_{NaOH}}{10 \cdot m_a} \quad (10)$$

A conversão em ésteres foi obtida por meio da Equação 11, onde A_i é a acidez inicial e A_f é a acidez final, foram determinadas em amostras coletadas antes e após a reação de esterificação, respectivamente.

$$Conversão (\%) = \frac{A_i - A_f}{A_i} \cdot 100 \quad (11)$$

3.8 ENSAIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

A hidrólise enzimática foi realizada apenas com o material oriundo das condições de pré-tratamento que forneceram o maior rendimento de deslignificação e a menor perda de glucanas, dentre aquelas incluídas no planejamento experimental descrito na seção 3.4.5.. A preparação enzimática Cellic CTec3 (Novozymes Latin America, Araucária, PR) foi avolumada em tampão de acetato de sódio 50 mmol/L com pH 5,2. Os experimentos foram realizados em triplicata por 96 h a 150 rpm em uma incubadora de agitação orbital a 50 °C, junto aos respectivos brancos do substrato e da enzima. A carga de substrato celulósico nos ensaios correspondeu a 1% em relação ao seu teor de glucanas. Alíquotas coletadas ao longo desses experimentos, nos tempos de 3, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 h, foram fervidas por 5 min em banho-maria, centrifugadas a 10000G e conduzidas para análise cromatográfica (HPLC) para a quantificação de glucose nos hidrolisados. Os rendimentos de hidrólise foram obtidos pela relação entre a quantidade de glucose recuperada na hidrólise e a quantidade inicial de glucose presente no material pré-tratado (RESCH *et al.*, 2015; FOCKINK *et al.*, 2018).

A atividade da enzima Cellic CTec3 foi determinada de acordo com a metodologia de Ghose (1987) adaptada por Schwald *et al.* (1998). Em um tubo de ensaio, 0,5 mL da diluição da enzima foram adicionados a 1 mL de tampão de acetato. Os tubos foram acondicionados em banho-maria a 50°C para depois receberem uma tira enrolada de papel filtro Whatman nº 1 (6 cm x 1 cm, 60 ± 0,5

mg) como substrato, com auxílio de uma pinça. Após por 1 h de incubação a 50°C, 3 mL de ácido-dinitrosalicílico (DNS) foram adicionados para interromper a reação. As amostras foram então colocadas em banho-maria em ebulição por 10 min, resfriadas à temperatura ambiente e submetidas à leitura de absorbância em espectrofotometria UV-Vis da Global Analyzer a 540 nm.

3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS E INCERTEZAS

Análises estatísticas foram realizadas empregando o programa Statistica® 10. Nessa plataforma, os resultados de composição química e rendimento teórico da fração insolúvel do material tratado foram submetidos ao Teste de Tukey (HSD) (*honestly significant difference*) para comparação das médias.

Os resultados de recuperação de glucanas e de deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar nos experimentos do planejamento fatorial (2³) e nas triplicatas no ponto central (seção 3.4.5) foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para compreensão dos efeitos das variáveis independentes envolvidas nesse estudo. Os resultados encontram-se apresentados na forma de gráficos de Pareto e dos gráficos dos valores preditos *versus* valores observados.

As medidas composicionais foram realizadas em triplicadas independentes na maioria dos experimentos e análises. Portanto, a incerteza analítica relatada foi o desvio padrão de tais repetições. No entanto, devido à complexidade das etapas analíticas e experimentais, a incerteza analítica foi baseada no erro tipo B de acordo com o Guia do NIST para avaliação e expressões de incerteza (TAYLOR e KUYATT, 1994). O tipo de erro B é baseado na experiência do analista com a referida técnica e, no caso, foi considerado o maior desvio padrão dos experimentos realizados para cada componente ou técnica.

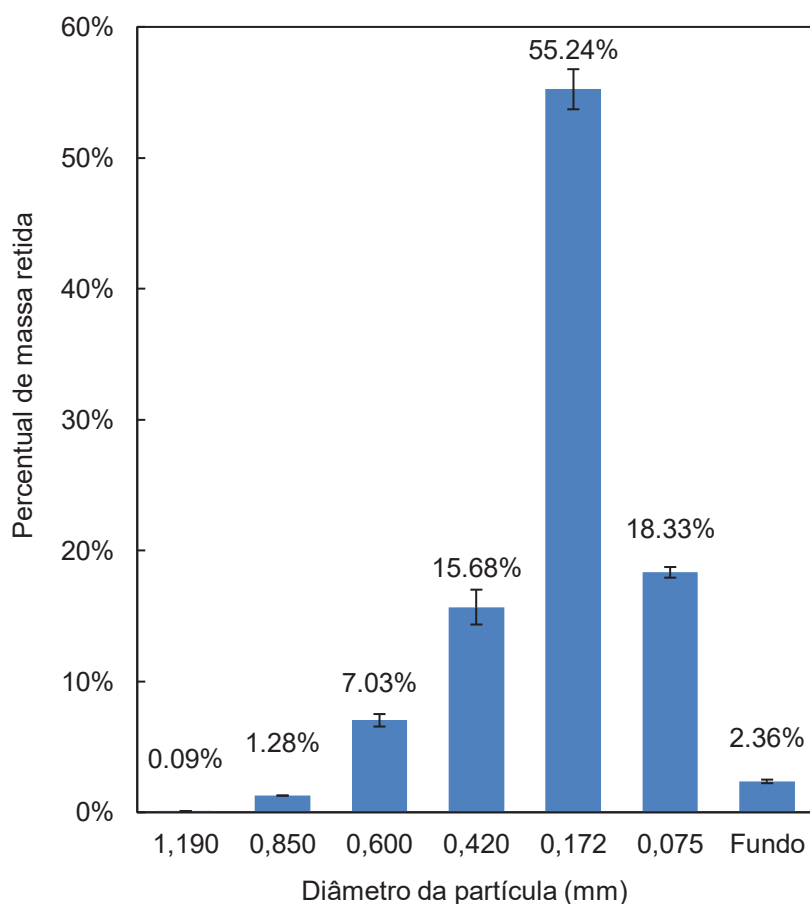
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

4.1.1 Análise granulométrica

Após o bagaço de cana-de-açúcar ser seco até umidade inferior a 10% e moído em moinho de facas ($< 1 \text{ mm}$), sua análise granulométrica foi realizada conforme descrito na seção 3.1. A FIGURA 14 apresenta os resultados obtidos nessa análise. A maioria das partículas se concentrou na malha de 0,172 mm, com diâmetro de partícula variando de menor que 0,42 mm a 0,172 mm. Com isso, o diâmetro médio das partículas do bagaço de cana-de-açúcar (Equação 2) utilizado nos ensaios foi de $0,28 \text{ mm} \pm 0,02 \text{ mm}$.

FIGURA 14 - DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.



FONTE: A autora (2021).

Geralmente, os sólidos, em relação aos líquidos e gases, demandam operações unitárias mais complexas, pois apresentam inúmeros formatos e diferentes tamanhos. Independente da forma na qual o sólido se encontra, é preciso encontrar meios para sua manipulação a fim de preservar suas características físico-químicas e melhorar o seu processamento (GOMIDE, 1983; CREMASCO, 2012).

Materiais lignocelulósicos também apresentam grande variabilidade no tamanho e nas dimensões de suas partículas, que podem apresentar propriedades físico-químicas distintas. Exemplo disso são os resíduos agrícolas e agroindustriais como o bagaço de cana-de-açúcar, que sofrem influência das condições empregadas durante a colheita, beneficiamento e processamento (JORDAN *et al.*, 2016). Por essa razão, o bagaço de cana-de-açúcar foi moído em malha de 1 mm com a finalidade de se ter controle sobre o tamanho das partículas e por ser esta uma condição ideal de operação do reator Parr, onde foram realizados os experimentos de pré-tratamento. Segundo Zhu *et al.* (2010), partículas menores facilitam a absorção do solvente e, conseqüentemente, aceleram o fracionamento da biomassa. Além disso, o processo de moagem tem como objetivo aumentar a superfície de contato da biomassa, melhorando a transferência de calor e massa no processo.

Após o fracionamento do bagaço de cana-de-açúcar para análise granulométrica, a amostra foi reconstituída para a realização dos experimentos de pré-tratamento.

4.1.2 Composição química do bagaço de cana-de-açúcar

Como parte do procedimento de caracterização, amostras de materiais lignocelulósicos devem ser submetidas à extração sequencial com água e etanol 95% (v/v) conforme descrito em 3.2.1. Esse procedimento leva à remoção de extraíveis para evitar que estes componentes venham a ser contabilizados como lignina solúvel em ácido, ou sofram reações de condensação entre si e com outras substâncias presentes no meio, gerando estruturas de maior massa molar que podem se comportar e serem contabilizadas de maneira errônea como lignina insolúvel em ácido (LIA). Nesse trabalho, a quantificação de lignina e dos principais monômeros presentes no bagaço de cana-de-açúcar foi realizada empregando a

metodologia de Sluiter *et al.* (2012). No procedimento, a composição da biomassa lignocelulósica é apresentada em relação aos teores de glucanas (majoritariamente celulose), hemiceluloses, lignina total, extraíveis e cinzas.

O bagaço de cana não tratado *foi* caracterizado após os processos de secagem e moagem, apresentando uma composição química majoritariamente constituída por 40% de glucanas, 24,5% de hemiceluloses, 24,0% de lignina total, 3,7% de extraíveis totais e 3,6% de cinzas (TABELA 4).

TABELA 4 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS BAGAÇOS DE CANA-DE-AÇÚCAR NÃO TRATADO E LIVRE DE EXTRAÍVEIS ETANÓLICOS.

Componente	Percentual (%)	
	Bagaço não tratado	(BC _{LEE})
Anidroglicose ¹	39,6 ± 1,0	39,3 ± 1,3
Anidroxilose ²	17,9 ± 0,2	17,8 ± 1,1
Anidroarabinose ²	1,3 ± 0,2	1,2 ± 0,1
Grupos acetila ²	5,3 ± 0,6	5,5 ± 0,1
Lignina insolúvel em ácido (LIA)	18,7 ± 0,2	17,6 ± 0,4
Lignina solúvel em ácido (LSA)	5,3 ± 0,1	5,4 ± 0,2
Extraíveis totais	3,7 ± 0,2	1,90 ± 0,04
Água	2,2 ± 0,2	1,4 ± 0,2
Etanol	1,72 ± 0,05	0,5 ± 0,1
Cinzas	3,6 ± 0,9	3,1 ± 0,3
Total	95,4	91,8
Total de glucanas	40 ± 1	39 ± 1
Total de hemiceluloses ³	24,5 ± 0,2	24,7 ± 0,6
Total de lignina	24,0 ± 0,2	23,0 ± 0,2

¹ Presente como componente das β-(1-4)-D-glucanas (celulose) e quantificada como glucose em meio aquoso;

² Presentes nas hemiceluloses e quantificados como xilose, arabinose e ácido acético em meio aquoso;

³ Somatória dos teores de anidroxilose, anidroarabinose e grupo acetila;

FONTE: A autora (2021).

Para os experimentos de pré-tratamento, o material não tratado foi submetido à extração com etanol 95% (v/v) em sistema Soxhlet, originando um material livre de extrato etanólico (BC_{LEE}) conforme descrito na seção 3.3. O teor de extraíveis em

etanol 95% (v/v) da amostra foi de $1,9\% \pm 0,2\%$. Essa remoção dos extraíveis evita a quantificação erroneamente da lignina insolúvel em ácido (LIA) e, assim, permite a avaliação dos efeitos do pré-tratamento sobre a estrutura química do bagaço de cana-de-açúcar (TABELA 4). O bagaço de cana-de-açúcar livre de extrato etanólico (BC_{LEE}), que foi utilizado nos ensaios de pré-tratamento, apresentou teores de 39% de glucanas, 24,7% de hemiceluloses e 23,0% de lignina total. Embora, esse bagaço tenha passado pelo processo de lavagem com etanol (95%) via Soxhlet por 12 h, ainda apresentou em sua composição química 0,5% de extraíveis etanólicos. Isso provavelmente se deve à grande massa de bagaço que foi empregada para extração em um sistema Soxhlet de 500 mL. Assim, os 12 ciclos de extração empregados no ensaio não foram suficientes para remover a totalidade dos extraíveis etanólicos presentes no bagaço.

A TABELA 5 exibe uma comparação entre os resultados obtidos neste trabalho com outros encontrados na literatura para os principais componentes dos bagaços tanto não tratado (Qiu *et al.*, 2012; Szczerbowski *et al.*, 2014) quanto livre de extraíveis etanólicos (Silveira *et al.*, 2015b; Neves *et al.*, 2016), usando o mesmo procedimento de extração. Vale ainda ressaltar que os quatro trabalhos utilizados como referência foram baseados em bagaços obtidos de processos industriais.

Para o bagaço de cana-de-açúcar não tratado, os valores obtidos de glucanas, hemiceluloses e cinzas foram coerentes com os obtidos por Qiu *et al.* (2012) e Szczerbowski *et al.* (2014). Já o teor de lignina insolúvel em ácido se revelou menor do que os valores apresentados por esses autores, possivelmente porque o seu teor de cinzas foi descontado, enquanto Szczerbowski *et al.* (2014) não realizou esse procedimento e Qiu *et al.* (2012) não forneceu essa informação. Por outro lado, o valor de lignina solúvel em ácido do bagaço não tratado apresentou resultado maior do que os encontrados nessas mesmas referências. A grande diferença na quantificação de lignina solúvel em ácido é provavelmente devida a variações da metodologia em relação ao comprimento de onda usado na análise por espectrofotometria na região UV-Vis para leitura da absorbância e, bem como da absorvidade da lignina de bagaço de cana-de-açúcar que deve ser utilizada nos cálculos relativos à Lei de Lambert-Beer. Qiu *et al.* (2012) informaram que seguiram as normas da NREL, porém, essas normas foram revisadas diversas vezes ao longo dos anos, enquanto Szczerbowski *et al.* (2014) optaram pelo método descrito por

Gomide e Demuner (1986), que é baseado no uso dos comprimentos de onda de 215 e 280 nm. No presente trabalho, o comprimento de onda empregado foi de 240 nm, de acordo com a última atualização do método NREL publicado por Sluiter *et al.* (2012). Além disso, as variações observadas na composição química do bagaço podem ser atribuídas a fatores como a qualidade do solo, ao clima e a tecnologia de colheita e processamento da cana-de-açúcar.

TABELA 5 - COMPARAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR EM RELAÇÃO AOS DADOS DISPONÍVEIS NA LITERATURA.

Componente (%) ¹	Este trabalho		Qiu <i>et al.</i> (2012)	Szczerbowski <i>et al.</i> (2014)	Silveira <i>et al.</i> (2015b)	Neves <i>et al.</i> (2016)
	não tratado	BC _{LEE}				
Glucanas	39,6	39,3	40,9	37,7	44,8	38,7
Hemiceluloses ²	24,5	24,7	22,6	27,2	20,2	26,3
Lignina insolúvel em ácido (LIA)	18,7	17,6	20,8	20,4	29,9	20,0
Lignina solúvel em ácido (LSA) ³	5,3 (240)	5,4 (240)	4,0 (n.i.)	0,2 (215 e 280)	0,03 (240)	0,5 (210 e 280)
Cinzas	3,6	3,1	1,4	6,5	6,5	3,8

¹ Valor expresso em relação à massa seca do bagaço;

² Somatória dos teores de anidroxilose, anidroarabinose e grupos acetil;

³ Valores entre parênteses correspondem ao comprimento de onda (nm) em que as análises foram realizadas; n.i. = não informado.

FONTE: A autora (2021).

A composição química do BC_{LEE} foi comparada com os valores fornecidos por Silveira *et al.* (2015b) e Neves *et al.* (2016). Os teores de glucanas (majoritariamente celulose) e hemiceluloses apresentaram-se coerentes com os dados da literatura. Já o teor de lignina insolúvel em ácido se revelou menor, possivelmente porque o teor de cinzas presente na lignina insolúvel em ácido também foi descontado nesses experimentos. A lignina solúvel em ácido do BC_{LEE} foi maior do que a encontrada por outros autores (TABELA 5). Silveira *et al.* (2015b) seguiram o método proposto por Sluiter *et al.* (2011) ao considerar o valor de 15 L/g·cm para a absortividade da lignina de bagaço de cana-de-açúcar no cálculo da LSA, enquanto a metodologia empregada no presente trabalho considera a absortividade de 25 L/g·cm. Esse último valor, proposto por Sluiter *et al.* (2012), corresponde à versão mais atualizada da norma anterior, sendo que, em ambas as metodologias, o comprimento de onda

empregado foi em 240 nm. Já Neves *et al.* (2016) empregaram a norma NREL/TP-510-42621 (SLUITER *et al.*, 2008e), que é baseada nos comprimentos de onda de 210 e 280 nm.

O conjunto de métodos analíticos da NREL tem como objetivo de aumentar a acurácia dos procedimentos de determinação da composição de matérias-primas lignocelulósicas. Nesse sentido, a quantificação de LSA é um dos procedimentos que mais tem sido revisado desde a sua criação. Esse método emprega espectrofotometria na região UV-Vis para medir LSA em hidrolisados ácidos de biomassa. Para isso, os cálculos devem levar em conta valores de absortividade da lignina específicos para o tipo de biomassa empregada no ensaio, cujo valor depende do comprimento de onda empregado. Como o método sofre com a interferência de produtos de desidratação de carboidratos, várias atualizações do método buscam identificar comprimentos de onda que minimizem estas interferências. Segundo a última atualização da norma, descrita por Sluiter *et al.* (2012), a determinação de LSA em bagaço de cana-de-açúcar deve ser feita a 240 nm e os cálculos devem empregar uma absortividade da lignina de 25 L/g·cm. Já normas anteriores, como a descrita em Sluiter *et al.* (2008e), se baseia na subtração da absorbância obtida de dois comprimentos de onda distintos, 210 e 280 nm, onde o primeiro é característico da lignina e o segundo sofre interferência da presença de compostos furânicos.

4.2 PRÉ-TRATAMENTO ORGANOSOLV NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO

4.2.1 Definição do melhor catalisador

Os experimentos iniciais de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar foram realizados empregando etanol em meio aquoso na ausência e na presença de catalisadores ácidos (ácido acético, ácido cítrico e ácido oxálico), assistidos ou não por scCO₂, para verificação do melhor desempenho na deslignificação e na recuperação de glucanas. Esses experimentos foram realizados nas seguintes condições: 170 °C, 25 g de CO₂, 1% (m/v) de catalisador, 60 min de reação, 500 rpm e uma relação sólido:líquido de 1:10 (6 g de BC_{LEE} para 60 mL de solvente), empregando uma concentração de 60% (v/v) de etanol em água.

Os controles e perfis de temperatura e pressão do reator para esses experimentos estão apresentados no APÊNDICE A (TABELA A1 e FIGURA A1). O reator levou entre 18 e 28 min para atingir 170 °C, ao que se seguiu a contagem do tempo de reação de 60 min. Cada experimento apresentou uma rampa de aquecimento específica, que dependeu das condições experimentais. Experimentos na ausência de CO₂ demoraram mais para aquecer e atingir a temperatura desejada do que os experimentos na presença de CO₂. A presença do CO₂ absorve o calor causando um “efeito estufa” no reator, além de que um aumento na temperatura eleva a pressão de vapor do solvente, aumentando sua solubilidade no fluido supercrítico. Após a reação de 60 min, o reator foi resfriado até aproximadamente 30 °C e então a despressurização foi realizada.

Os rendimentos de recuperação mássica da fração insolúvel (fração sólida), obtida após cada experimento de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar, estão apresentados na TABELA 6. A recuperação mássica do pré-tratamento demonstra que o emprego de catalisadores, principalmente dos ácidos cítrico e oxálico, causaram uma degradação dos principais componentes do bagaço de cana-de-açúcar. A maior perda mássica foi observada no experimento com etanol e ácido oxálico (sem CO₂), com uma recuperação da fração insolúvel de $50 \pm 2\%$ em base seca. Em seguida, a maior perda mássica da fração insolúvel foi obtida no pré-tratamento com etanol e ácido oxálico assistido por CO₂, com uma recuperação mássica de $56 \pm 6\%$. Esses altos valores de perda mássica da fração insolúvel são devido ao emprego do ácido oxálico como catalisador, pois este é o ácido mais forte dentre os estudados neste trabalho. Seu pK_{a1} é de 1,22, enquanto os ácidos cítrico e acético apresentam pK_{a1} de 3,13 e 4,80, respectivamente. Portanto, as perdas mássicas foram majoritariamente relacionadas à hidrólise das hemiceluloses e à solubilidade parcial da lignina na fração solúvel do pré-tratamento. Em ácidos próticos, a acidez é quantificada através do pK_a, sendo que o ácido mais forte é aquele que possui menor pK_{a1}, ou seja, o que doa/transfere o próton com maior facilidade.

Qin *et al.* (2012) e Qiao *et al.* (2019) relataram que o emprego dos ácidos oxálico e cítrico diluídos no pré-tratamento de palha e sabugo de milho apresentou bons resultados na remoção de hemiceluloses e lignina e na recuperação de glucanas da matriz celulósica. Segundo Qiao *et al.* (2019), o pK_{a1} de ácidos

orgânicos é influenciado pela quantidade de grupos carboxílicos, pelo distanciamento entre eles e pela presença de outros grupos funcionais na molécula. À medida que o comprimento da cadeia do ácido aumenta, a solubilidade em água diminui e o pK_{a1} aumenta. Assim, o ácido oxálico (pK_{a1} de 1,22) é um ácido mais forte que os ácidos cítrico e acético. No entanto, o ácido cítrico (pK_{a1} de 3,13) também pode apresentar bom desempenho catalítico, pois, embora possua um comprimento da cadeia maior que os outros ácidos orgânicos testados, apresenta três grupos carboxílicos (-COOH) e um grupo hidroxila (OH) em sua estrutura. O ácido acético é um ácido monocarboxílico, sendo o mais fraco dentre os utilizados neste trabalho (pK_a de 4,8).

A TABELA 6 apresenta os resultados para os principais componentes presentes nos substratos pré-tratados, em comparação ao BC_{LEE} de origem. Os teores de anidroglicose foram maiores no material pré-tratado, enquanto o oposto foi observado para o teor de anidroxilose, LIA e LSA, indicando que a maior parte desses componentes (hemiceluloses e lignina) foram hidrolisados e liberados nas frações solúveis após o pré-tratamento. Não foram detectados valores de anidroarabinose em nenhuma das amostras pré-tratadas e os pré-tratamentos realizados na presença dos ácidos cítrico e oxálico, tanto na ausência como na presença de CO_2 , resultaram na desacetilação completa das hemiceluloses (FIGURA 15 (A) e FIGURA 16 (A)). Os valores de anidroglicose, anidroxilose e LIA variaram de acordo com a força ácida de cada ácido empregado (FIGURA 15 (B) e FIGURA 16 (B)). O ácido oxálico, que é o ácido mais forte, apresentou um teor de anidroglicose maior que os pré-tratamentos baseados nos ácidos cítrico e acético, enquanto a ausência de catalisador exógeno resultou no menor teor desse componente. Essa mesma tendência foi seguida pela remoção de anidroxilose e LIA, que aumentou conforme o aumento da força ácida dos catalisadores, embora muitos desses valores não se tenham diferenciado estatisticamente. A menor remoção desses componentes foi observada em pré-tratamentos realizados com ácido acético e na ausência de catalisador exógeno.

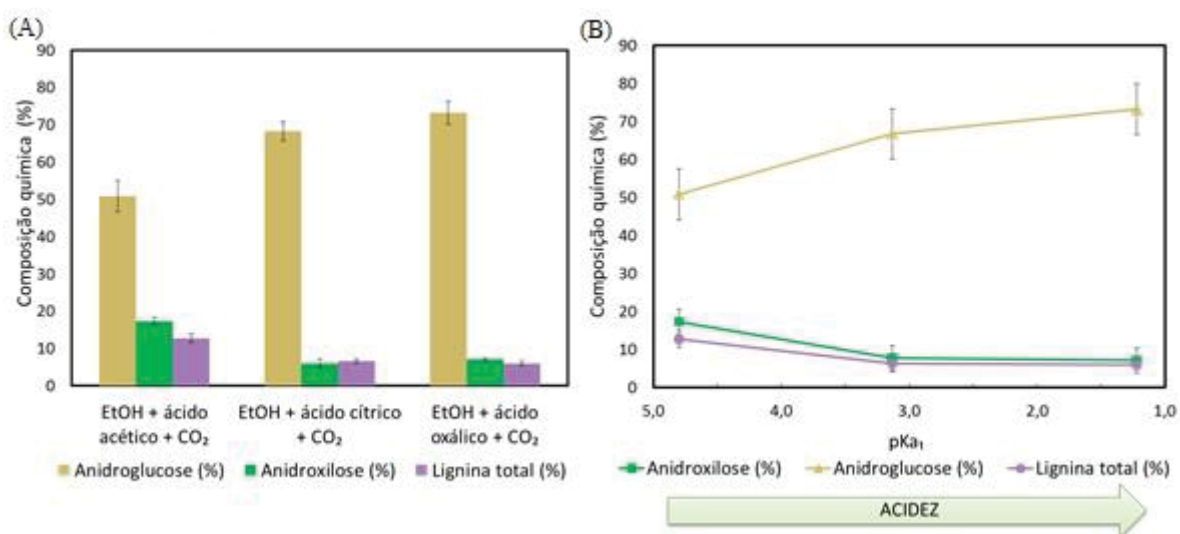
TABELA 6 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA E RENDIMENTOS TEÓRICOS DA FRAÇÃO INSOLÚVEL DOS BAGAÇOS DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADOS EM 170 °C, 25 g DE CO₂, 60% (v/v) DE ETANOL EM ÁGUA EM 60 min DE REAÇÃO PARA DEFINIÇÃO DO MELHOR CATALISADOR.

Amostra	R _M (%)	AnGlc ¹	AnXyl ²	AnAra ²	Grupos acetila ²	LIA	LSA	Lignina total ³
Composição química da fração sólida (%)								
Bagaço de cana livre de extraíveis (BC _{LEE})	39 ± 1	18 ± 1	18 ± 1	1,2 ± 0,1	5,5 ± 0,1	17,6 ± 0,4	5,4 ± 0,2	23,0 ± 0,2
EtOH + CO ₂	82 ± 2	46 ± 3 ^b	18 ± 1 ^c	a.l.d.	2,5 ± 0,5 ^b	10,9 ± 0,3 ^c	4,9 ± 0,2 ^c	15,8 ± 0,4 ^d
EtOH + ácido acético + CO ₂	77 ± 5	51 ± 4 ^c	17 ± 1 ^c	a.l.d.	2,4 ± 0,4 ^b	8,0 ± 0,9 ^b	4,8 ± 0,3 ^c	13 ± 1 ^c
EtOH + ácido cítrico + CO ₂	57 ± 5	67 ± 3 ^{a,b}	8 ± 3 ^{a,b}	a.l.d.	a.l.d. ^a	3,8 ± 0,3 ^a	3,1 ± 0,6 ^{a,b}	6,9 ± 0,6 ^a
EtOH + ácido oxálico + CO ₂	56 ± 6	73 ± 3 ^a	7,1 ± 0,4 ^{a,b}	a.l.d.	a.l.d. ^a	3,3 ± 0,4 ^a	2,4 ± 0,2 ^a	5,7 ± 0,6 ^a
EtOH (sem CO ₂)	72 ± 3	52 ± 1 ^b	12,9 ± 0,3 ^a	a.l.d.	1,67 ± 0,02 ^b	11,88 ± 0,02 ^c	4,4 ± 0,1 ^a	16,3 ± 0,1 ^a
EtOH + ácido acético (sem CO ₂)	69 ± 2	53 ± 2 ^{b,c}	12 ± 1 ^b	a.l.d.	1,6 ± 0,4 ^b	8,6 ± 0,6 ^b	4,1 ± 0,2 ^{b,c}	13 ± 1 ^{c,d}
EtOH + ácido cítrico (sem CO ₂)	58 ± 4	64 ± 5 ^{a,b}	7 ± 2 ^{a,b}	a.l.d.	a.l.d. ^a	6,2 ± 0,2 ^b	3,3 ± 0,8 ^{a,b}	9,5 ± 0,6 ^b
EtOH + ácido oxálico (sem CO ₂)	50 ± 2	72 ± 1 ^a	4,1 ± 0,6 ^a	a.l.d.	a.l.d. ^a	3,5 ± 0,4 ^a	2,8 ± 0,3 ^{a,b}	6,3 ± 0,6 ^a
Rendimentos teóricos da fração sólida (%)								
EtOH + CO ₂	96 ± 4 ^a	84 ± 4 ^{b,c}	a.l.d.	a.l.d.	33,9 ± 0,3 ^c	51 ± 1 ^a	74 ± 4 ^{b,c}	56 ± 2 ^a
EtOH + ácido acético + CO ₂	100 ± 3 ^a	76 ± 6 ^c	a.l.d.	a.l.d.	34 ± 5 ^c	35 ± 3 ^c	68 ± 5 ^c	43 ± 4 ^c
EtOH + ácido cítrico + CO ₂	97 ± 6 ^a	19 ± 2 ^{a,b}	a.l.d.	a.l.d.	a.l.d. ^a	12 ± 2 ^a	28 ± 5 ^a	16 ± 3 ^{a,b}
EtOH + ácido oxálico + CO ₂	99 ± 2 ^a	25 ± 5 ^a	a.l.d.	a.l.d.	a.l.d. ^a	10 ± 1 ^a	25 ± 2 ^a	14,4 ± 0,3 ^a
EtOH (sem CO ₂)	96 ± 2 ^a	52 ± 3 ^a	a.l.d.	a.l.d.	21,8 ± 0,6 ^a	49 ± 2 ^a	58 ± 1 ^a	51 ± 2 ^a
EtOH + ácido acético (sem CO ₂)	94 ± 3 ^a	43 ± 3 ^b	a.l.d.	a.l.d.	20 ± 5 ^b	34 ± 3 ^c	53 ± 4 ^b	38 ± 3 ^c
EtOH + ácido cítrico (sem CO ₂)	94 ± 4 ^a	26 ± 3 ^a	a.l.d.	a.l.d.	a.l.d. ^a	20 ± 1 ^b	30 ± 1 ^a	24 ± 3 ^b
EtOH + ácido oxálico (sem CO ₂)	93 ± 6 ^a	12 ± 2 ^c	a.l.d.	a.l.d.	a.l.d. ^a	10 ± 1 ^a	26 ± 2 ^a	14 ± 1 ^a

R_M, recuperação mássica do pré-tratamento, ou (m_{final}/m_{inicial}). 100 em base seca;
¹ AnGlc; anidroglicose; presente como componente das β-(1→4)-D-glucanas (celulose), quantificada como glucose em meio aquoso;
² AnXyl, anidroxilose; AnAra, anidroarabinose; presentes como componentes das hemiceluloses, quantificadas como xilose e arabinose em meio aquoso;
³ Somatários da lignina insolúvel em ácido e lignina solúvel em ácido;
a.l.d., abaixo do limite de detecção.
LIA, lignina insolúvel em ácido e LSA = Lignina solúvel em ácido;
Teste Tukey = médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, a 5 % de probabilidade.

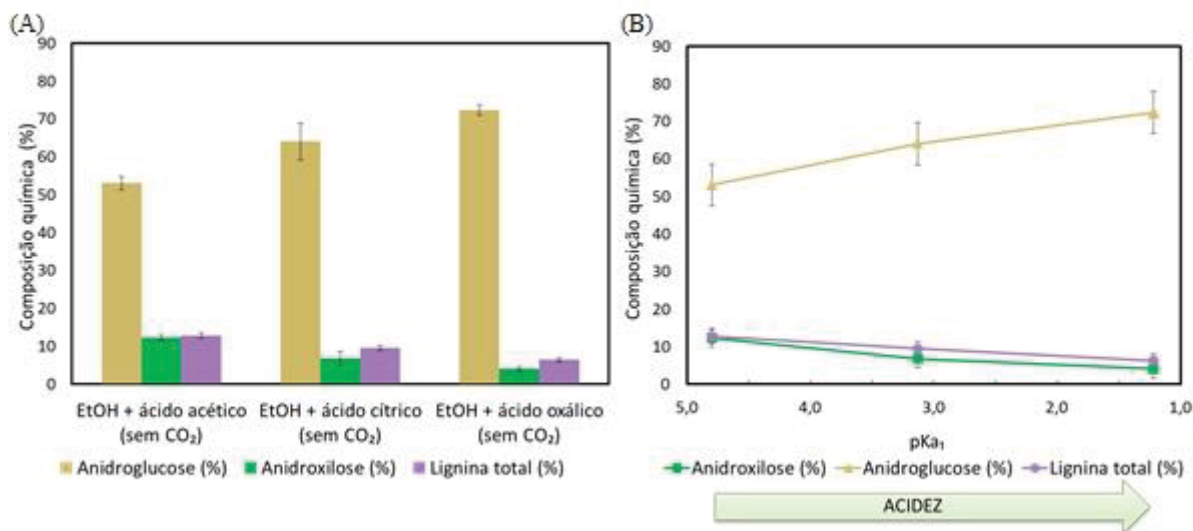
FONTE: A autora (2021).

FIGURA 15 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO INSOLÚVEL DOS BAGAÇOS DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADOS (A) E DE SUA RELAÇÃO COM ACIDEZ (B) EMPREGANDO DIFERENTES CATALISADORES ÁCIDOS NA PRESENÇA DE CO₂.



FONTE: A autora (2021).

FIGURA 16 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO INSOLÚVEL DOS BAGAÇOS DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADOS (A) E DE SUA RELAÇÃO COM ACIDEZ (B) EMPREGANDO DIFERENTES CATALISADORES ÁCIDOS NA AUSÊNCIA DE CO₂.

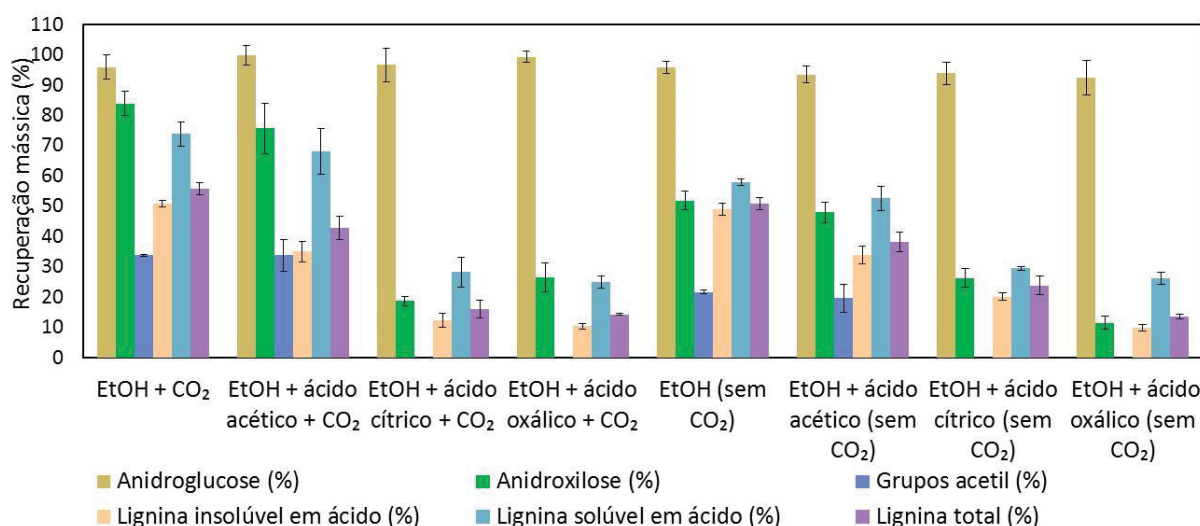


FONTE: A autora (2021).

A partir dos principais componentes quantificados nas amostras de bagaço pré-tratado e das suas respectivas recuperações mássicas (R_M), foram calculados os rendimentos teóricos que se encontram apresentados na TABELA 6 e FIGURA 17. Para a fração insolúvel do pré-tratamento, o alto rendimento de recuperação de anidroglucose nos bagaços pré-tratados com etanol hidratado e catalisadores

ácidos, na ausência ou presença de CO₂, indica que a celulose não sofreu hidrólise em grande extensão, sendo que o mesmo não ocorreu para os teores de hemiceluloses e lignina. O uso de etanol mais ácido oxálico (sem CO₂) e etanol mais ácido cítrico na presença de CO₂ apresentaram os maiores rendimentos de remoção de hemiceluloses, que foram de $88 \pm 2\%$ e $81 \pm 2\%$, respectivamente (FIGURA 17). Os maiores rendimentos de deslignificação ocorreram nos pré-tratamentos utilizando etanol e ácido oxálico na ausência e na presença de CO₂, com uma remoção média de lignina de $86 \pm 1\%$ e $85,6 \pm 0,3\%$, respectivamente. Consequentemente, o melhor catalisador para o pré-tratamento foi o ácido oxálico, pois apresentou altos teores de deslignificação com altos índices de recuperação de anidroglicose. A aplicação do teste de Tukey sobre os rendimentos de deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar demonstraram que a injeção de 25 g de CO₂ em experimentos realizados a 170°C por 60 min não produziu efeitos estatisticamente significativos (TABELA 6). As médias de retenção de lignina total na fração insolúvel dos pré-tratamentos que empregaram o mesmo ácido, na ausência ou na presença de CO₂, não diferiram significativamente entre si a um nível de 5 % de probabilidade.

FIGURA 17 - RENDIMENTOS DE RECUPERAÇÃO MÁSSICA DOS PRINCIPAIS COMPONENTES DA FRAÇÃO INSOLÚVEL DOS BAGAÇOS DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADOS EM 170 °C, 25 g DE CO₂, 60% (v/v) DE ETANOL EM ÁGUA EM 60 min DE REAÇÃO PARA DEFINIÇÃO DO MELHOR CATALISADOR.



Anidroglicose, presente como componente das β -(1→4)-D-glucanas (celulose), quantificada como glicose em meio aquoso;

Anidroxilose, presentes como componentes das hemiceluloses, quantificadas como xilose em meio aquoso;

FONTE: A autora (2021).

Kalogiannis *et al.* (2018) estudaram o fracionamento de serragem de madeira de faia usando processo *organosolv* com diferentes catalisadores ácidos a 175 °C por 60 min de reação. O pré-tratamento com 60% de etanol e 1% de ácido oxálico levaram a uma deslignificação de 75,8%. Esse resultado de deslignificação foi inferior ao obtido neste trabalho com etanol e ácido oxálico, em condições experimentais bastante similares.

Durante o pré-tratamento com solventes orgânicos, catalisadores ácidos são adicionados para aumentar a taxa de remoção das hemiceluloses e auxiliar na quebra de ligações lábeis da lignina, facilitando assim a sua fragmentação. A degradação da lignina é decorrente de reações como hidrólise ácida e clivagem homolítica. Essas reações levam à quebra de ligações aril éter dos tipos α -O-4' e β -O-4', promovendo a liberação de oligômeros de baixa massa molar e de compostos fenólicos altamente reativos em função da presença de hidroxilas alifáticas e aromáticas (ZHANG *et al.*, 2016). Neste trabalho, o emprego de ácidos orgânicos levou aos maiores níveis de deslignificação do bagaço de cana em relação aos pré-tratamentos realizados na sua ausência. Os experimentos com etanol assistido por scCO₂ apresentaram uma taxa de deslignificação de $44 \pm 2\%$, que aumentou para $57 \pm 4\%$, $84 \pm 3\%$ e $85,6 \pm 0,3\%$ na presença dos ácidos acético, cítrico e oxálico, respectivamente.

Kim, T H. *et al.* (2019) avaliaram a influência do uso de catalisadores ácidos no pré-tratamento *organosolv*, sendo que a temperatura, o tempo de reação e a concentração de etanol foram fixados em 180 °C, 60 min e 60% (v/v), respectivamente. A presença do ácido não alterou significativamente o percentual de recuperação de glucanas. Por outro lado, os rendimentos de extração de xilanas e lignina foram drasticamente melhorados sob catálise ácida, confirmando as tendências observadas no presente trabalho.

Os pré-tratamentos empregando catalisadores ácidos levaram a uma hidrólise mais efetiva das hemiceluloses, em comparação aos tratamentos que ocorreram na ausência de catalisadores exógenos. Contudo, a recuperação de glucanas da fração insolúvel se manteve alta em todos os casos. Os teores de furfural e hidroximetilfurfural (HMF) descritos na TABELA 7 para a composição química da fração solúvel correspondem aos produtos de desidratação de pentoses e hexoses,

formados durante o pré-tratamento. O furfural é formado pela hidrólise e desidratação de unidades de xilose e arabinose presentes nas hemiceluloses. No entanto, os teores de furfural não podem ser considerados absolutos devido a sua volatilidade, que pode ter levado a perdas durante a despressurização do reator e a redução de volume por evaporação. Os teores de furfural foram próximos nos pré-tratamentos que empregaram o mesmo catalisador ácido na ausência e na presença de CO₂ (TABELA 7) e a mesma tendência foi observada nos experimentos realizados na ausência de catalisador. Isso pode ser atribuído ao fato da quantidade de CO₂ (25 g) injetada no reator ter sido insuficiente para produzir furfural via reações de desidratação de xilose e arabinose. Segundo Kumar *et al.* (2009) uma das vantagens do emprego de scCO₂ em pré-tratamento é a baixa formação de compostos inibidores às etapas de fermentação como o furfural e o HMF. O pré-tratamento com etanol e ácido oxálico na ausência de CO₂ foi o único a apresentar quantidades detectáveis de HMF na composição química da fração solúvel, indicando a desidratação parcial de hexoses como a glucose. Conforme já mencionado, o ácido oxálico é o mais forte dentre os ácidos estudados e por isso facilitou a remoção de hexoses da fração sólida, levando a uma maior formação de HMF na fração líquida.

A recuperação mássica de carboidratos na fração solúvel do pré-tratamento foi calculada e os resultados se encontram apresentados na TABELA 8. Esses valores foram expressos em relação à composição química do material de origem. Quando comparados os experimentos realizados na ausência e na presença de CO₂ em relação à recuperação mássica de anidrogucose na fração líquida, os valores foram similares entre pré-tratamentos realizados com o mesmo catalisador ácido, bem como na ausência de catalisador, com exceção dos experimentos em que o ácido acético foi empregado. O emprego de ácido oxálico em etanol hidratado aumentou a presença de glucose na fração solúvel em relação aos outros experimentos. Tais rendimentos foram de $1,90 \pm 0,08\%$ e $2,1 \pm 0,2\%$ para os experimentos realizados com e sem CO₂, respectivamente. O emprego dos ácidos cítrico e oxálico resultou em maiores recuperações mássicas de anidroxilose e anidroarabinose que o uso de ácido acético, por ser esse o ácido mais fraco dentre os estudados.

TABELA 7 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS DOS PRÉ-TRATAMENTOS EM 170 °C, 60% (v/v) DE ETANOL EM ÁGUA E 25 g DE CO₂ EM 60 min DE REAÇÃO.

Amostra	Composição química (g/L)					Carboidratos totais (%) ³	
	HMF	Furfural	AnGlc ¹	AnXyl ²	AnAra ²		Grupos acetila ²
EtOH + CO ₂	a.l.d.	0,07 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,22 ± 0,02	0,08 ± 0,01	0,16 ± 0,04	2,5 ± 0,1
EtOH + ácido acético + CO ₂	a.l.d.	0,08 ± 0,01	0,033 ± 0,005	0,5 ± 0,2	0,088 ± 0,002	0,17 ± 0,13	2,9 ± 0,2
EtOH + ácido cítrico + CO ₂	a.l.d.	0,24 ± 0,02	0,133 ± 0,004	2,7 ± 0,2	0,15 ± 0,02	0,268 ± 0,004	13,43 ± 0,08
EtOH + ácido oxálico + CO ₂	a.l.d.	0,25 ± 0,03	0,17 ± 0,01	1,4 ± 0,3	0,09 ± 0,02	0,293 ± 0,004	8,0 ± 0,1
EtOH (sem CO ₂)	a.l.d.	0,07 ± 0,01	0,066 ± 0,005	0,70 ± 0,04	0,037 ± 0,002	0,13 ± 0,02	3,6 ± 0,3
EtOH + ácido acético (sem CO ₂)	a.l.d.	0,09 ± 0,02	0,055 ± 0,005	1,6 ± 0,5	0,040 ± 0,001	0,24 ± 0,01	7,4 ± 0,4
EtOH + ácido cítrico (sem CO ₂)	a.l.d.	0,22 ± 0,04	0,15 ± 0,04	1,3 ± 0,2	0,13 ± 0,01	0,28 ± 0,04	7,5 ± 0,4
EtOH + ácido oxálico (sem CO ₂)	0,005 ± 0,001	0,23 ± 0,01	0,18 ± 0,03	2,1 ± 0,1	0,135 ± 0,005	0,20 ± 0,03	11,0 ± 0,1

¹ AnGlc, anidroglicose; presente como componente das β-(1→4)-D-glucanas (celulose), quantificada como glucose em meio aquoso;

² AnXyl, anidroxilose; AnAra: anidroarabinose; presentes como componentes das hemiceluloses, quantificadas como xilose e arabinose em meio aquoso;

³ Soma de todos os carboidratos identificados na fração solúvel aquosa em relação à massa inicial do BC_{LEE}, incluindo o percentual atribuído aos compostos furânicos (HMF e furfural) do meio;
a.l.d., abaixo do limite de detecção;
HMF, Hidroximetilfurfural.

FONTE: A autora (2021).

TABELA 8 - RECUPERAÇÃO MÁSSICA DOS CARBOIDRATOS DA FRAÇÃO SOLÚVEL DOS PRÉ-TRATADOS EM 170 °C, 25 g DE CO₂, 60% (v/v) DE ETANOL EM ÁGUA EM 60 min DE REAÇÃO PARA DEFINIÇÃO DO MELHOR CATALISADOR.

Amostra	Recuperação mássica da fração líquida (%)			
	AnGlc ¹	AnXyl ²	AnAra ²	Grupos acetila ²
EtOH + CO ₂	0,5 ± 0,1	9 ± 1	29 ± 3	7 ± 1
EtOH + ácido acético + CO ₂	0,4 ± 0,1	12,4 ± 0,1	31 ± 1	7,4 ± 1,2
EtOH + ácido cítrico + CO ₂	1,46 ± 0,04	53 ± 4	54 ± 6	21,2 ± 0,1
EtOH + ácido oxálico + CO ₂	1,90 ± 0,08	36 ± 3	32 ± 3	22,9 ± 0,3
EtOH (sem CO ₂)	0,7 ± 0,1	17 ± 1	11,2 ± 0,3	10 ± 2
EtOH + ácido acético (sem CO ₂)	0,60 ± 0,06	30 ± 3	26 ± 3	19 ± 0,5
EtOH + ácido cítrico (sem CO ₂)	1,7 ± 0,4	34 ± 3	46 ± 4	22 ± 3
EtOH + ácido oxálico (sem CO ₂) ³	2,1 ± 0,2	50,6 ± 0,4	47 ± 2	15 ± 3

¹ AnGlc, anidroglicose; presente como componente das β-(1→4)-D-glucanas (celulose) w quantificada como glucose em meio aquoso;

² AnXyl, anidroxilose; AnAra: anidroarabinose; presentes como componentes das hemiceluloses e quantificadas como xilose, arabinose e ácido acético em meio aquoso; o produto da reação de desidratação de pentoses (furfural) também foi considerado nos cálculos;

³ O produto da reação de desidratação de hexoses (HMF) também foi considerado nos cálculos de AnGlc.

FONTE: A autora (2021).

A TABELA 9 contém os resultados de sólidos totais solúveis e os valores de recuperação mássica da fração insolúvel de cada pré-tratamento, além do percentual de lignina recuperada do licor de extração e da somatória de todas as frações obtidas. O pré-tratamento com ácido oxálico assistido por scCO₂ gerou um menor valor de sólidos totais solúveis do que o realizado na ausência de CO₂, diferentemente dos outros experimentos que empregaram os ácidos acético e cítrico com e sem CO₂, em que tais valores foram próximos entre si. Essa diferença nos resultados de sólidos solúveis para os experimentos com ácido oxálico pode estar relacionada a uma maior recuperação da lignina da fração solúvel do pré-tratamento assistido por scCO₂ (7 ± 1%). Os experimentos que apresentaram maiores resultados de sólidos totais solúveis foram realizados com etanol e ácido cítrico, na presença (17 ± 1%) e na ausência (20 ± 3%) de CO₂. A soma de todas as frações obtidas em cada pré-tratamento foi inferior a 91%. Esse valor pode ser devido a erros experimentais, a reações paralelas ou a perdas por centrifugação da fração solúvel. Por exemplo, durante a realização dos ensaios de pós-hidrólise (seção 3.6), houve a formação de um precipitado no fundo do tubo de ensaio, provavelmente

devido à formação de huminas. Naturalmente, esse material não pode ser quantificado e não foi considerado na análise quantitativa.

TABELA 9 - SOMA DOS SÓLIDOS TOTAIS SOLÚVEIS E INSOLÚVEIS E DA LIGNINA RECUPERADA DE CADA PRÉ-TRATAMENTO EM 170 °C, 25 g DE CO₂, 60% (v/v) DE ETANOL EM ÁGUA EM 60 min DE REAÇÃO PARA DEFINIÇÃO DO MELHOR CATALISADOR.

Amostra	Sólidos solúveis (%)	Sólidos insolúveis (%)	Lignina recuperada (%)	Soma
EtOH + CO ₂	6 ± 2	82 ± 2	2,8 ± 0,3	91 ± 1
EtOH + ácido acético + CO ₂	7 ± 2	77 ± 5	5 ± 1	89 ± 3
EtOH + ácido cítrico + CO ₂	17 ± 1	57 ± 5	5 ± 1	79 ± 2
EtOH + ácido oxálico + CO ₂	9,3 ± 0,3	56 ± 6	7 ± 1	72 ± 2
EtOH (sem CO ₂)	4 ± 1	72 ± 3	5,3 ± 0,1	81 ± 1
EtOH + ácido acético (sem CO ₂)	9 ± 1	69 ± 2	5 ± 1	82 ± 1
EtOH + ácido cítrico (sem CO ₂)	20 ± 3	58 ± 4	5,2 ± 0,3	83 ± 2
EtOH + ácido oxálico (sem CO ₂)	12,6 ± 0,2	50 ± 2	5 ± 1	65 ± 1

FONTE: A autora (2021).

4.2.2 Definição da quantidade de CO₂

Experimentos foram realizados variando a quantidade de CO₂ sob condições fixas de 170 °C, 60 min de reação, 60% (v/v) de etanol em água e 1% (m/v) de ácido oxálico. Conforme o item anterior, o ácido oxálico foi o melhor catalisador dentre os estudados, por causar uma maior deslignificação do bagaço mantendo altos índices de recuperação de glucanas.

A quantidade de CO₂ que foi adicionada nos experimentos de pré-tratamento com etanol hidratado e ácido oxálico variou de 0 a 50 g. É importante mencionar que quanto maior a quantidade de CO₂, maior é a pressão dentro do reator, conforme os perfis de pressão apresentados do APÊNDICE A (FIGURA A2). As quantidades de CO₂ foram calculadas por meio da densidade do CO₂ na temperatura do banho que controla a temperatura da bomba seringa (15 °C), de acordo com a tabela NIST, e do volume do CO₂ adicionado ao reator Parr por meio da abertura manual da válvula que conecta a bomba seringa ao reator. A quantidade exata de CO₂ de cada pré-

tratamento está disponível na TABELA A2 no APÊNDICE A2, enquanto os controles dos experimentos encontram-se registrados no APÊNDICE A (TABELA A2).

A quantidade de CO₂ empregado nos pré-tratamentos, juntamente com as variáveis: tempo de reação e proporção de etanol em água, foram importantes para compreender o efeito do CO₂ sobre o desempenho do pré-tratamento *organosolv*, visto que os experimentos anteriores com 25 g de CO₂ a 170°C por 60 min não apresentaram efeito sobre a deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar.

Os rendimentos de recuperação mássica da fração insolúvel de cada experimento de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar estão apresentados na TABELA 10. A maior perda mássica de $50 \pm 2\%$ foi observada no experimento com etanol e ácido oxálico sem CO₂. A perda mássica provavelmente está relacionada à remoção parcial dos componentes da composição química da fração insolúvel.

A TABELA 10 apresenta os resultados de composição química dos bagaços de cana pré-tratados em comparação com o BC_{LEE} de origem. Esses pré-tratamentos seguiram a mesma tendência dos experimentos anteriores, onde os teores de anidroglicose foram maiores no material pré-tratado, enquanto o oposto foi observado para o teor de anidroxilose e das ligninas insolúvel e solúvel em ácido, indicando que a maior parte desses componentes foram hidrolisados e solubilizados no licor de pré-tratamento. Por outro lado, não foram detectados valores de anidroarabinose e grupo acetila em nenhuma das amostras pré-tratadas. Pode-se observar que os teores de anidroxilose aumentaram com a quantidade de CO₂ adicionado à reação. Isso pode ser devido a um limite de saturação na remoção de hemiceluloses e por consequência da lignina, e, também, pode ser devida uma maior quantidade de CO₂ no sistema que faz com que o ácido fique mais diluído no meio reacional, diminuindo sua ação catalítica na remoção das hemiceluloses. Através do teste de Tukey, observa-se também que as médias dos teores de lignina para todos os pré-tratamentos não se diferiram estatisticamente entre si. Em relação à comparação das médias dos teores de anidroglicose, o pré-tratamento com etanol e ácido oxálico mais 35 g de CO₂ foi o único valor que se diferenciou estatisticamente das médias dos outros experimentos.

A TABELA 10 mostra os rendimentos teóricos dos principais componentes do bagaço de cana-de-açúcar na fração insolúvel obtida após o pré-tratamento.

TABELA 10 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA E RENDIMENTOS TEÓRICOS DA FRAÇÃO INSOLÚVEL DOS BAGAÇOS DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADOS A 170 °C COM 60% (v/v) DE ETANOL EM ÁGUA POR 60 min DE REAÇÃO, SOB DIFERENTES CARGAS DE CO₂ NO SISTEMA.

Amostra	R _M (%)	AnGlc ¹	AnXyl ²	AnAra ²	Grupos acetila ²	LIA	LSA	Lignina total ³
<i>Composição química da fração sólida (%)</i>								
Bagaço de cana livre de extraíveis (BC _{LEE})		39 ± 1	18 ± 1	1,2 ± 0,1	5,5 ± 0,1	17,6 ± 0,4	5,4 ± 0,2	23,0 ± 0,2
EtOH + ácido oxálico (Sem CO ₂)	50 ± 2	72 ± 1 ^a	4,1 ± 0,6 ^a	a.l.d.	a.l.d.	3,5 ± 0,4 ^a	2,8 ± 0,3 ^a	6,3 ± 0,6 ^a
EtOH + ácido oxálico + 25 g de CO ₂	56 ± 6	73 ± 3 ^a	7,1 ± 0,4 ^{a, b}	a.l.d.	a.l.d.	3,3 ± 0,4 ^a	2,4 ± 0,2 ^a	5,7 ± 0,6 ^a
EtOH + ácido oxálico + 35 g de CO ₂	60	63 ± 2 ^b	10,1 ± 0,1 ^{b, c}	a.l.d.	a.l.d.	3,4 ± 0,2 ^a	2,9 ± 0,5 ^a	6,3 ± 0,2 ^a
EtOH + ácido oxálico + 50 g de CO ₂	58	72 ± 2 ^a	11,2 ± 0,6 ^c	a.l.d.	a.l.d.	3,5 ± 0,5 ^a	2,5 ± 0,1 ^a	6,0 ± 0,3 ^a
<i>Rendimentos teóricos da fração sólida (%)</i>								
EtOH + ácido oxálico (Sem CO ₂)		93 ± 6 ^a	12 ± 2 ^a	a.l.d.	a.l.d.	10 ± 1 ^a	26 ± 2 ^a	14 ± 1 ^a
EtOH + ácido oxálico + 25 g de CO ₂		99 ± 2 ^a	25 ± 5 ^b	a.l.d.	a.l.d.	10 ± 1 ^a	25 ± 2 ^a	14,4 ± 0,3 ^a
EtOH + ácido oxálico + 35 g de CO ₂		96 ^a	34 ^b	a.l.d.	a.l.d.	11 ^a	32 ^a	16 ^a
EtOH + ácido oxálico + 50 g de CO ₂		107 ^a	37 ^b	a.l.d.	a.l.d.	12 ^a	27 ^a	15 ^a

R_M, recuperação mássica do pré-tratamento, ou (m_{final}/m_{inicial}), 100 em base seca; com base na experiência do analisador, os erros analíticos foram considerados nos maiores desvios das três repetições independentes observadas no rendimento da recuperação mássica da fração insolúvel, com 6%.

¹ AnGlc, anidroglicose; presente como componente das β-(1→4)-D-glucanas (celulose), quantificada como glucose em meio aquoso;

² AnXyl, anidroxilose; AnAra: anidroarabinose; presentes como componentes das hemiceluloses, quantificadas como xilose e arabinose em meio aquoso;

³ Somatórios da lignina insolúvel em ácido e lignina solúvel em ácido;

a.l.d., abaixo do limite de detecção.

LIA, Lignina insolúvel em ácido;

LSA, Lignina solúvel em ácido;

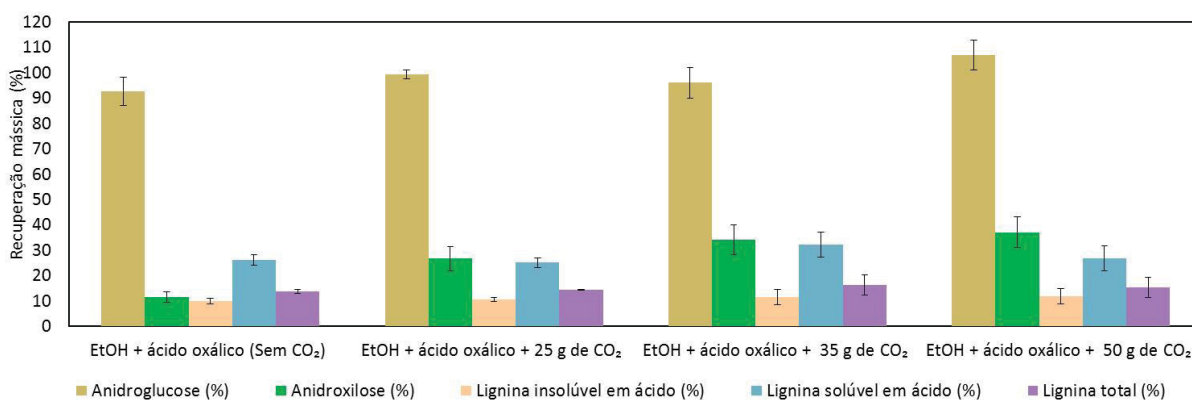
Teste Tukey = médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, a 5 % de probabilidade; com base na experiência do analisador, os erros analíticos foram considerados nos maiores desvios das três repetições independentes observadas na recuperação mássica da seguinte forma: 6% (AnGlc), 6% (Xyl) e 5% (Acetila), 3% (Lignina insolúvel), 5% (Lignina solúvel) e 4% (lignina total) dos experimentos realizados em simplicatas (sem o desvio padrão na tabela);

A quantidade de CO₂ adicionada ao reator foi calculada através do volume fornecido pelo equipamento e pela densidade fornecida pelo NIST.

FONTE: A autora (2021).

Nota-se que todas as amostras da TABELA 10 apresentaram alto rendimento da recuperação mássica de anidroglicose nos bagaços pré-tratados com etanol hidratado e ácido oxálico, na ausência ou presença de CO₂, enquanto a recuperação de lignina insolúvel em ácido e hemiceluloses na fração insolúvel foi relativamente baixa. O teste de Tukey indica que a composição química da fração insolúvel oriunda dos quatro tipos de pré-tratamento foi muito similar. Os teores de anidroglicose e de lignina foram estatisticamente semelhantes, enquanto para os teores de anidroxilose, somente o experimento com etanol hidratado e ácido oxálico (sem CO₂) se diferenciou significativamente dos demais (TABELA 10). Portanto, todos os experimentos apresentaram altos teores de recuperação de glucanas e uma deslignificação do bagaço de cerca de 86% em base seca. Os pré-tratamentos assistidos por scCO₂ em relação ao realizado na ausência de CO₂, não proporcionaram uma maior recuperação de glucanas e nem uma maior remoção de lignina insolúvel em ácido das amostras de BC_{LEE} (FIGURA 18).

FIGURA 18 - RENDIMENTOS DE RECUPERAÇÃO MÁSSICA DOS PRINCIPAIS COMPONENTES DA FRAÇÃO INSOLÚVEL DOS BAGAÇOS DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADOS A 170 °C COM 60% (v/v) DE ETANOL EM ÁGUA POR 60 min DE REAÇÃO, SOB DIFERENTES CARGAS DE CO₂ NO SISTEMA.



Anidroglicose, presente como componente das β -(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucanas (celulose), quantificada como glucose em meio aquoso;

Anidroxilose, presentes como componentes das hemiceluloses, quantificadas como xilose em meio aquoso;

Com base na experiência do analisador, os erros analíticos foram considerados nos maiores desvios das três repetições independentes observadas na recuperação mássica da seguinte forma: 6% (AnGlc), 6% (Xyl) e 5% (Acetila), 3% (Lignina insolúvel), 5% (Lignina solúvel) e 4% (lignina total).

A quantidade de CO₂ adicionada ao reator foi calculada através do volume fornecido pelo equipamento e pela densidade fornecida pelo NIST.

FONTE: A autora (2021).

Os pré-tratamentos que utilizaram CO₂ apresentaram maior homogeneidade no meio de reação. Essa vantagem também foi percebida por Escobar (2021), que

estudou pré-tratamentos *organosolv* com solventes eutéticos profundos assistidos por CO₂. O CO₂ tem como função aumentar as taxas de transferência de massa, auxiliando na difusão do solvente sobre o leito de material lignocelulósico contido no reator.

Segundo Schrems *et al.* (2012), o uso de scCO₂ na presença de um cossolvente tem efeitos benéficos sobre a polpação por aumentar a porosidade das fibras e produzir uma estrutura lamelar que, combinada com o aumento da difusividade dos reagentes, melhora a eficiência do processo de polpação *organosolv*.

A TABELA 11 apresenta a composição química de carboidratos da fração solúvel em água após hidrólise ácida. Os teores de furfural e hidroximetilfurfural (HMF) descritos na tabela correspondem aos produtos de desidratação de pentoses e hexoses, formados durante o pré-tratamento. O furfural é formado pela hidrólise e desidratação de unidades de xilose e arabinose presentes nas hemiceluloses. Os teores de furfural não são resultados absolutos, devido a sua volatilidade, o que levou a redução de sua concentração, após a despressurização do reator. Essa tabela mostra que somente o pré-tratamento com etanol e ácido oxálico na ausência de CO₂ apresentou HMF na sua composição química da fração solúvel. Os pré-tratamentos com etanol e ácido oxálico (sem CO₂) e assistido por 25 g de CO₂ apresentaram os maiores teores de furfural dos que os pré-tratamentos com maiores quantidades de CO₂. O pré-tratamento com etanol e ácido oxálico com 50 g de CO₂ apresentou em sua composição os teores de hemiceluloses (anidroxilose, anidroarabinose e grupos acetila) mais baixos em relação aos demais experimentos, conforme demonstrado na tabela de composição química da fração solúvel do material tratado, visto que esse experimento foi o que apresentou maior composição química de hemiceluloses da fração insolúvel. Essa tabela contém a soma de todos os carboidratos identificados na fração solúvel de cada pré-tratamento. Os maiores valores foram associados às frações solúveis dos pré-tratamentos com etanol e ácido oxálico (sem CO₂) e com etanol e ácido oxálico mais 35 g de CO₂, com médias de ~11% de carboidratos presentes na fração solúvel.

TABELA 11 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS DOS PRÉ-TRATAMENTOS EM 170 °C, 60% (v/v) ETANOL EM ÁGUA EM 60 min DE REAÇÃO, SOB DIFERENTES CARGAS DE CO₂ NO SISTEMA.

Amostra	Composição química (g/L)					Carboidratos totais (%) ³
	HMF	Furfural	AnGlc ¹	AnXyl ²	AnAra ²	
EtOH + ácido oxálico (Sem CO ₂)	0,005 ± 0,001	0,23 ± 0,01	0,18 ± 0,03	2,1 ± 0,1	0,135 ± 0,005	11,0 ± 0,1
EtOH + ácido oxálico + 25 g de CO ₂	a.l.d.	0,25 ± 0,03	0,17 ± 0,01	1,4 ± 0,3	0,09 ± 0,02	8,0 ± 0,1
EtOH + ácido oxálico + 35 g de CO ₂	a.l.d.	0,14 ± 0,01	0,22 ± 0,03	1,9 ± 0,2	0,21± 0,2	10,3 ± 0,4
EtOH + ácido oxálico + 50 g de CO ₂	a.l.d.	0,14 ± 0,02	0,09 ± 0,01	0,9 ± 0,1	0,060 ± 0,001	4,95 ± 0,02

¹ AnGlc, anidroglicose; presente como componente das β-(1→4)-D-glucanas (celulose) e quantificada como glucose em meio aquoso;
² AnXyl, anidroxilose; AnAra: anidroarabinose; presentes como componentes das hemiceluloses e quantificadas como xilose e arabinose em meio aquoso.
³ Soma de todos os carboidratos identificados na fração solúvel aquosa em relação à massa inicial do BC_{LEE}, incluindo o percentual atribuído aos compostos furânicos (HMF e furfural) do meio;
a.l.d., abaixo do limite de detecção
HMF, hidroximetilfurfural

FONTE: A autora (2021).

A partir dessa composição química da fração solúvel, foi calculada a recuperação mássica dos carboidratos em cada pré-tratamento que se encontram na TABELA 12. Esses valores foram expressos em relação à composição química correspondente do bagaço de origem. Essa tabela mostra que as glucanas foram pouco hidrolisadas na fração líquida, onde o pré-tratamento que obteve maior teor de recuperação de anidroglicose na fração solúvel foi o experimento com etanol e ácido oxálico mais 35 g de CO₂ com $2,4 \pm 0,3\%$. As hemiceluloses foram mais hidrolisadas na fração líquida que as glucanas, sendo o pré-tratamento que apresentou maior recuperação mássica de hemiceluloses foi o que empregou etanol e ácido oxálico mais 35 g de CO₂, com $45 \pm 4\%$ de anidroxilose, $73 \pm 3\%$ de anidroarabinose e $25 \pm 2\%$ de grupos acetila.

TABELA 12 - RECUPERAÇÃO MÁSSICA DOS CARBOIDRATOS DA FRAÇÃO SOLÚVEL DOS PRÉ-TRATADOS A 170 °C COM 60% (v/v) DE ETANOL EM ÁGUA POR 60 min DE REAÇÃO, SOB DIFERENTES CARGAS DE CO₂ NO SISTEMA.

Amostra	Recuperação mássica da fração líquida (%)			
	AnGlc ¹	AnXyl ²	AnAra ²	Grupos acetila ²
EtOH + ácido oxálico (Sem CO ₂) ³	$2,1 \pm 0,2$	$50,6 \pm 0,4$	47 ± 2	15 ± 3
EtOH + ácido oxálico + 25 g de CO ₂	$1,90 \pm 0,08$	36 ± 3	32 ± 3	$22,9 \pm 0,3$
EtOH + ácido oxálico + 35 g de CO ₂	$2,4 \pm 0,3$	45 ± 4	73 ± 3	25 ± 2
EtOH + ácido oxálico + 50 g de CO ₂	$1,0 \pm 0,2$	21 ± 2	21 ± 1	8 ± 1

¹ AnGlc, anidroglicose; presente como componente das β -(1→4)-D-glucanas (celulose) w quantificada como glucose em meio aquoso;

² AnXyl, anidroxilose; AnAra: anidroarabinose; presentes como componentes das hemiceluloses e quantificadas como xilose, arabinose e ácido acético em meio aquoso; o produto da reação de desidratação de pentoses (furfural) também foi considerado nos cálculos;

FONTE: A autora (2021).

A TABELA 13 contém os resultados de sólidos totais solúveis e insolúveis, de lignina recuperada do licor de extração e da soma de todas as frações obtidas. Os experimentos que apresentaram maiores resultados de sólidos totais solúveis foram os realizados com etanol e ácido oxálico na ausência ($12,6 \pm 0,2\%$) e na presença de 35 g de CO₂ ($12 \pm 2\%$). A soma dos sólidos totais solúveis e insolúveis mais lignina total da fração insolúvel obtida em cada pré-tratamento foi inferior a 80%. Isso significa que pode ter ocorrido um erro analítico na quantificação dessas frações.

TABELA 13 - SÓLIDOS TOTAIS SOLÚVEIS E INSOLÚVEIS E LIGNINA RECUPERADA DE CADA PRÉ-TRATAMENTO A 170 °C, USANDO 60% (v/v) DE ETANOL EM ÁGUA E 60 min DE REAÇÃO SOB DIFERENTES CARGAS DE CO₂ NO SISTEMA.

Amostra	Sólidos solúveis (%)	Sólidos insolúveis (%)	Lignina (%)	Soma
EtOH + ácido oxálico (Sem CO ₂)	12,6 ± 0,2	50 ± 2	5 ± 1	65 ± 1
EtOH + ácido oxálico + 25 g de CO ₂	9,3 ± 0,3	56 ± 6	7 ± 1	72 ± 2
EtOH + ácido oxálico + 35 g de CO ₂	12 ± 2	60	8	80
EtOH + ácido oxálico + 50 g de CO ₂	5 ± 1	58	8	71

Com base na experiência do analisador, os erros analíticos foram considerados nos maiores desvios das três repetições independentes observadas da seguinte forma: 3% (sólidos solúveis), 6% (sólidos insolúveis), 1% (lignina recuperada) e 3% (soma).

A quantidade de CO₂ adicionada ao reator foi calculada através do volume fornecido pelo equipamento e pela densidade fornecida pelo NIST.

FONTE: A autora (2021).

4.2.3 Definição do tempo de reação

Foram realizados pré-tratamentos nos tempos de reação de 60 e 15 min no processo *organosolv* catalisado por ácido oxálico na ausência e na presença de 25 g de CO₂. Os controles desses experimentos estão no APÊNDICE A (TABELA A3), bem como os perfis de aquecimento e de variação da pressão (FIGURA A3).

Os rendimentos de recuperação mássica da fração insolúvel (fração sólida) obtida após cada etapa de experimento de pré-tratamento estão apresentados na TABELA 14. A maior perda mássica foi observada no experimento com etanol e ácido oxálico sem CO₂ após 60 min de reação, que resultou em uma recuperação mássica de 50 ± 2%.

A TABELA 14 apresenta os resultados para os principais componentes presentes nos materiais pré-tratados em comparação à composição do material de origem. Os teores de anidroglicose foram superiores nos substratos pré-tratados, enquanto os teores de anidroxilose, lignina insolúvel e lignina solúvel em ácido foram inferiores aos contidos no BC_{LEE}, indicando que a maior parte das hemiceluloses e lignina foram hidrolisadas e liberadas nas frações solúveis. Não foram detectados valores de anidroarabinose e grupamento acetila em nenhuma das amostras pré-tratadas.

TABELA 14 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA E RENDIMENTOS TEÓRICOS DA FRAÇÃO INSOLÚVEL DOS BAGAÇOS DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADOS EM 170 °C, 60% (v/v) DE ETANOL EM ÁGUA E 25 g DE CO₂ EM DIFERENTES TEMPOS.

Amostra	R _M (%)	AnGlc ¹	AnXyl ²	AnAra ²	Grupos acetila ²	LIA	LSA	Lignina total ³
Composição química da fração sólida (%)								
Bagaço de cana livre de extraíveis (BC _{LEE})	39 ± 1	72 ± 1 ^a	18 ± 1	1,2 ± 0,1	5,5 ± 0,1	17,6 ± 0,4	5,4 ± 0,2	23,0 ± 0,2
EtOH + ácido oxálico (Sem CO ₂) (60 min)	50 ± 2	72 ± 1 ^a	4,1 ± 0,6 ^a	a.l.d.	a.l.d.	3,5 ± 0,4 ^a	2,8 ± 0,3 ^a	6,3 ± 0,6 ^a
EtOH + ácido oxálico + CO ₂ (60 min)	56 ± 6	73 ± 3 ^a	7,1 ± 0,4 ^a	a.l.d.	a.l.d.	3,3 ± 0,4 ^a	2,4 ± 0,2 ^a	5,7 ± 0,6 ^a
EtOH + ácido oxálico (Sem CO ₂) (15 min)	65 ± 2	61 ± 2 ^b	9 ± 2 ^b	a.l.d.	a.l.d.	9,1 ± 0,7 ^b	2,5 ± 0,1 ^a	11,5 ± 0,4 ^b
EtOH + ácido oxálico + CO ₂ (15 min)	57 ± 4	70 ± 3 ^a	7 ± 1 ^a	a.l.d.	a.l.d.	3,4 ± 0,5 ^a	2,1 ± 0,2 ^a	5,5 ± 0,2 ^a
Rendimentos teóricos da fração sólida (%)								
EtOH + ácido oxálico (Sem CO ₂) (60 min)		93 ± 6 ^a	12 ± 2 ^a	a.l.d.	a.l.d.	10 ± 1 ^a	26 ± 2 ^a	14 ± 1 ^a
EtOH + ácido oxálico + CO ₂ (60 min)		99 ± 2 ^a	25 ± 5 ^{a,b}	a.l.d.	a.l.d.	10 ± 1 ^a	25 ± 2 ^a	14,4 ± 0,3 ^a
EtOH + ácido oxálico (Sem CO ₂) (15 min)		100,9 ± 0,2 ^a	32,9 ± 0,3 ^b	a.l.d.	a.l.d.	34 ± 1 ^b	30 ± 1 ^a	32 ± 1 ^b
EtOH + ácido oxálico + CO ₂ (15 min)		101 ± 1 ^a	22 ± 2 ^{a,b}	a.l.d.	a.l.d.	11 ± 2 ^a	22 ± 3 ^a	14 ± 3 ^a

R_M, recuperação mássica do pré-tratamento, ou (m_{final}/min_{cial}). 100 em base seca;

¹ AnGlc, anidroglicose; presente como componente das β-(1→4)-D-glucanas (celulose), quantificada como glucose em meio aquoso;

² AnXyl, anidroxilose; AnAra: anidroarabinose; presentes como componentes das hemiceluloses, quantificadas como xilose e arabinose em meio aquoso;

³ Somatórios da lignina insolúvel em ácido e lignina solúvel em ácido;

a.l.d., abaixo do limite de detecção.

LIA, Lignina insolúvel em ácido;

LSA, Lignina solúvel em ácido;

Teste Tukey = médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, a 5 % de probabilidade.

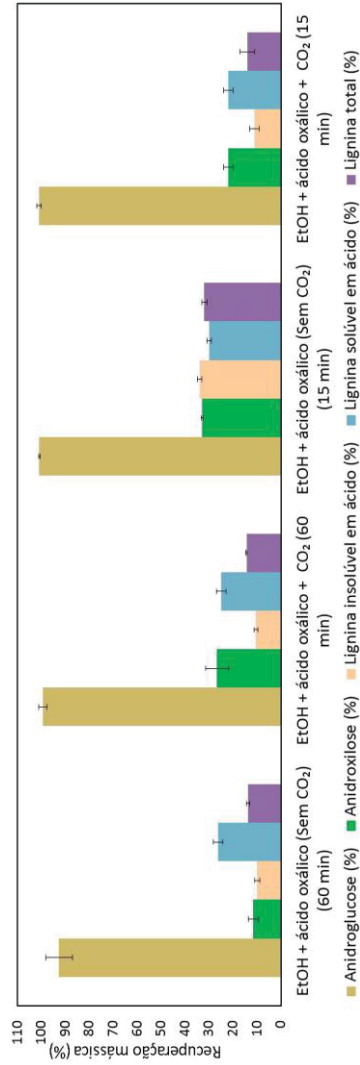
FONTE: A autora (2021).

O teste de Tukey (TABELA 14) foi então utilizado para avaliar se as médias dos teores de anidroglicose, anidroxilose, lignina insolúvel em ácido e lignina total dessa tabela foram estatisticamente semelhantes entre si para pré-tratamentos realizados com etanol hidratado e ácido oxálico na ausência e na presença de CO₂ por 15 e 60 min de reação. Apenas o uso de etanol hidratado e ácido oxálico na ausência de CO₂ por 15 min de reação apresentou menor teor de anidroglicose e maiores teores de anidroxilose, lignina insolúvel e lignina total do que os demais pré-tratamentos apresentados nessa tabela. Esse pré-tratamento foi o que apresentou maior recuperação mássica da fração insolúvel ($65 \pm 2\%$), o que está de acordo com a maior presença de glucanas, hemiceluloses e lignina nessa fração.

A TABELA 14 e a FIGURA 19 demonstram que todos os pré-tratamentos apresentaram alto rendimento de recuperação de anidroglicose nos bagaços pré-tratados, enquanto os teores de recuperação de lignina insolúvel em ácido e lignina total foram baixos. Os pré-tratamentos realizados por 60 min com etanol e ácido oxálico na ausência e na presença de CO₂, e o que empregou etanol e ácido oxálico na presença de CO₂ por 15 min de reação, removeram cerca de 86% da lignina total do bagaço. Já, o pré-tratamento com etanol e ácido oxálico sem CO₂ por 15 min removeu apenas $68 \pm 1\%$ da lignina total. Essa diferença entre os experimentos realizados em 15 min na ausência e na presença de CO₂ mostra a contribuição do CO₂ como cossolvente na deslignificação do BC_{LEE} no pré-tratamento *organosolv*.

A TABELA 15 apresenta a composição química de carboidratos da fração solúvel em água após hidrólise ácida. Os teores de furfural e hidroximetilfurfural (HMF) descritos dessa tabela correspondem aos produtos de desidratação de pentoses e hexoses, formados durante os pré-tratamentos. Somente o pré-tratamento por 60 min com etanol e ácido oxálico na ausência de CO₂ apresentou HMF na composição química da fração solúvel. No entanto, a quantidade detectada de HMF foi pequena e próxima ao limite de detecção do método, enquanto as quantidades detectadas de furfural foram iguais nos pré-tratamentos com etanol e ácido oxálico na ausência e na presença de CO₂ após 60 min de reação e com etanol e ácido oxálico na presença de CO₂ após 15 min de reação. Essa tabela também contém a soma de todos os carboidratos identificados da fração hidrossolúvel de cada pré-tratamento. A maior quantidade de carboidratos hidrossolúveis ($15,8 \pm 0,3\%$) foi derivada do pré-tratamento com etanol e ácido oxálico na presença de CO₂ por 15 min de reação.

FIGURA 19 - RENDIMENTOS DE RECUPERAÇÃO MÁSSICA DOS PRINCIPAIS COMPONENTES DA FRAÇÃO INSOLÚVEL DOS BAGAÇOS DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADOS EM 170 °C, 60% (v/v) DE ETANOL EM ÁGUA E 25 g DE CO₂ EM DIFERENTES TEMPOS.



Anidroglicose, presente como componente das β-(1→4)-D-glucanas (celulose), quantificada como glucose em meio aquoso;
Anidroxilose, presentes como componentes das hemiceluloses, quantificadas como xilose em meio aquoso;

FONTE: A autora (2021).

TABELA 15 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS DOS PRÉ-TRATAMENTOS EM 170 °C, 60% (v/v) ETANOL EM ÁGUA E 25 g DE CO₂ DE REAÇÃO EM DIFERENTES TEMPOS.

Amostra	Composição química (g/L)				Carboidratos	
	HMF	Furfural	AnGlc ¹	AnXyl ²	AnAra ²	Grupos acetila ² totais (%) ³
EtOH + ácido oxálico (sem CO ₂) (60 min)	0,005 ± 0,001	0,23 ± 0,01	0,18 ± 0,03	2,1 ± 0,1	0,135 ± 0,005	11,0 ± 0,1
EtOH + ácido oxálico + CO ₂ (60 min)	a.l.d.	0,25 ± 0,03	0,17 ± 0,01	1,4 ± 0,3	0,09 ± 0,02	8,0 ± 0,1
EtOH + ácido oxálico (sem CO ₂) (15 min)	a.l.d.	0,18 ± 0,01	0,302 ± 0,001	2,0 ± 0,1	0,207 ± 0,001	11,2 ± 0,1
EtOH + ácido oxálico + CO ₂ (15 min)	a.l.d.	0,25 ± 0,01	0,09 ± 0,01	3,4 ± 0,3	0,06 ± 0,01	15,8 ± 0,3

¹ AnGlc, anidroglicose; presente como componente das β-(1→4)-D-glucanas (celulose), quantificada como glucose em meio aquoso;
² AnXyl, anidroxilose; AnAra: anidroarabinose; presentes como componentes das hemiceluloses, quantificadas como xilose e arabinose em meio aquoso;
³ Soma de todos os carboidratos identificados na fração solúvel aquosa em relação à massa inicial do BC_{LEE}, incluindo o percentual atribuído aos compostos furânicos (HMF e furfural) do meio;
a.l.d., abaixo do limite de detecção; HMF, Hidroximetilfurfural.

FONTE: A autora (2021).

As recuperações mássicas dos carboidratos em cada pré-tratamento encontram-se apresentadas na TABELA 16, com valores expressos em relação à composição química do bagaço de origem. Os resultados confirmam que as glucanas foram pouco hidrolisadas, sendo que a condição que gerou o maior teor de anidroglicose na fração hidrossolúvel ($3,29 \pm 0,02\%$) foi o que empregou etanol e ácido oxálico sem CO_2 por 15 min de reação, enquanto as hemiceluloses foram hidrolisadas em maior extensão do que as glucanas em todas as amostras.

TABELA 16 - RECUPERAÇÃO MÁSSICA DOS CARBOIDRATOS DA FRAÇÃO SOLÚVEL DOS PRÉ-TRATADOS EM $170\text{ }^\circ\text{C}$, 60% (v/v) DE ETANOL EM ÁGUA E 25 g de CO_2 EM DIFERENTES TEMPOS.

Amostra	Recuperação mássica da fração líquida (%)			
	AnGlc ¹	AnXyl ²	AnAra ²	Grupos acetila ²
EtOH + ácido oxálico (sem CO_2) (60 min) ³	$2,1 \pm 0,2$	$50,6 \pm 0,4$	47 ± 2	15 ± 3
EtOH + ácido oxálico + CO_2 (60 min)	$1,90 \pm 0,08$	36 ± 3	32 ± 3	$22,9 \pm 0,3$
EtOH + ácido oxálico (sem CO_2) (15 min)	$3,29 \pm 0,02$	52 ± 4	73 ± 1	14 ± 2
EtOH + ácido oxálico + CO_2 (15 min)	$0,89 \pm 0,03$	83 ± 3	22 ± 1	25 ± 1

¹ AnGlc, anidroglicose; presente como componente das β -(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucanas (celulose) w quantificada como glucose em meio aquoso;

² AnXyl, anidroxilose; AnAra: anidroarabinose; presentes como componentes das hemiceluloses e quantificadas como xilose, arabinose e ácido acético em meio aquoso; o produto da reação de desidratação de pentoses (furfural) também foi considerado nos cálculos;

³ O produto da reação de desidratação de hexoses (HMF) também foi considerado nos cálculos de AnGlc.

FONTE: A autora (2021).

A TABELA 17 contém os resultados de sólidos totais solúveis e insolúveis, lignina recuperada do licor de extração e a soma de todas as frações obtidas. Os maiores resultados de sólidos totais solúveis foram obtidos com etanol e ácido oxálico sem CO_2 ($19 \pm 3\%$) e com CO_2 ($18 \pm 1\%$) por 15 min de reação. Por outro lado, os maiores rendimentos de lignina recuperada do licor de extração foram derivados dessas mesmas condições de pré-tratamento, com rendimentos de 9,2% e 14,7%, respectivamente. Experimentos realizados por 60 min de reação podem ter gerado uma lignina mais condensada, dificultando a sua recuperação da fração solúvel. A soma dos sólidos totais solúveis e insolúveis mais a lignina total da fração insolúvel desses pré-tratamentos foram inferiores a 93%. Esse valor pode ter sido devido a erros experimentais, reações paralelas ou perdas por centrifugação da fração solúvel. Por exemplo, durante a realização dos ensaios de pós-hidrólise

(seção 3.6), houve a formação de um precipitado no fundo do tubo de ensaio, provavelmente devido à formação de huminas. Naturalmente, esse material não pode ser quantificado e não foi considerado na análise quantitativa.

TABELA 17 - SOMA DOS SÓLIDOS TOTAIS SOLÚVEIS E INSOLÚVEIS E DA LIGNINA RECUPERADA DE CADA PRÉ-TRATAMENTO EM 170 °C, 60% (v/v) DE ETANOL EM ÁGUA E 25 g DE CO₂ EM DIFERENTES TEMPOS.

Amostra	Sólidos solúveis (%)	Sólidos insolúveis (%)	Lignina (%)	Soma
EtOH + ácido oxálico (sem CO ₂) (60 min)	12,6 ± 0,2	50 ± 2	5 ± 1	65 ± 1
EtOH + ácido oxálico + CO ₂ (60 min)	9,3 ± 0,3	56 ± 6	7 ± 1	72 ± 2
EtOH + ácido oxálico (sem CO ₂) (15 min)	19 ± 3	65 ± 2	9,2 ± 0,8	93 ± 2
EtOH + ácido oxálico + CO ₂ (15 min)	18 ± 1	57 ± 4	14,7 ± 0,8	90 ± 2

FONTE: A autora (2021).

4.2.4 Definição da melhor proporção de etanol em água

Foram realizados pré-tratamentos variando a quantidade de água adicionada ao etanol (60%, 40% e 20%), a 170 °C, 15 min de reação e na ausência e na presença de 25 g de CO₂. Além disso, também foi realizado um experimento em meio aquoso (hidrólise ácida), portanto, na ausência de etanol. Os controles desses experimentos estão no APÊNDICE A (TABELA A4 e FIGURA A4), bem como os seus respectivos perfis de temperatura e de pressão.

Os rendimentos de recuperação mássica da fração insolúvel (fração sólida) estão apresentados na TABELA 18. A maior perda mássica foi observada no pré-tratamento com 40% de etanol em água e ácido oxálico (sem CO₂), que correspondeu a uma recuperação mássica de 54%. Seguindo a mesma tendência observada anteriormente, os teores de anidroglicose foram maiores nos substratos pré-tratados em relação ao BC_{LEE} de origem, enquanto os teores de anidroxilose, lignina insolúvel e lignina solúvel em ácido foram menores e a presença de anidroarabinose e grupos acetila não pode ser detectada. Os pré-tratamentos que apresentaram menores rendimentos de recuperação mássica da fração insolúvel foram os que apresentaram menores teores de anidroxilose e de lignina total em sua composição química, confirmando mais uma vez a solubilização parcial das hemiceluloses e da lignina e a liberação de monômeros e oligômeros na fração solúvel do pré-tratamento.

TABELA 18 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA E RENDIMENTOS TEÓRICOS DA FRAÇÃO INSOLÚVEL DOS BAGAÇOS DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADOS EM 170 °C, 15 min DE REAÇÃO e 25 g de CO₂ PARA DEFINIÇÃO DA MELHOR PROPORÇÃO DE ETANOL EM ÁGUA.

Amostra	R _M (%)	AnGlc ¹	AnXyl ²	AnAra ²	Grupos acetila ²	LIA	LSA	Lignina total ³
<i>Composição química da fração sólida (%)</i>								
Bagaço de cana livre de extraíveis (BC _{LEE})		39 ± 1	18 ± 1	1,2 ± 0,1	5,5 ± 0,1	17,6 ± 0,4	5,4 ± 0,2	23,0 ± 0,2
100% H ₂ O + ácido oxálico (Sem CO ₂)	68	54 ± 1 ^b	5,7 ± 0,1 ^b	a.l.d.	a.l.d.	22,9 ± 0,2 ^c	2,9 ± 0,2 ^b	25,82 ± 0,01 ^b
100% H ₂ O + ácido oxálico + CO ₂	61	58 ± 2 ^{b,c}	0,8 ± 0,1 ^a	a.l.d.	a.l.d.	23,1 ± 0,3 ^c	2,5 ± 0,1 ^{a,b}	25,6 ± 0,1 ^b
40% EtOH + ácido oxálico (Sem CO ₂)	54	60 ± 1 ^{a,c}	1,02 ± 0,08 ^a	a.l.d.	a.l.d.	9,1 ± 0,7 ^a	2,3 ± 0,1 ^a	11,3 ± 0,4 ^a
40% EtOH + ácido oxálico + CO ₂	59	63 ± 2 ^c	3,0 ± 0,2 ^c	a.l.d.	a.l.d.	11,8 ± 0,4 ^e	2,2 ± 0,2 ^a	14,0 ± 0,1 ^d
60% EtOH + ácido oxálico (Sem CO ₂)	65 ± 2	61 ± 2 ^{a,c}	9 ± 2 ^d	a.l.d.	a.l.d.	9,1 ± 0,7 ^a	2,5 ± 0,1 ^{a,b}	11,5 ± 0,4 ^a
60% EtOH + ácido oxálico + CO ₂	57 ± 4	70 ± 3 ^d	7 ± 1 ^b	a.l.d.	a.l.d.	3,4 ± 0,5 ^d	2,1 ± 0,2 ^a	5,5 ± 0,5 ^c
80% EtOH + ácido oxálico (Sem CO ₂)	74	56 ± 1 ^{a,b}	15,7 ± 0,4 ^e	a.l.d.	a.l.d.	14,2 ± 0,4 ^b	3,6 ± 0,3 ^c	17,8 ± 0,1 ^f
80% EtOH + ácido oxálico + CO ₂	74	58 ± 1 ^{a,b}	16,6 ± 0,5 ^f	a.l.d.	a.l.d.	13,0 ± 0,3 ^b	3,6 ± 0,1 ^c	16,6 ± 0,1 ^e
<i>Rendimentos teóricos da fração sólida (%)</i>								
100% H ₂ O + ácido oxálico (Sem CO ₂)		93 ^{a,b,d}	22 ^{a,b}	a.l.d.	a.l.d.	89 ^d	37 ^a	77 ^c
100% H ₂ O + ácido oxálico + CO ₂		90 ^{a,d}	3 ^a	a.l.d.	a.l.d.	80 ^{c,d}	29 ^a	68 ^{a,b,c}
40% EtOH + ácido oxálico (Sem CO ₂)		89 ^d	3 ^a	a.l.d.	a.l.d.	30 ^{a,e}	24 ^a	29 ^{a,b,d}
40% EtOH + ácido oxálico + CO ₂		95 ^{a,b,c,d}	10 ^a	a.l.d.	a.l.d.	40 ^a	24 ^a	36 ^{a,b,c,d}
60% EtOH + ácido oxálico (Sem CO ₂)		100,9 ± 0,2 ^{a,b,c}	32,9 ± 0,3 ^b	a.l.d.	a.l.d.	34 ± 1 ^{a,b}	30 ± 1 ^a	32 ± 1 ^{a,d}
60% EtOH + ácido oxálico + CO ₂		101 ± 1 ^{a,b,c}	22 ± 2 ^{a,b}	a.l.d.	a.l.d.	11 ± 2 ^e	22 ± 3 ^a	14 ± 3 ^d
80% EtOH + ácido oxálico (Sem CO ₂)		106 ^{b,c}	65 ^c	a.l.d.	a.l.d.	60 ^{b,c,d}	49 ^a	57 ^{a,b,c}
80% EtOH + ácido oxálico + CO ₂		108 ^c	68 ^c	a.l.d.	a.l.d.	54 ^{a,b,c}	49 ^a	53 ^{a,b,c}

R_M, recuperação mássica do pré-tratamento, ou (m_{final}/m_{inicial}).100 em base seca;

¹ AnGlc, anidroglicose; presente como componente das β-(1→4)-D-glucanas (celulose), quantificada como glucose em meio aquoso;

² AnXyl, anidroxilose; AnAra: anidroarabinose; presentes como componentes das hemiceluloses, quantificadas como xilose e arabinose em meio aquoso;

³ Somatórios da lignina insolúvel em ácido e lignina solúvel em ácido;

a.l.d., abaixo do limite de detecção.

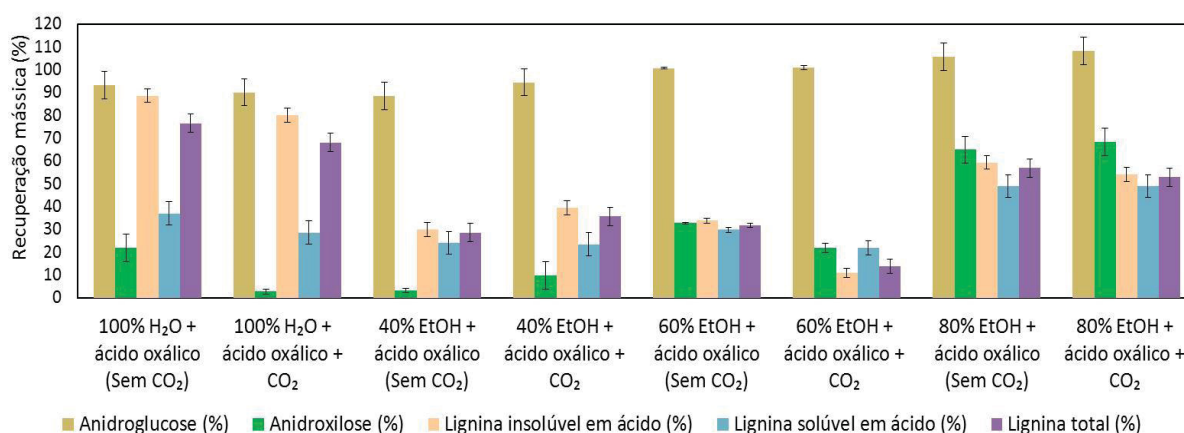
LIA, Lignina insolúvel em ácido e LSA, Lignina solúvel em ácido;

Teste Tukey = médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, a 5 % de probabilidade; com base na experiência do analisador, os erros analíticos foram considerados nos maiores desvios das três repetições independentes observadas no rendimento da recuperação mássica da fração insolúvel, com 6% e na recuperação mássica da seguinte forma: 6% (AnGlc), 6% (Xyl) e 5% (Acetila), 3% (Lignina insolúvel), 5% (Lignina solúvel) e 4% (lignina total) dos experimentos realizados em simplicatas (sem o desvio padrão na tabela).

FONTE: A autora (2021).

Os rendimentos teóricos dos principais componentes do bagaço de cana-de-açúcar da fração insolúvel do pré-tratamento (TABELA 18 e FIGURA 20) demonstram que houve altos rendimentos de recuperação de anidroglicose nos bagaços pré-tratados com etanol em água e ácido oxálico na ausência ou presença de CO₂, independentemente da quantidade de água adicionada ao etanol. O pré-tratamento empregando 60% de etanol em água e ácido oxálico na presença de CO₂ promoveu a remoção de 86 ± 3% de lignina total, sendo o melhor resultado de deslignificação dentre todas as condições investigadas nessa etapa do trabalho.

FIGURA 20 - RENDIMENTOS DE RECUPERAÇÃO MÁSSICA DOS PRINCIPAIS COMPONENTES DA FRAÇÃO INSOLÚVEL DOS BAGAÇOS DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADOS EM 170 °C, 15 min DE REAÇÃO e 25 g de CO₂ PARA DEFINIÇÃO DA MELHOR PROPORÇÃO DE ETANOL EM ÁGUA.



Anidroglicose, presente como componente das β-(1→4)-D-glucanas (celulose), quantificada como glucose em meio aquoso;

Anidroxilose, presentes como componentes das hemiceluloses, quantificadas como xilose em meio aquoso;

Com base na experiência do analisador, os erros analíticos foram considerados nos maiores desvios das três repetições independentes observadas no rendimento da recuperação mássica da fração insolúvel, com 6% e na recuperação mássica da seguinte forma: 6% (AnGlc), 6% (Xyl) e 5% (Acetila), 3% (Lignina insolúvel), 5% (Lignina solúvel) e 4% (lignina total).

FONTE: A autora (2021).

Água não se expande significativamente na presença de CO₂ e, portanto, as suas propriedades não são alteradas com exceção da acidez (Jessop e Subramaniam, 2007). A presença de água no meio reacional pode promover a hidrólise dos polissacarídeos das hemiceluloses, levando a sua conversão em oligômeros e monossacarídeos, dependendo das condições do ensaio. Em sistemas com altas temperaturas e pressões, a solubilidade do CO₂ em água é favorecida, levando à formação do ácido carbônico que, por sua vez, diminui o pH do meio reacional e promove a quebra de ligações glicosídicas presentes nas hemiceluloses

e ligações do tipo éster presentes na lignina (HUISHENG *et al.*, 2013), enquanto a presença de etanol no meio reacional favorece a solubilização da lignina. Portanto, os pré-tratamentos que empregaram 100% de água não apresentaram bons resultados de deslignificação. Contudo, altas concentrações de etanol dificultam a hidrólise das hemiceluloses e, com isso, fragmentos de lignina fortemente associados a esses carboidratos não puderam ser removidos. O emprego de 60% de etanol em água gerou o melhor resultado de deslignificação, principalmente em pré-tratamentos realizados na presença de CO₂.

A TABELA 19 apresenta a composição em carboidratos e seus derivados da fração solúvel obtida após o pré-tratamento. A presença de furfural e hidroximetilfurfural (HMF) deve-se à desidratação de pentoses e hexoses, respectivamente, um resultado esperado para pré-tratamentos realizados na presença de um ácido de Brønsted em altas temperaturas. É bom ressaltar que os teores de compostos furânicos não são resultados absolutos devido a sua volatilidade, que levou a perdas não quantificadas desse componente após a despressurização do reator. As amostras pré-tratadas com ácido oxálico diluído na ausência e na presença de CO₂ apresentaram o mesmo teor de HMF em suas composições. A mesma tendência foi observada nas amostras pré-tratadas com ácido oxálico em 40% etanol em água. Os pré-tratamentos com CO₂ geraram maiores quantidades de furfural em relação aos realizados na ausência de CO₂, provavelmente devido a maior remoção das hemiceluloses do bagaço em pré-tratamentos realizados com CO₂. Essa tabela demonstra ainda que os teores de anidroglicose (glucanas) foram baixos em todas as amostras, enquanto maiores teores de anidroxilose foram observados na composição química das frações solúveis do pré-tratamento. Os experimentos que apresentaram maiores teores de anidroxilose foram os que empregaram 40% etanol em água e ácido oxálico e 60% etanol em água e ácido oxálico, ambos na presença de CO₂. Por consequência, a recuperação mássica de glucanas nas frações hidrossolúveis (TABELA 20), expressas em relação à composição do BC_{LEE}, manteve-se em níveis bastante baixos, enquanto até 79 ± 3% das xilanas e 73 ± 1% de grupos arabinosil foram recuperadas nessa fração após o pré-tratamento com 40% etanol em água e ácido oxálico na presença de 25 g de CO₂.

TABELA 19 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS DOS PRÉ-TRATAMENTOS EM 170 °C, 15 min DE REAÇÃO E 25 g de CO₂ PARA DEFINIÇÃO DA MELHOR PROPORÇÃO ETANOL EM ÁGUA.

Amostra	Composição química (g/L)					Carboidratos totais (%) ³	
	HMF	Furfural	AnGlc ¹	AnXyl ²	AnAra ²		
100% H ₂ O + ácido oxálico (Sem CO ₂)	0,006 ± 0,001	0,19 ± 0,02	0,05 ± 0,01	1,14 ± 0,03	0,090 ± 0,001	0,11 ± 0,01	6,2 ± 0,3
100% H ₂ O + ácido oxálico + CO ₂	0,007 ± 0,001	0,30 ± 0,04	0,07 ± 0,02	1,7 ± 0,4	0,09 ± 0,01	0,27 ± 0,02	9,0 ± 0,4
40% EtOH + ácido oxálico (Sem CO ₂)	0,004 ± 0,002	0,21 ± 0,05	0,03 ± 0,01	1,1 ± 0,1	0,18 ± 0,2	0,38 ± 0,03	6,4 ± 0,3
40% EtOH + ácido oxálico + CO ₂	0,004 ± 0,001	0,36 ± 0,01	0,049 ± 0,001	3,1 ± 0,2	0,31 ± 0,01	0,32 ± 0,02	15,9 ± 0,2
60% EtOH + ácido oxálico (Sem CO ₂)	a.l.d.	0,18 ± 0,01	0,302 ± 0,001	2,0 ± 0,1	0,207 ± 0,001	0,180 ± 0,002	11,2 ± 0,1
60% EtOH + ácido oxálico + CO ₂	a.l.d.	0,25 ± 0,01	0,09 ± 0,1	3,4 ± 0,3	0,06 ± 0,01	0,33 ± 0,01	15,8 ± 0,3
80% EtOH + ácido oxálico (Sem CO ₂)	a.l.d.	0,035 ± 0,008	0,011 ± 0,001	0,9 ± 0,2	0,06 ± 0,02	0,12 ± 0,01	4,2 ± 0,2
80% EtOH + ácido. oxálico +CO ₂	a.l.d.	0,10 ± 0,03	0,008 ± 0,002	0,9 ± 0,1	0,030 ± 0,006	0,20 ± 0,02	4,3 ± 0,1

¹ AnGlc, anidroglicose; presente como componente das β-(1→4)-D-glucanas (celulose) e quantificada como glucose em meio aquoso;
² AnXyl, anidroxilose; AnAra: anidroarabinose; presentes como componentes das hemiceluloses e quantificadas como xilose e arabinose em meio aquoso.
³ Soma de todos os carboidratos identificados na fração solúvel aquosa em relação à massa inicial do BC_{LEE}, incluindo o percentual atribuído aos compostos furânicos (HMF e furfural) do meio;
a.l.d., abaixo do limite de detecção
HMF, hidroximetilfurfural

FONTE: A autora (2021).

TABELA 20 – EFEITO DA PROPORÇÃO DE ETANOL EM ÁGUA SOBRE A RECUPERAÇÃO MÁSSICA DOS CARBOIDRATOS DA FRAÇÃO SOLÚVEL ORIUNDA DE PRÉ-TRATAMENTOS REALIZADOS A 170 °C POR 15 min, NA PRESENÇA DE 25 g DE CO₂.

Amostra	Recuperação mássica da fração líquida (%)			
	AnGlc ¹	AnXyl ²	AnAra ²	Grupos acetila ²
100% H ₂ O + ácido oxálico (Sem CO ₂) ³	0,57 ± 0,1	27,9 ± 0,6	33 ± 1	9 ± 1
100% H ₂ O + ácido oxálico + CO ₂ ³	0,8 ± 0,2	42 ± 4	33 ± 1	22 ± 2
40% EtOH + ácido oxálico (Sem CO ₂) ³	0,34 ± 0,01	28 ± 1	63 ± 2	30 ± 3
40% EtOH + ácido oxálico + CO ₂ ³	0,52 ± 0,01	79 ± 3	73 ± 1	26 ± 2
60% EtOH + ácido oxálico (Sem CO ₂)	3,29 ± 0,02	52 ± 4	73 ± 1	14 ± 2
60% EtOH + ácido oxálico + CO ₂	0,89 ± 0,03	83 ± 3	22 ± 1	25 ± 1
80% EtOH + ácido oxálico (Sem CO ₂)	0,120 ± 0,005	21 ± 3	22 ± 2	10 ± 1
80% EtOH + ácido oxálico + CO ₂	0,09 ± 0,03	22 ± 2	11 ± 2	16 ± 1

¹ AnGlc, anidroglicose; presente como componente das β-(1→4)-D-glucanas (celulose) w quantificada como glucose em meio aquoso;

² AnXyl, anidroxilose; AnAra: anidroarabinose; presentes como componentes das hemiceluloses e quantificadas como xilose, arabinose e ácido acético em meio aquoso; o produto da reação de desidratação de pentoses (furfural) também foi considerado nos cálculos;

³ O produto da reação de desidratação de hexoses (HMF) também foi considerado nos cálculos de AnGlc.

FONTE: A autora (2021).

É interessante observar que, diferentemente de outras técnicas como a explosão a vapor (FOCKINK *et al.*, 2018) e a hidrotermólise (EOM *et al.*, 2015), os pré-tratamentos *organosolv* realizados neste estudo não levaram à desacetilação completa das hemiceluloses do bagaço de cana, sendo que a recuperação máxima de grupos acetila nas frações hidrossolúveis, na forma de ácido acético, foi de 26 ± 2% (TABELA 20). Outro aspecto extremamente interessante em comparação a outros tipos de pré-tratamento ácido foi a sobrevida da arabinose, gerando altos níveis de recuperação mássica desse monossacarídeo.

A TABELA 21 contém os resultados de sólidos totais solúveis, de sólidos totais insolúveis, de lignina recuperada do licor de extração e da soma de todas essas frações. O maior teor de sólidos totais solúveis (23 ± 3%) derivou do pré-tratamentos com 40% de etanol em água e ácido oxálico na presença de CO₂. Já os melhores resultados agregados foram obtidos a partir dos pré-tratamentos com 60% de etanol em água e ácido oxálico, independentemente da presença de CO₂, contabilizando mais de 90% de recuperação mássica total. Vale ressaltar que os resultados obtidos para sólidos totais solúveis foram superiores aos observados na TABELA 19 para carboidratos totais, sugerindo a presença de outros componentes

do bagaço que não foram quantificados neste trabalho, como pectinas, ácidos urônicos presentes nas hemiceluloses e derivados da lignina, dentre outros. Também é importante ressaltar que os pré-tratamentos realizados na presença de CO₂ apresentaram os maiores rendimentos de recuperação de lignina do licor de extração.

TABELA 21 - SOMA DOS SÓLIDOS TOTAIS SOLÚVEIS E INSOLÚVEIS E DA LIGNINA RECUPERADA DE CADA PRÉ-TRATAMENTO EM 170 °C, 25 g de CO₂ E 15 min PARA A DEFINIÇÃO DA MELHOR PROPORÇÃO ETANOL EM ÁGUA.

Amostra	Sólidos solúveis (%)	Sólidos insolúveis (%)	Lignina (%)	Soma
100% H ₂ O + ácido oxálico (Sem CO ₂)	16,2 ± 0,6	68	0,5	85
100% H ₂ O + ácido oxálico + CO ₂	16,4 ± 0,3	61	4	81
40% EtOH + ácido oxálico (Sem CO ₂)	11 ± 1	54	9	74
40% EtOH + ácido oxálico + CO ₂	23 ± 3	59	7	89
60% EtOH + ácido oxálico (Sem CO ₂)	19 ± 3	65 ± 2	9,2 ± 0,8	93 ± 2
60% EtOH + ácido oxálico + CO ₂	18 ± 1	57 ± 4	14,7 ± 0,8	90 ± 2
80% EtOH + ácido oxálico (Sem CO ₂)	7,3 ± 0,3	74	8	89
80% EtOH + ácido oxálico + CO ₂	7,8 ± 0,4	74	9	91

Com base na experiência do analisador, os erros analíticos foram considerados nos maiores desvios das três repetições independentes observadas da seguinte forma: 3% (Sólidos solúveis), 6% (Sólidos insolúveis), 1% (Lignina recuperada) e 3% (Soma), dos experimentos realizados em simplicatas (sem o desvio padrão na tabela).

FONTE: A autora (2021).

4.3 RECUPERAÇÃO DA LIGNINA

Os licores de extração de cada pré-tratamento foram concentrados até evaporação completa do etanol e, posteriormente, água foi adicionada em excesso para precipitação da lignina. Os resultados de rendimento e de massa recuperada de lignina para diferentes tipos de pré-tratamento encontram-se dispostos na TABELA 22. Para os pré-tratamentos *organosolv* empregando diferentes catalisadores ácidos, a maior média de rendimento de lignina recuperada (28 ± 1%) se deu no pré-tratamento com 60% etanol em água e ácido oxálico assistido por scCO₂ por 60 min de reação. Já o pré-tratamento pelo mesmo tempo com 60% etanol em água e ácido oxálico (sem CO₂) recuperou 24 ± 4% de lignina. Esses experimentos também resultaram nos maiores rendimentos de deslignificação do

bagaço de cana que foram descritos na seção 4.2.1.

Dentre os pré-tratamentos realizados sob diferentes cargas de CO₂ (0, 25, 35 e 50 g), sob condições fixas de 60% de etanol em água, 1% (m/v) de ácido oxálico e 60 min de reação, o maior rendimento de recuperação da lignina se deu com o uso de 50 g de CO₂, no qual 36% da lignina foram recuperados do licor de extração (TABELA 22). Assim, uma vez mais, a adição do CO₂ nos pré-tratamentos *organosolv* favoreceu a recuperação da lignina, pois quanto maior a quantidade de CO₂ utilizada no pré-tratamento, maior foi a sua recuperação mássica.

Schrems *et al.* (2012) estudaram rotas de deslignificação de um modelo de lignina por polpação *organosolv* com e sem a adição de scCO₂. Foi verificado que o scCO₂ aumenta a fragmentação da lignina por diminuir a energia de ativação da quebra de ligações éter, especialmente α -éteres, enquanto a clivagem de β -éteres foi observada apenas sob condições ácidas ou alcalinas. Foi concluído que o scCO₂ não influenciou apenas a polaridade, a difusividade e a acessibilidade do sistema de polpação, mas também afetou os parâmetros de ativação de reações químicas e, assim, a cinética de fragmentação da lignina. Essa pode ser a razão pela qual esse trabalho apresentou os maiores rendimentos de lignina recuperada do licor de extração após o pré-tratamento *organosolv* em condições supercríticas.

Os pré-tratamentos por 15 min com 60% de etanol em água e ácido oxálico na ausência e na presença de 25 g de scCO₂ levaram aos maiores rendimentos de recuperação de lignina, em relação aos mesmos pré-tratamentos realizados por 60 min. Por exemplo, $68 \pm 2\%$ da lignina foi recuperada do licor de extração após pré-tratamento por 15 min nessas condições.

Os valores obtidos com a soma da lignina recuperada do licor de extração e da lignina retida na fração sólida para as diferentes condições de pré-tratamento da TABELA 22 foram sempre inferiores a 92%. Isso pode ser atribuído às medidas de recuperação de lignina, que não foram absolutas devido a perdas ou precipitação ineficiente, a partir do licor de extração, ou seja, uma parte da lignina permaneceu retida na fração solúvel.

TABELA 22 - RENDIMENTOS E MASSAS DAS LIGNINAS RECUPERADAS DO LICOR DE EXTRAÇÃO APÓS DIFERENTES CONDIÇÕES DE PRÉ-TRATAMENTOS ORGANOSOLV DO BAGAÇO DE CANA A 170 °C.

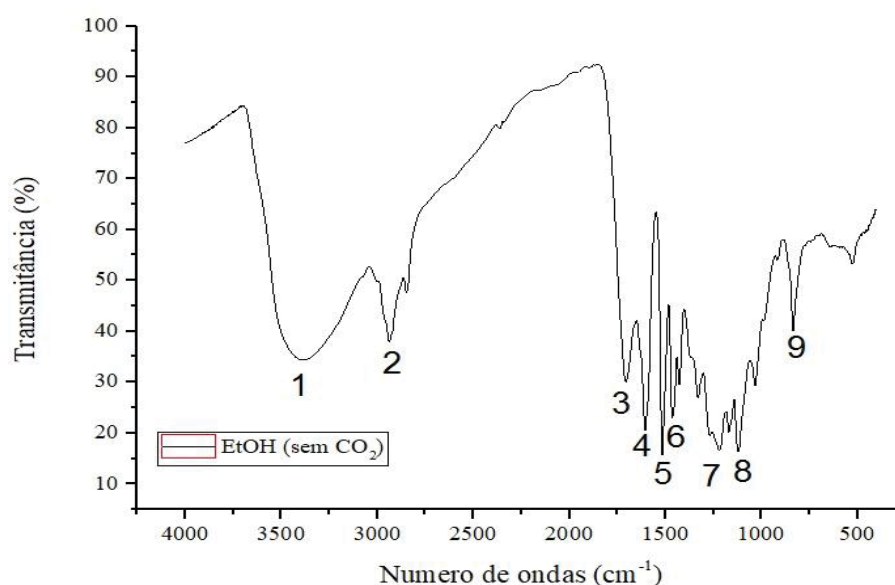
Experimento	Lignina (g)	Rendimento de lignina recuperada (%)	Lignina total da fração sólida (%)	Soma das duas frações (%) ¹
60% EtOH (sem CO ₂) (60 min)	0,17 ± 0,02	13 ± 1	56 ± 2	69 ± 1
60% EtOH + 25 g de CO ₂ (60 min)	0,32 ± 0,01	24 ± 1	51 ± 2	75 ± 1
60% EtOH + ácido acético (sem CO ₂) (60 min)	0,3 ± 0,1	23 ± 3	38 ± 3	61 ± 3
60% EtOH + ácido acético + 25 g de CO ₂ (60 min)	0,3 ± 0,1	23 ± 5	43 ± 4	66 ± 1
60% EtOH + ácido cítrico (sem CO ₂) (60 min)	0,31 ± 0,02	23 ± 1	24 ± 3	47 ± 2
60% EtOH + ácido cítrico + 25 g de CO ₂ (60 min)	0,3 ± 0,1	23 ± 1	16 ± 3	39 ± 1
60% EtOH + ácido oxálico (sem CO ₂) (60 min)	0,3 ± 0,1	24 ± 4	14 ± 1	38 ± 3
60% EtOH + ácido oxálico + 25 g de CO ₂ (60 min)	0,4 ± 0,1	28 ± 1	14,4 ± 0,3	42 ± 1
60% EtOH + ácido oxálico + 35 g de CO ₂ (60 min)	0,45	33	16	49
60% EtOH + ácido oxálico + 50 g de CO ₂ (60 min)	0,49	36	13	49
100% H ₂ O + ácido oxálico (Sem CO ₂) (15 min)	0,03	2	77	79
100% H ₂ O + ácido oxálico + 25 g de CO ₂ (15 min)	0,22	17	68	85
40% EtOH + ácido oxálico (Sem CO ₂) (15 min)	0,52	40	29	69
40% EtOH + ácido oxálico + 25 g de CO ₂ (15 min)	0,43	33	36	69
60% EtOH + ácido oxálico (Sem CO ₂) (15 min)	0,55 ± 0,05	42 ± 2	32,4 ± 0,8	74 ± 1
60% EtOH + ácido oxálico + 25 g de CO ₂ (15 min)	0,88 ± 0,05	68 ± 2	14 ± 3	82 ± 1
80% EtOH + ácido oxálico (Sem CO ₂) (15 min)	0,45	34	57	91
80% EtOH + ácido oxálico + 25 g de CO ₂ (15 min)	0,52	39	53	92

¹ Soma das ligninas refere-se à soma da lignina total da fração sólida mais a lignina recuperada da fração líquida do material pré-tratado. Com base na experiência do analisador, os erros analíticos foram considerados nos maiores desvios das três repetições independentes observadas na recuperação mássica da seguinte forma: 0,1 g (Lignina), 5% (Rendimento da lignina recuperada), 4% (Lignina total da fração sólida) e 3% (Soma das ligninas).

FONTE: A autora (2021).

A FIGURA 21 contém o espectro no infravermelho da lignina recuperada do licor de extração oriundo do pré-tratamento com 60% etanol em água por 60 min, na ausência de CO₂. Os demais espectros estão no APÊNDICE B (FIGURA B1) deste relatório, porém, nem todas as amostras foram analisadas por essa técnica porque o laboratório responsável pela análise permaneceu fechado durante todo o período da pandemia.

FIGURA 21 - EXEMPLO DE ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DA LIGNINA RECUPERADA DO LICOR DE EXTRAÇÃO APÓS PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA COM 60% (v/v) DE ETANOL EM ÁGUA SEM CO₂ A 170 °C E 60 min DE REAÇÃO.



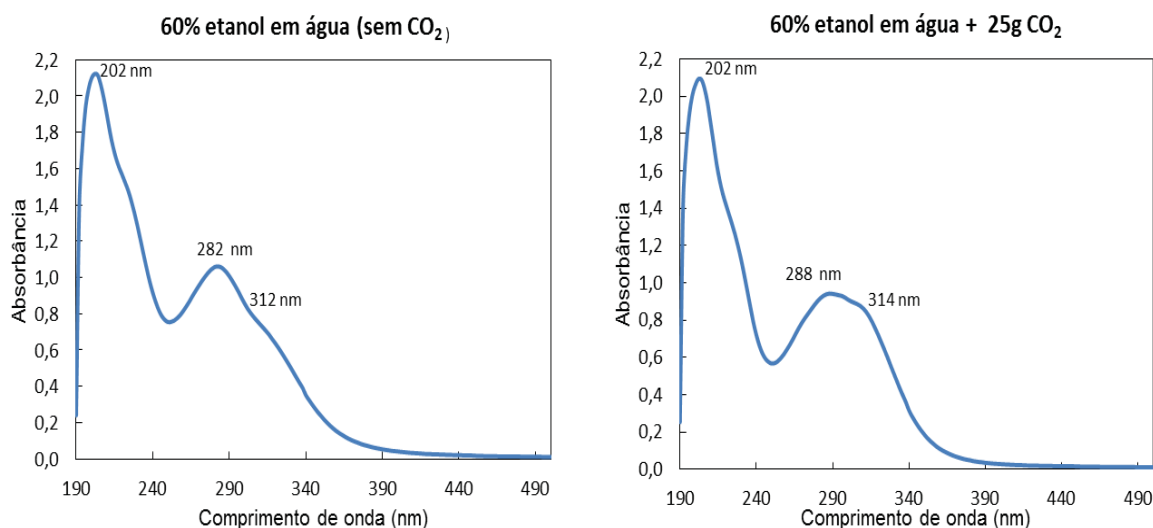
FONTE: A autora (2021).

Os espectros obtidos por FTIR, interpretados de acordo com Stark *et al.* (2016), Singh *et al.* (2005) e Kubo e Kadla (2005), revelaram bandas características de lignina em todas as amostras. Bandas largas na região de 3448 a 3428 cm⁻¹ (1) foram atribuídas às ligações de hidrogênio inter e intramoleculares de grupos hidroxila (deformação axial de O-H associado). Essa banda pode ser atribuída à presença de hidroxilas fenólicas e alifáticas na lignina, além de eventuais contaminações da amostra com umidade e carboidratos. As bandas presentes na região de 2948 a 2928 cm⁻¹ (2) correspondem ao estiramento de ligações C-H em grupos metílicos e metilênicos. Em 1714 cm⁻¹ (3) observa-se uma banda referente ao estiramento C=O em cetonas, carbonilas e grupos éster. As bandas intensas e finas próximas de 1606, 1515 e 1465 cm⁻¹ (4, 5 e 6) são referentes às vibrações do

esqueleto aromático da lignina. As bandas localizadas em $1270\text{--}1260\text{ cm}^{-1}$ (7) referem-se às deformações das ligações C-O de anéis guaiacílicos e em 1040 cm^{-1} (8) encontram-se as deformações no plano de C-H aromático e de C-O em álcoois primários. Já próximo a 835 cm^{-1} (9) pode-se identificar a banda referente à deformação angular de C-H fora do plano de ligação C-H aromáticas em unidades siringila.

As frações solúveis em água, após precipitação para isolamento da lignina, foram analisadas por espectrofotometria na região UV-Vis nos comprimentos de onda de 190 a 490 nm. Os espectros obtidos para cada condição de pré-tratamento estudada neste trabalho estão apresentados no APÊNDICE C (FIGURAS C1, C2, C3 e C4). O espectro da FIGURA 22, relativo ao pré-tratamento com 60% de etanol em água na ausência de CO_2 em 60 min, é um exemplo verídico do perfil espectral de todas essas frações hidrossolúveis.

FIGURA 22 – ESPECTROS NO UV-VIS DAS FRAÇÕES HIDROSSOLÚVEIS OBTIDAS APÓS PRECIPITAÇÃO DA LIGNINA, EMPREGANDO PRÉ-TRATAMENTOS COM 60% (v/v) ETANOL EM ÁGUA A $170\text{ }^{\circ}\text{C}$ POR 60 min NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE CO_2 .



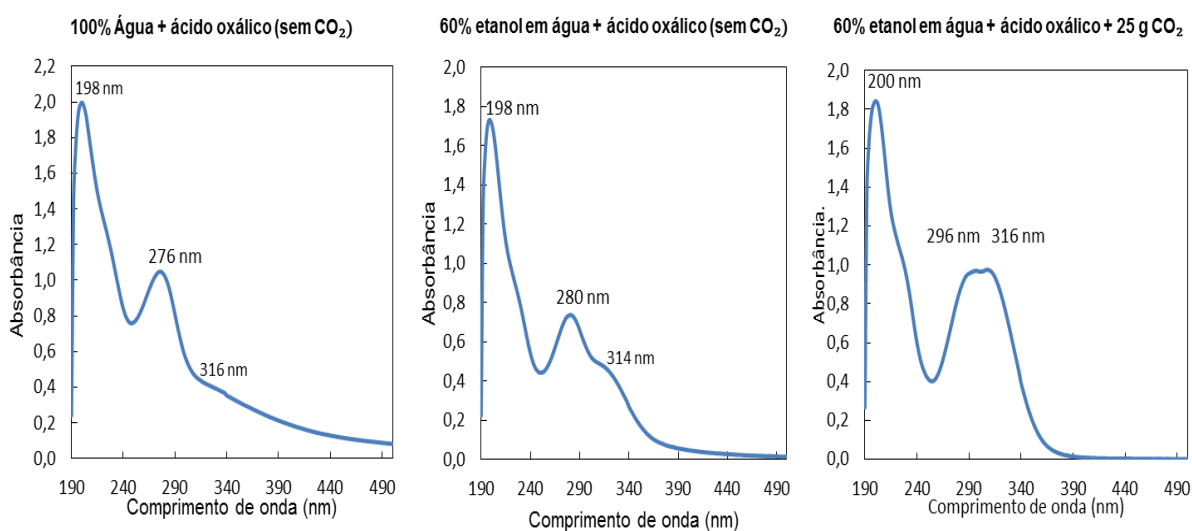
FONTE: A autora (2021).

A hipótese de precipitação ineficiente da lignina é reforçada pela FIGURA 22, que apresenta bandas típicas de lignina com λ_{max} nas faixas de 200, 280 e 314 nm. No entanto, as bandas centradas em 280 nm podem estar parcialmente relacionada a compostos furânicos (furfural e HMF) formados durante o pré-tratamento. Além

disso, a presença de CO_2 em pré-tratamentos alargou as bandas nas regiões de 288 nm a 314 nm, e isso deve estar associado a uma maior presença de fenóis substituídos (ácidos cinâmicos) nessas frações.

A FIGURA 23 contém os espectros UV-vis de frações hidrossolúveis obtidas após a precipitação da lignina a partir de pré-tratamentos realizados com ácido oxálico diluído (sem etanol e CO_2) e com 60% etanol em água na presença e na ausência de CO_2 . Pode perceber que na ausência de etanol, houve aumento da acidez do meio reacional provocada pela força do ácido oxálico (100% água), a banda de fenóis substituídos na região próxima de 314 nm foi bem menos intensa, provavelmente devido à baixa solubilidade de fragmentos de lignina em meio aquoso. Já no pré-tratamento com ácido oxálico na presença de etanol, a lignina pode ser removida em maior extensão e por isso aumentou a intensidade da banda em 314 nm. Finalmente, efeito foi ampliado na presença de CO_2 devido a sua capacidade em aumentar a permeabilidade do solvente contendo ácido oxálico na estrutura lignocelulósica do bagaço de cana. As bases moleculares desse fenômeno ainda precisarão ser mais bem investigadas.

FIGURA 23 - ESPECTROS NO UV-VIS DAS FRAÇÕES HIDROSSOLÚVEIS OBTIDAS APÓS PRECIPITAÇÃO DA LIGNINA, EMPREGANDO PRÉ-TRATAMENTOS COM 100% ÁGUA (SEM CO_2) E 60% (v/v) DE ETANOL EM ÁGUA NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE CO_2 , 170 °C POR 15 min.



FONTE: A autora (2021).

4.4 AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO

Nos pré-tratamentos *organosolv* que empregam ácidos e álcoois em temperaturas de moderadas a altas podem levar à formação de ésteres por meio de reações de esterificação. Trata-se de uma reação reversível cujo equilíbrio depende das condições de reação e da presença de água (CARATELLI *et al.*, 2017). Como o sucesso do pré-tratamento depende da presença de um catalisador ácido, sua eficiência dependeria da taxa de conversão do ácido oxálico em oxalato de etila.

A esterificação do ácido oxálico na presença de etanol aquoso foi investigada em reações de 15 min, e os rendimentos foram calculados por diferença de acidez de acordo com a Equação 11 (TABELA 23). É importante mencionar que esses valores calculados a partir de reações realizadas na ausência de bagaço de cana (branco do experimento) para facilitar a determinação da taxa de conversão dos ácidos em ésteres.

Os melhores resultados de conversão do ácido oxálico em oxalato de etila foram observados em experimentos realizados com 80% de etanol em água e ácido oxálico na ausência e na presença de CO₂, cujos valores foram de $75,6 \pm 0,8\%$ e $80,17 \pm 0,04\%$, respectivamente. Ou seja, maiores rendimentos de esterificação foram observados nos experimentos em que a menor quantidade de água estava presente. A formação dos ésteres também foi acompanhada por um aumento do pH do meio, fato diretamente associado à habilidade do sistema em hidrolisar as hemiceluloses e outras ligações lábeis da estrutura macromolecular do bagaço. Percebe-se também que a presença de CO₂ favoreceu a esterificação e isso pode ser devido à formação do ácido carbônico, que pode aumentar a taxa de reação por atuar como um catalisador ácido. Vale ressaltar que essa reação seria autocatalítica, e que o efeito do ácido carbônico seria apenas complementar ao do próprio ácido oxálico.

Dado o efeito negativo da água sobre o mecanismo de formação do éster, experimentos realizados com menores quantidades de etanol (40 e 60%) levaram a uma menor formação do oxalato de etila e a um menor aumento do pH do meio de reação (TABELA 23). Além disso, o aumento do tempo de reação de 15 para 60 min aumentou a taxa de esterificação, que alcançou valores de conversão de $83,6 \pm 0,01\%$ na ausência de CO₂ e $85,4 \pm 0,2\%$ na presença de CO₂.

TABELA 23 - ACIDEZ E CONVERSÃO EM ÉSTERES DE PRÉ-TRATAMENTOS SEM BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR A 170 °C E 25 g DE CO₂ EM DIFERENTES PROPORÇÕES DE ETANOL EM ÁGUA.

Amostra	Acidez inicial	pH inicial	Acidez final	pH final	Conversão (%)
40% EtOH + ácido oxálico (Sem CO ₂) (15 min)	2,34 ± 0,01	2,07 ± 0,01	1,00 ± 0,03	1,9 ± 0,2	57,0 ± 0,1
40% EtOH + ácido oxálico + CO ₂ (15 min)	2,34 ± 0,01	2,07 ± 0,01	0,90 ± 0,02	1,97 ± 0,03	61,5 ± 0,8
60% EtOH + ácido oxálico (Sem CO ₂) (15 min)	3,39 ± 0,01	2,20 ± 0,01	1,21 ± 0,01	2,06 ± 0,09	64,3 ± 0,4
60% EtOH + ácido oxálico + CO ₂ (15 min)	3,39 ± 0,01	2,20 ± 0,01	0,90 ± 0,02	2,11 ± 0,08	73,37 ± 0,04
80% EtOH + ácido oxálico (Sem CO ₂) (15 min)	3,53 ± 0,04	2,29 ± 0,02	0,86 ± 0,02	2,31 ± 0,05	75,6 ± 0,8
80% EtOH + ácido oxálico + CO ₂ (15 min)	3,53 ± 0,04	2,29 ± 0,02	0,70 ± 0,01	3,43 ± 0,04	80,17 ± 0,04
60% EtOH + ácido oxálico (Sem CO ₂) (60 min)	3,39 ± 0,01	2,20 ± 0,01	0,55 ± 0,03	2,51 ± 0,03	83,6 ± 0,01
60% EtOH + ácido oxálico + CO ₂ (60 min)	3,39 ± 0,01	2,20 ± 0,01	0,50 ± 0,01	2,69 ± 0,01	85,4 ± 0,2

FONTE: A autora (2021).

4.5 PRÉ-OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO

O planejamento experimental apresentado a seguir foi baseado nas melhores respostas obtidas nas seções anteriores, ou seja, altas taxas de recuperação de glucanas e de deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar. As condições identificadas até então para obtenção das melhores respostas foram: ácido oxálico como melhor catalisador ácido, 60% (v/v) de etanol em água, 25 g de CO₂ como condição suficiente para obter uma boa homogeneidade no sistema e superioridade dos processos *organosolv* realizados na presença de CO₂, principalmente em tempos de reações menores do que 60 min de reação.

Os pré-tratamentos foram realizados variando a temperatura (150 - 190 °C), a concentração do ácido oxálico (0 - 1,5% [m/v]) e o tempo de reação (0 a 30 min). A TABELA 24 contém os valores de rendimento mássico (R_M) das amostras de bagaço que foram tratados seguindo o planejamento proposto. Os valores de R_M das frações insolúveis foram fortemente influenciados pela temperatura. Para os pré-tratamentos realizados a 150 °C, os R_M foram de 56% a 79% (m/m), enquanto para a temperatura de 190 °C, estes valores variaram de 49% a 56% (m/m). Possivelmente, a maior severidade nos processos realizados a 190 °C levou a uma maior perda de componentes voláteis e a uma maior taxa de degradação de carboidratos mais acessíveis.

A composição química dos materiais pré-tratados está disponível na TABELA 24, onde observa-se que os teores de anidrogucose foram sempre superiores ao bagaço de origem (BC_{LEE}), enquanto os teores de anidroxilose e de lignina insolúvel e solúvel em ácido foram inferiores, indicando que esses componentes foram hidrolisados e transferidos para a fração solúvel. Anidroarabinose não foi detectada em nenhuma das amostras e grupos acetil estiveram presentes somente na amostra tratada até 150 °C com 0,5% de ácido oxálico, sem nenhum tempo de reação em condição isotérmica. Nesse caso, foi considerado apenas o tempo de aquecimento para atingir a temperatura desejada, podendo este variar de 16 a 26 min. Os controles de temperatura desses experimentos estão localizados no APÊNDICE A (TABELA A5 e FIGURA A5) deste trabalho.

A TABELA 25 mostra os rendimentos teóricos dos principais componentes do bagaço de cana da fração insolúvel. Todas as amostras tratadas a 150 °C apresentaram altos rendimentos de recuperação de anidrogucose, bem como de

anidroxilose e das ligninas insolúvel e solúvel em ácido. Já as amostras tratadas a 190 °C apresentaram os menores percentuais de recuperação de anidroglicose e das ligninas insolúvel e solúvel em ácido, com exceção da amostra tratada com 0,5% (m/v) de ácido oxálico até 190 °C, sem a etapa isotérmica. Já as amostras pré-tratadas a 170 °C com 1% (m/v) de ácido oxálico e 15 min de reação apresentaram alta recuperação de anidroglicose ($89 \pm 4\%$) e baixa recuperação das ligninas insolúvel e solúvel em ácido, que foram de $12 \pm 2\%$ e $20 \pm 2\%$, respectivamente. Nessa condição, a deslignificação do bagaço de cana foi de $86 \pm 2\%$.

Escobar (2021) estudou o fracionamento do bagaço de cana com pré-tratamento *organosolv* empregando uma combinação entre um solvente eutético profundo composto por cloreto de colina e ácido oxálico, etanol aquoso e dióxido de carbono (CO₂). Os melhores resultados foram de 91,2% de remoção da lignina insolúvel em ácido em 80% de etanol em água e 86,0% de deslignificação em 60% de etanol em água, com um percentual de retenção de glucanas nas fibras de 80 e 70%, respectivamente. Esses resultados foram obtidos a 170 °C com 10 g de CO₂ por 60 min de reação e agitação de 500 rpm, enquanto, no presente trabalho, foi possível atingir uma deslignificação de $86 \pm 2\%$ do bagaço de cana empregando 60% de etanol em água e uma recuperação de glucanas de $89 \pm 4\%$. Muitos trabalhos científicos mencionam temperaturas próximas a 170 °C ideais para pré-tratamentos *organosolv* (PASQUINI *et al.*, 2005a; KALOGIANNIS *et al.*, 2018; SURIYACHAI, *et al.*, 2018).

Pasquini *et al.* (2005a) empregaram scCO₂ e misturas de etanol em água para remoção da lignina de lascas de *Pinus taeda* e de bagaço de cana-de-açúcar. Os resultados de deslignificação foram de 83,1% para *P. taeda* e de 93,5% para bagaço de cana empregando uma concentração de etanol em água de 50% (v/v) a uma pressão e temperatura de 19 MPa e 170 °C por 60 min de reação. Esse trabalho foi realizado em pressões mais altas, mas a quantidade de CO₂ adicionada ao sistema não foi informada pelos autores.

Kalogiannis *et al.* (2018) fracionaram serragem de madeira de faia usando catálise ácida na presença de 60% etanol em água a 175 °C por 60 min. O uso de ácido fosfórico propiciou a remoção de mais de 90% da lignina, enquanto a deslignificação obtida com ácido oxálico ficou em cerca de 75%.

TABELA 24 - RENDIMENTO DA RECUPERAÇÃO MÁSSICA E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO INSOLÚVEL DOS BAGAÇOS DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADOS COM 60% (v/v) DE ETANOL EM ÁGUA E ÁCIDO OXÁLICO ASSISTIDO POR CO₂ SUPERCRÍTICO

Sigla	T (°C)	Ácido oxálico (%) [m/v]	Tempo (min)	R _M (%)	Composição química da fração sólida (%)						
					AnGlc ¹	AnXyl ²	AnAra ²	Acetila ²	LIA	LSA	Lignina total ³
P1500500	150	0,5	0	78,42	47 ± 3 ^b	15 ± 2 ^f	a.l.d.	3,8 ± 0,4 ^b	13,5 ± 0,5 ^c	3,7 ± 0,2 ^c	17,2 ± 0,2 ^e
P1500530	150	0,5	30	65,65	52 ± 2 ^{a,b}	12 ± 1 ^{c,d,e}	a.l.d.	a.l.d. ^a	11,1 ± 0,2 ^{b,c}	3,2 ± 0,4 ^c	14,3 ± 0,1 ^b
P1501500	150	1,5	0	66,46	55 ± 2 ^{a,b}	13 ± 1 ^{d,e}	a.l.d.	a.l.d. ^a	11,2 ± 0,2 ^{b,c}	2,6 ± 0,4 ^{a,b}	13,8 ± 0,1 ^b
P1501530	150	1,5	30	56,92	61 ± 3 ^a	9,2 ± 0,3 ^{a,b,c,d}	a.l.d.	a.l.d. ^a	8,9 ± 0,4 ^b	2,09 ± 0,06 ^{a,b,c}	11,0 ± 0,3 ^d
P1701015	170	1,0	15	54 ± 2	64 ± 4 ^a	7,3 ± 0,8 ^{a,b,c}	a.l.d.	a.l.d. ^a	3,8 ± 0,7 ^a	2,0 ± 0,1 ^{a,b}	5,8 ± 0,8 ^{a,c}
P1900500	190	0,5	0	55,36	44,0 ± 0,7 ^b	11 ± 1 ^{b,c,d,e}	a.l.d.	a.l.d. ^a	9,9 ± 0,5 ^b	2,6 ± 0,1 ^{a,b,c}	12,5 ± 0,3 ^{b,d}
P1900530	190	0,5	30	51,55	64,0 ± 0,2 ^a	5,0 ± 0,5 ^a	a.l.d.	a.l.d. ^a	3,2 ± 0,5 ^a	1,6 ± 0,1 ^a	4,7 ± 0,3 ^a
P1901500	190	1,5	0	53,79	54,9 ± 0,2 ^{a,b}	5,8 ± 0,2 ^{a,b}	a.l.d.	a.l.d. ^a	4,5 ± 0,3 ^a	2,2 ± 0,2 ^{a,b}	6,6 ± 0,1 ^c
P1901530	190	1,5	30	49,47	52 ± 3 ^{a,b}	4,6 ± 0,7 ^a	a.l.d.	a.l.d. ^a	2,45 ± 0,01 ^a	1,8 ± 0,1 ^a	4,2 ± 0,1 ^a
Bagaço de cana livre de extraíveis (BC _{LEE})					39 ± 1	18 ± 1	1,2 ± 0,1	5,5 ± 0,1	17,6 ± 0,4	5,4 ± 0,2	23,0 ± 0,2

R_M, recuperação mássica do pré-tratamento, ou (m_{final}/min_{cia}), 100 em base seca; com base na experiência do analisador, os erros analíticos foram considerados nos maiores desvios das três repetições independentes observadas no rendimento da recuperação mássica da fração insolúvel, com 6%.

¹ AnGlc, anidroglicose; presente como componente das β-(1→4)-D-glucanas (celulose), quantificada como glucose em meio aquoso;

² AnXyl, anidroxilose; AnAra, anidroarabinose; presentes como componentes das hemiceluloses, quantificadas como xilose e arabinose em meio aquoso;

³ Somatórios da lignina insolúvel em ácido e lignina solúvel em ácido;

a.l.d., abaixo do limite de detecção.

LIA, lignina insolúvel em ácido;

LSA, lignina solúvel em ácido;

Teste Tukey = médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, a 5 % de probabilidade.

FONTE: A autora (2021).

TABELA 25 - RECUPERAÇÃO MÁSSICA RELATIVA DOS PRINCIPAIS COMPONENTES DOS BAGAÇOS DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADOS COM 60% (v/v) DE ETANOL EM ÁGUA E ÁCIDO OXÁLICO ASSISTIDO POR CO₂ SUPERCRÍTICO

Sigla	T (°C)	Ácido oxálico (%) [m/v]	Tempo (min)	Rendimentos teóricos da fração sólida (%)						
				AnGlc ¹	AnXyl ²	AnAra ²	Grupo acetila ²	LIA	LSA	Lignina total ³
P1500500	150	0,5	0	94,51 ^a	65,35 ^c	a.l.d.	54,18 ^b	60,15 ^d	53,73 ^b	58,64 ^d
P1500530	150	0,5	30	87,53 ^a	43,77 ^{a,b,c}	a.l.d.	a.l.d. ^a	41,40 ^b	38,90 ^{a,b}	40,82 ^{c,d}
P1501500	150	1,5	0	93,73 ^a	48,00 ^{b,c}	a.l.d.	a.l.d. ^a	42,29 ^b	32,00 ^{a,b}	39,88 ^{c,d}
P1501530	150	1,5	30	89,03 ^a	29,09 ^{a,b}	a.l.d.	a.l.d. ^a	28,78 ^{b,c}	22,03 ^a	27,22 ^{a,b,c}
P1701015	170	1,0	15	89 ± 4 ^a	22 ± 3 ^a	a.l.d.	a.l.d. ^a	12 ± 2 ^a	20 ± 2 ^a	14 ± 2 ^{a,b}
P1900500	190	0,5	0	91,41 ^a	39,36 ^{a,b,c}	a.l.d.	a.l.d. ^a	36,23 ^b	31,01 ^{a,b}	35,00 ^{b,c,d}
P1900530	190	0,5	30	84,59 ^a	14,32 ^a	a.l.d.	a.l.d. ^a	9,37 ^a	15,27 ^a	10,53 ^a
P1901500	190	1,5	0	75,72 ^a	17,33 ^{a,b}	a.l.d.	a.l.d. ^a	13,75 ^{a,c}	21,91	15,44 ^{a,b}
P1901530	190	1,5	30	65,96 ^b	12,64 ^a	a.l.d.	a.l.d. ^a	6,89 ^a	16,49 ^a	9,03 ^a

¹ AnGlc, anidroglicose; presente como componente das β-(1→4)-D-glucanas (celulose), quantificada como glucose em meio aquoso;

² AnXyl, anidroxilose; AnAra, anidroarabinose; presentes como componentes das hemiceluloses, quantificadas como xilose e arabinose em meio aquoso;

³ Somatórios da lignina insolúvel em ácido e lignina solúvel em ácido;

a.l.d., abaixo do limite de detecção.

LIA, lignina insolúvel em ácido;

LSA, lignina solúvel em ácido;

Teste Tukey = médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, a 5 % de probabilidade; com base na experiência do analisador, os erros analíticos foram considerados nos maiores desvios das três repetições independentes observadas na recuperação mássica da seguinte forma: 6% (AnGlc), 6% (Xyl) e 5% (Acetila), 3% (Lignina insolúvel), 5% (Lignina solúvel) e 4% (lignina total) dos experimentos realizados em simplicatas (sem o desvio padrão na tabela).

FONTE: A autora (2021).

Suriyachai *et al.* (2018) estudaram o pré-tratamento *organosolv* de bagaço de cana empregando uma mistura de solventes contendo água, etanol, acetato de etila e ácido fórmico. A deslignificação obtida foi de 85,4% a 170 °C em 50 min de reação para uma retenção de glucanas de 72%. Esse valor de deslignificação foi muito próximo ao obtido no presente trabalho, porém, em um tempo de reação superior, enquanto o valor de recuperação de glucanas foi sensivelmente inferior.

Os dados de recuperação de anidroglicose e de deslignificação do bagaço de cana foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e modelos estatísticos foram ajustados usando interação de pares e verificação de curvatura, retornando coeficientes de regressão de 0,991 e de 0,988, respectivamente (TABELAS 26 e 27). A obtenção de altos valores de F demonstraram que houve tendência quando essas variáveis foram modeladas pelas equações empregadas. Os baixos valores de F indicaram que os resíduos existentes nos respectivos modelos não foram estatisticamente significativos. As variáveis que apresentaram valores de *p* inferiores a 0,05 foram consideradas estatisticamente relevantes dentro de um intervalo de confiança de 95%. Portanto, houve menos de 5% de probabilidade para a hipótese nula, onde os valores experimentais são aleatórios.

TABELA 26 - DADOS ANOVA RELACIONANDOS A RECUPERAÇÃO MÁSSICA DE ANIDROGLUCOSE DA FRAÇÃO INSOLÚVEL DOS BAGAÇOS DE CANA-DE-AÇÚCAR TRATADOS SEGUINDO O PLANEJAMENTO ($R^2 = 0,991$).

Variáveis	Fatores				
	SQ	GL	QM	F	<i>p</i>
Curvatura	115,5270	1	115,5270	50,5403	0,005727
(1) Temperatura (°C)	277,537	1	277,537	121,4157	0,001601
(2) Ácido oxálico (%)	141,1200	1	141,1200	61,7366	0,004294
(3) Tempo (min)	99,8284	1	99,8284	43,6726	0,007055
1 by 2	153,475	1	153,475	67,1417	0,003803
1by 3	3,0012	1	3,0012	1,3130	0,334974
2 by 3	0,0544	1	0,0544	0,0238	0,887141
Erro	6,8575	3	2,2858		
Total SQ	797,401	10			

SQ = soma dos quadrados; GL = grau de liberdade; MQ = média dos quadrados; F = distribuição de Fischer encontrada; *p*-valor é utilizado como ferramenta estatística para descartar a hipótese nula (*p*=0,05).

FONTE: A autora (2021).

TABELA 27 - DADOS ANOVA RELACIONANDOS A DESLIGNIFICAÇÃO DA FRAÇÃO INSOLÚVEL DOS BAGAÇOS DE CANA-DE-AÇÚCAR TRATADOS SEGUINDO O PLANEJAMENTO ($R^2 = 0,988$).

Variáveis	Fatores				
	SQ	GL	QM	F	p
Curvatura	595,710	1	595,710	53,3082	0,005305
(1) Temperatura (°C)	1165,479	1	1165,479	111,0032	0,001826
(2) Ácido oxálico (%)	356,712	1	356,712	33,9742	0,010059
(3) Tempo (min)	470,631	1	470,631	44,8241	0,006798
1 by 2	15,961	1	15,961	1,5202	0,305396
1 by 3	0,020	1	0,020	0,0019	0,967930
2 by 3	67,396	1	67,396	6,4190	0,085157
Erro	31,499	3	10,500		
Total SQ	2667,408	10			

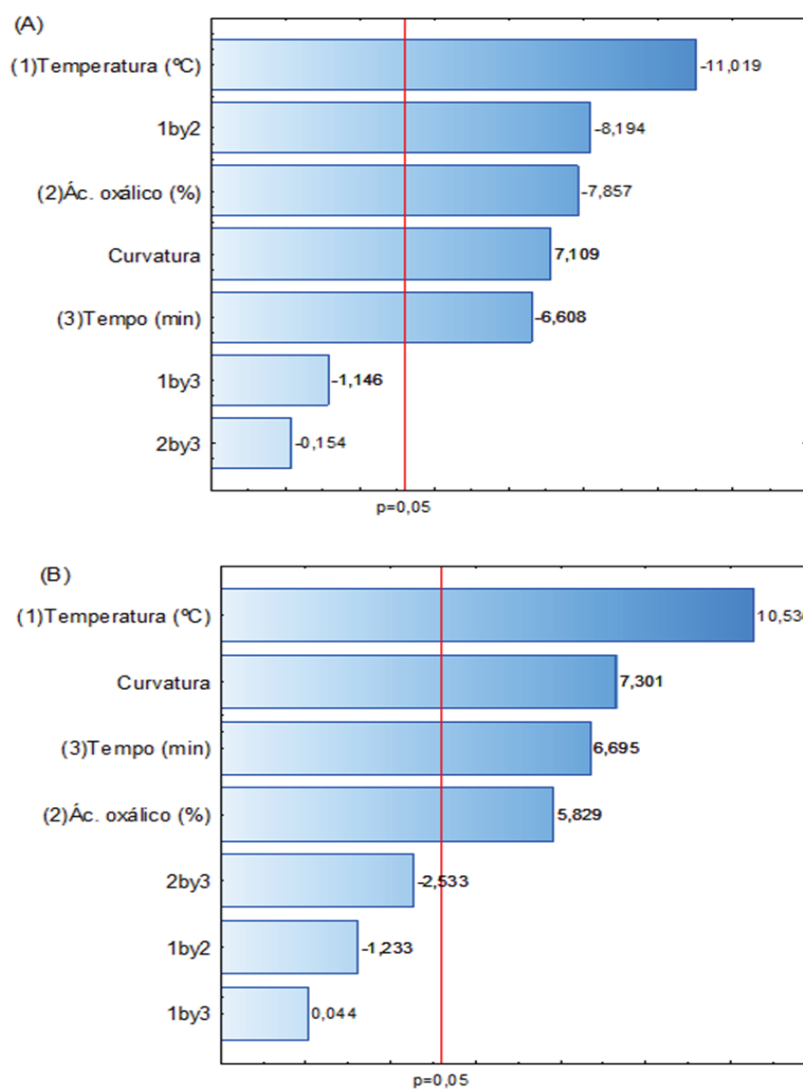
SQ = soma dos quadrados; GL = grau de liberdade; MQ = média dos quadrados; F = distribuição de Fischer encontrada; p-valor é utilizado como ferramenta estatística para descartar a hipótese nula ($p=0,05$).

FONTE: A autora (2021).

A FIGURA 24 apresenta gráficos de Pareto para a recuperação mássica de anidroglicose na fração insolúvel (A) e para a deslignificação do bagaço de cana (B). O perfil obtido para recuperação mássica de anidroglicose mostra que o modelo estatístico ajustado contou com um efeito significativo da curvatura (7,109 *p.p.*), caracterizando um sistema não linear. As variáveis independentes, temperatura, concentração do ácido oxálico, tempo de reação e a combinação das variáveis temperatura e concentração do ácido oxálico foram estatisticamente significativas, apresentando valores de -11,019, -7,857, -6,608 e -8,194 *p.p.*, respectivamente. No entanto, essas variáveis de processo tiveram efeitos antagônicos possivelmente porque maiores valores de temperatura, concentração do ácido oxálico e tempo de reação favoreçam a ocorrência de reações de degradação de hemiceluloses. Já para a deslignificação (B), todas as variáveis independentes apresentaram efeitos estatisticamente significativos, de 10,563, 6,695 e 5,829 *p.p.* para temperatura, tempo e concentração de ácido oxálico, respectivamente. O modelo estatístico ajustado apresentou um efeito significativo da curvatura de 7,301 *p.p.*, indicando novamente a não linearidade do sistema. Esses efeitos indicam que a temperatura é

a variável de maior impacto sobre os rendimentos de deslignificação.

FIGURA 24 - GRÁFICOS DE PARETO PARA A RECUPERAÇÃO MÁSSICA DE ANIDROGLUCOSE (A) E DE DESLIGNIFICAÇÃO (B) DOS BAGAÇOS DE CANA-DE-AÇÚCAR TRATADOS.

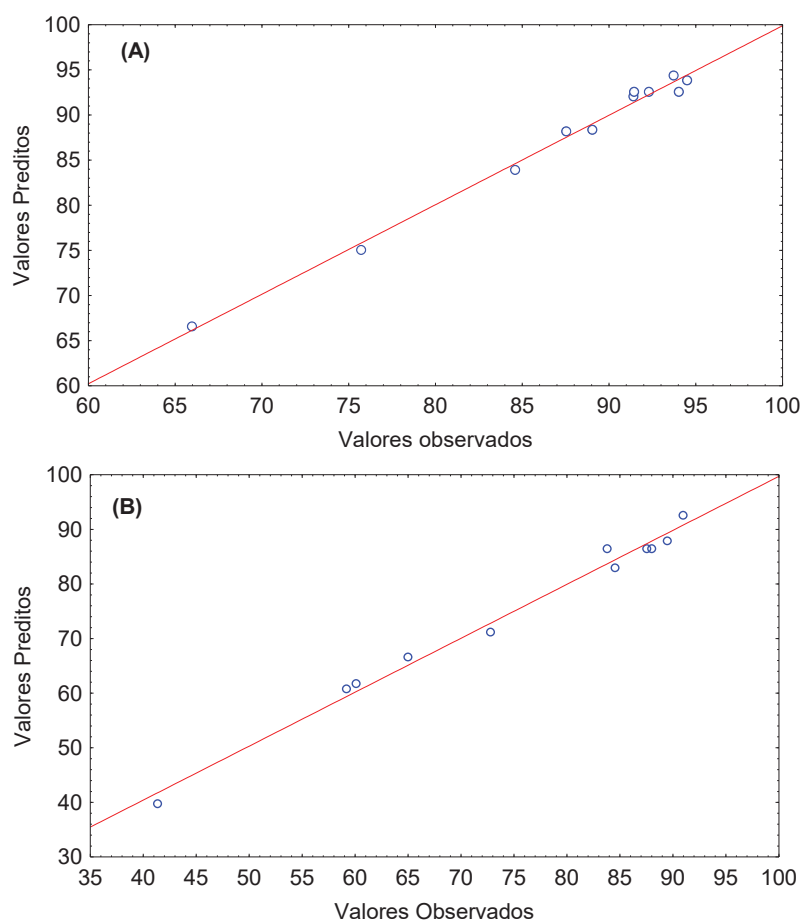


FONTE: A autora (2021).

A FIGURA 25 exibe gráficos de valores observados vs. preditos para a recuperação mássica de anidroglucose na fração insolúvel (A) e para o rendimento de deslignificação (B) do bagaço de cana. Quanto maior a variância explicada pelo modelo de regressão, mais próximos os dados experimentais estarão dispostos em relação à linha de regressão ajustada. A boa correlação entre os valores observados e preditos em ambos os gráficos, afirmaram mais uma vez, a boa qualidade do modelo estatístico ajustado, inferindo interações bidirecionais e verificação de

curvatura dentro do espaço amostral das variáveis empregadas. Em geral, os resultados obtidos com 60% de etanol em água e ácido oxálico na presença de scCO_2 atestam a alta seletividade do processo de fracionamento para remoção de lignina e manutenção de glucanas no material pré-tratado

FIGURA 25 - MODELOS ESTATÍSTICOS DE VALORES OBSERVADOS VS. VALORES PREDITOS PARA RECUPERAÇÃO MÁSSICA DE ANIDROGLUCOSE (A) E DE DESLIGNIFICAÇÃO (B) DOS BAGAÇOS DE CANA-DE-AÇÚCAR TRATADOS.



FONTE: A autora (2021).

Os resultados de rendimento e de massa de lignina recuperada do licor de extração estão disponíveis na TABELA 28. Os maiores rendimentos de lignina recuperada foram obtidos a 190 °C por 30 min com 0,5% e 1,5% (m/v) de ácido oxálico, nos quais, que geraram mais de 70% de recuperação de lignina do licor de extração (FIGURA 25).

TABELA 28 - RENDIMENTOS E MASSAS DAS LIGNINAS RECUPERADAS DO LICOR DE EXTRAÇÃO APÓS PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR COM 60% (v/v) DE ETANOL EM ÁGUA E ÁCIDO OXÁLICO ASSISTIDO POR CO₂ SUPERCRÍTICO.

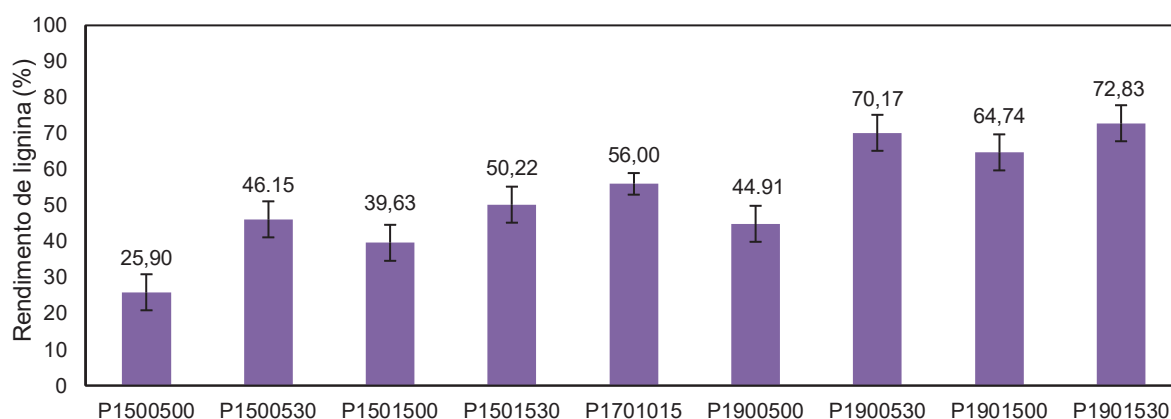
Sigla	T (°C)	Ácido oxálico (%) [m/v]	Tempo (min)	Lignina (g)	Rendimento de lignina recuperada (%)	Lignina total da fração sólida (%)	Soma das duas frações (%) ¹
P1500500	150	0,5	0	0,34	25,90	58,64	84,54
P1500530	150	0,5	30	0,60	46,15	40,82	86,97
P1501500	150	1,5	0	0,51	39,63	39,88	79,51
P1501530	150	1,5	30	0,65	50,22	27,22	77,44
P1701015	170	1,0	15	0,73 ± 0,04	56 ± 3	14 ± 2	70 ± 3
P1900500	190	0,5	0	0,58	44,91	35,00	79,91
P1900530	190	0,5	30	0,91	70,17	10,53	80,70
P1901500	190	1,5	0	0,84	64,74	15,44	80,18
P1901530	190	1,5	30	0,94	72,83	9,03	81,86

¹ Soma das ligninas refere-se à soma da lignina total da fração sólida mais a lignina recuperada da fração líquida do material pré-tratado. Com base na experiência do analisador, os erros analíticos foram considerados nos maiores desvios das três repetições independentes observadas na recuperação mássica da seguinte forma: 0,1 g (Lignina), 5% (Rendimento da lignina recuperada), 4% (Lignina total da fração sólida) e 3% (Soma das ligninas) dos experimentos realizados em simplicatas (sem o desvio padrão na tabela).

FONTE: A autora (2021).

Pode observar na TABELA 28, no geral, pré-tratamentos a 190 °C apresentaram maior recuperação de lignina do que aqueles realizados a 150 °C e 170 °C, exceto para a condição que se limitou ao tempo necessário para atingir a temperatura desejada (ou seja, 0 min de reação isotérmica) (FIGURA 26). Contudo, as somas das ligninas recuperadas dos licores de extração e das ligninas recuperadas das frações sólidas foram inferiores a 87%, ou seja, parte da lignina ainda permaneceu dispersa na fração hidrossolúvel.

FIGURA 26 - RENDIMENTOS DAS LIGNINAS RECUPERADAS DO LICOR DE EXTRAÇÃO APÓS PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR COM 60% (v/v) DE ETANOL EM ÁGUA E ÁCIDO OXÁLICO ASSISTIDO POR CO₂ SUPERCRÍTICO.



Com base na experiência do analisador, os erros analíticos foram considerados nos maiores desvios das três repetições independentes observadas em 5% recuperação mássica da lignina recuperada do licor de extração dos experimentos realizados em simplicatas (sem o desvio padrão na TABELA 28).

FONTE: A autora (2021).

As frações solúveis em água, após extração da lignina do licor de extração, foram analisadas por espectrofotometria UV-Vis nos comprimentos de onda de 190 a 490 nm, e os perfis obtidos encontram-se no APÊNDICE C (FIGURA C5). Todos os espectros apresentaram bandas típicas de lignina, embora o perfil em maiores comprimentos de onda possa ter sido devido à presença de compostos furânicos.

A TABELA 29 apresenta a composição química da fração hidrossolúvel após hidrólise ácida. As concentrações de ácido acético, furfural e HMF foram baixas em todas as amostras, sugerindo um bom potencial desses hidrolisados para processos fermentativos como a produção de etanol celulósico, por exemplo, devido ao alto poder inibitório que apresentam para a hidrólise enzimática e a fermentação (KUCHARSKA *et al.*, 2018).

TABELA 29 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS DOS PRÉ-TRATAMENTOS DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR COM 60% (v/v) DE ETANOL EM ÁGUA E ÁCIDO OXÁLICO ASSISTIDO POR CO₂ SUPERCRÍTICO.

Sigla	T (°C)	Ácido oxálico (%) [m/v]	Tempo (min)	Composição química da fração líquida (g/L)						
				HMF	Furfural	AnGlc ¹	AnXyl ²	AnAra ²	Acetila ²	Carboidratos totais
P1500500	150	0,5	0	0,0044 ± 0,0001	0,06 ± 0,004	0,012 ± 0,001	1,20 ± 0,06	0,1753 ± 0,0003	0,222 ± 0,002	6,0 ± 0,3
P1500530	150	0,5	30	0,0062 ± 0,0002	0,0572 ± 0,0002	0,033 ± 0,004	2,16 ± 0,07	0,27 ± 0,05	0,1402 ± 0,0009	10,5 ± 0,1
P1501500	150	1,5	0	0,0017 ± 0,0001	0,07 ± 0,03	0,032 ± 0,002	1,31 ± 0,05	0,26 ± 0,05	0,154 ± 0,002	7,0 ± 0,1
P1501530	150	1,5	30	0,0017 ± 0,0001	0,057 ± 0,005	0,0145 ± 0,0007	2,133 ± 0,04	0,25 ± 0,03	0,151 ± 0,002	10,2 ± 0,3
P1701015	170	1,0	15	0,025 ± 0,003	0,151 ± 0,006	0,12 ± 0,01	2,9 ± 0,1	0,295 ± 0,004	0,151 ± 0,006	14,5 ± 0,3
P1900500	190	0,5	0	0,007 ± 0,002	0,08 ± 0,01	0,033 ± 0,004	2,3 ± 0,2	0,26 ± 0,05	0,118 ± 0,001	11 ± 1
P1900530	190	0,5	30	0,031 ± 0,002	0,22 ± 0,02	0,187 ± 0,003	3,2 ± 0,1	0,324 ± 0,005	0,116 ± 0,006	16,5 ± 0,5
P1901500	190	1,5	0	0,0390 ± 0,0007	0,117 ± 0,007	0,171 ± 0,003	2,75 ± 0,03	0,311 ± 0,007	0,136 ± 0,002	14,1 ± 0,2
P1901530	190	1,5	30	0,0410 ± 0,0009	0,13 ± 0,01	0,378 ± 0,005	3,66 ± 0,09	0,324 ± 0,0050	0,168 ± 0,002	18,9 ± 0,4

¹ AnGlc, anidroglicose; presente como componente das β-(1→4)-D-glucanas (celulose) e quantificada como glucose em meio aquoso;

² AnXyl, anidroxilose; AnAra: anidroarabinose; presentes como componentes das hemiceluloses e quantificadas como xilose e arabinose em meio aquoso.

³ Soma de todos os carboidratos identificados na fração solúvel aquosa em relação à massa inicial do BC_{LEE}, incluindo o percentual atribuído aos compostos furânicos (HMF e furfural) do meio;

a.l.d., abaixo do limite de detecção

HMF, hidroximetilfurfural

FONTE: A autora (2021).

Na TABELA 29 ainda pode observar que a xilose e arabinose foram recuperadas em alto rendimento na fração hidrossolúvel, enquanto a glucose foi detectada em baixas concentrações, reiterando a capacidade do pré-tratamento proposto em preservar os monossacarídeos no hidrolisado, limitar a produção de compostos inibitórios e garantir a retenção da celulose na fração insolúvel, ao mesmo tempo em que gera altos níveis de deslignificação. Os dados de recuperação mássica de carboidratos na fração hidrossolúvel (TABELA 30) também confirmam essa tendência, a exemplo do que já foi observado e discutido em seções anteriores desse trabalho. Vale ainda ressaltar que pré-tratamentos mais severos apresentaram maiores teores de recuperação mássica de glucose e de xilose na fração hidrossolúvel.

TABELA 30 - RECUPERAÇÃO MÁSSICA DOS CARBOIDRATOS DA FRAÇÃO SOLÚVEL DOS PRÉ-TRATAMENTOS DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR COM 60% (v/v) DE ETANOL EM ÁGUA E ÁCIDO OXÁLICO ASSISTIDO POR CO₂ SUPERCRÍTICO.

T (°C)	Ácido oxálico (%) [m/v]	Tempo (min)	Recuperação mássica da fração líquida (%) ¹			
			AnGlc ²	AnXyl ³	AnAra ³	Grupos acetila ³
150	0,5	0	0,13 ± 0,01	30 ± 1	62 ± 1	18 ± 2
150	0,5	30	0,36 ± 0,04	54 ± 1	96 ± 4	11,3 ± 0,2
150	1,5	0	0,16 ± 0,01	53 ± 2	96 ± 2	12,4 ± 0,4
150	1,5	30	0,36 ± 0,03	33 ± 1	96 ± 2	4,2 ± 0,8
170	1,0	15	1,3 ± 0,1	74 ± 3	101 ± 1	16 ± 1
190	0,5	0	0,37 ± 0,04	56 ± 4	96 ± 2	9,41 ± 0,07
190	0,5	30	2,07 ± 0,07	81 ± 1	105 ± 4	9,0 ± 0,3
190	1,5	0	1,9 ± 0,1	68,8 ± 0,3	104 ± 4	10,77 ± 0,05
190	1,5	30	4,20 ± 0,07	91,0 ± 0,4	105 ± 4	5,2 ± 0,3

¹ AnGlc, anidrogucose; presente como componente das β-(1→4)-D-glucanas (celulose) w quantificada como glucose em meio aquoso;

² AnXyl, anidroxilose; AnAra: anidroarabinose; presentes como componentes das hemiceluloses e quantificadas como xilose, arabinose e ácido acético em meio aquoso; o produto da reação de desidratação de pentoses (furfural) também foi considerado nos cálculos;

³ O produto da reação de desidratação de hexoses (HMF) também foi considerado nos cálculos de AnGlc.

FONTE: A autora (2021).

A TABELA 31 apresenta os resultados de sólidos totais solúveis e insolúveis, lignina recuperada do licor de extração e a somatória dessas frações. O experimento

que apresentou maior resultado de sólidos totais solúveis ($20 \pm 2\%$) foi o realizado com 60% etanol em água, 1,5 % (m/v) de ácido oxálico e 25 g de CO_2 a 190 °C por 30 min de reação, sendo esse o pré-tratamento com maior quantidade de carboidratos presentes na fração líquida. Já o resultado da soma dos sólidos totais solúveis e insolúveis e da lignina total presente na fração insolúvel variou entre 93 a 78%. Como dito anteriormente, perdas físicas podem ter ocorrido durante a quantificação dos sólidos totais solúveis e insolúveis, a exemplo da formação de huminas nos ensaios de pós-hidrólise que precederam a análise cromatográfica. Além disso, o procedimento analítico não permitiu a quantificação de componentes minoritários cuja presença é esperada nesse meio de reação, como fenólicos derivados da lignina, extrativos residuais ainda presentes nas amostras de BC_{LEE} , produtos de degradação e ácidos urônicos presentes em hemiceluloses.

TABELA 31 - SOMA DOS SÓLIDOS TOTAIS SOLÚVEIS E INSOLÚVEIS E DA LIGNINA RECUPERADA DE CADA PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR COM 60% (v/v) DE ETANOL EM ÁGUA E ÁCIDO OXÁLICO ASSISTIDO POR CO_2 SUPERCRÍTICO.

T (°C)	Ácido oxálico (%)	t (min)	Sólidos solúveis (%)	Sólidos insolúveis (%)	Lignina recuperada (%)	Soma
150	0,5	0	$8,5 \pm 0,3$	78,42	5,96	92,88
150	0,5	30	$12,6 \pm 0,3$	65,65	10,62	88,87
150	1,5	0	12 ± 1	66,46	9,12	87,58
150	1,5	30	12 ± 1	56,92	11,55	80,47
170	1,0	15	16 ± 2	54 ± 2	13 ± 3	83 ± 2
190	0,5	0	$13,1 \pm 0,4$	55,36	10,33	78,79
190	0,5	30	17 ± 1	51,55	16,14	84,69
190	1,5	0	$15,8 \pm 0,6$	53,79	14,89	84,48
190	1,5	30	20 ± 1	49,47	16,75	86,22

Com base na experiência do analisador, os erros analíticos foram considerados nos maiores desvios das três repetições independentes observadas da seguinte forma: 3% (Sólidos solúveis), 6% (Sólidos insolúveis), 1% (Lignina recuperada) e 3% (Soma) dos experimentos realizados em simplicatas (sem o desvio padrão na tabela).

FONTE: A autora (2021).

4.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICO SOBRE O MATERIAL TRATADO

A hidrólise enzimática foi realizada com amostras de bagaço moído livre de extraíveis (BC_{LEE}) e de bagaço pré-tratado a 170 °C por 15 min com 60% de etanol

em água, 1% (m/v) de ácido oxálico e 25 g de CO₂. A escolha dessa última condição foi pautada na sua alta recuperação mássica de glucanas (cerca de 89%) e alta taxa de deslignificação (86%). É importante mencionar que outros pré-tratamentos apresentaram maiores valores de recuperação de glucanas, porém, com pouca eficiência de deslignificação, enquanto o pré-tratamento selecionado apresentou bons resultados em ambos. A remoção da lignina é importante, pois ela atua como o principal limitante da hidrólise das glucanas, reduzindo, por exemplo, a acessibilidade de enzimas celulolíticas.

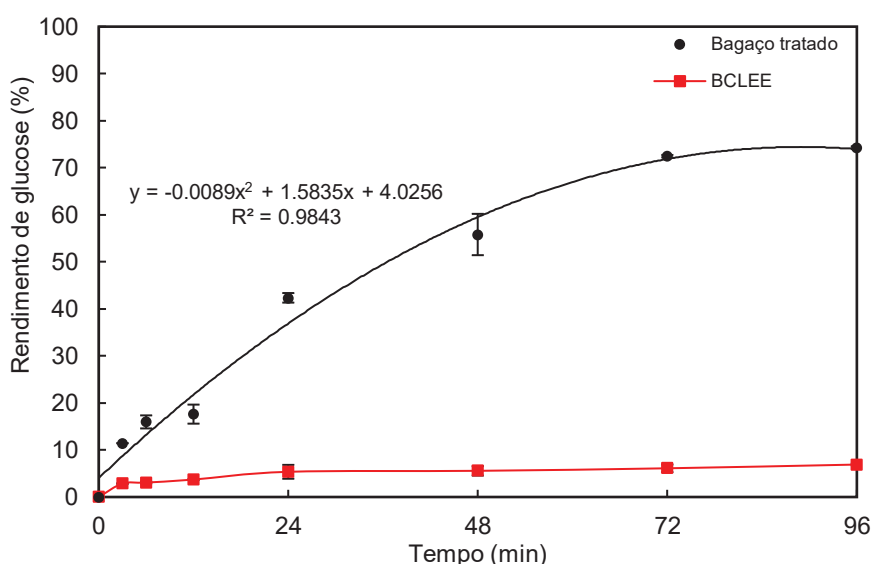
A hidrólise enzimática tanto do bagaço de origem como do bagaço pré-tratado foi realizada em triplicata por 96 h a 150 rpm em uma incubadora de agitação orbital a 50 °C e utilizando 1% de glucanas (base seca). Os hidrolisados foram analisados por cromatografia (HPLC) para quantificação de glucose, já que a celobiose e a xilose, se presentes, se encontravam em concentrações muito baixas. O rendimento de cada substrato hidrolisado foi obtido pela relação entre a quantidade de glucose recuperado na hidrólise e a quantidade inicial de glucanas presente na amostra (FIGURA 26). A atividade celulásica total empregada no ensaio, determinada na enzima Cellic CTec3 de acordo com as metodologias de Ghose (1987) e Schwald *et al.* (1998), foi 9,89 FPU/g de glucanas.

A hidrólise enzimática do BC_{LEE} apresentou um rendimento de glucose de apenas $6,9 \pm 0,2\%$ após 96 h de incubação. Já a conversão de glucanas em glucose para o bagaço de cana pré-tratado pelo processo *organosolv* atingiu o valor de $74,3 \pm 0,2\%$ no mesmo tempo de reação (FIGURA 27). Esse valor é cerca de 11 vezes maior que o rendimento do bagaço de origem, que se mostrou mais recalcitrante à hidrólise enzimática do que o bagaço pré-tratado.

Chotirotsukon *et al.* (2019) obtiveram 78,1% de conversão enzimática das glucanas da palha de cana-de-açúcar pré-tratado com 80% de glicerol em água e 300 mmol/L de ácido oxálico a 170 °C por 40 min de reação, seguido de uma etapa de extração com acetona a 30 °C. Esse processo resultou em um material com 71,7% de retenção de glucanas e uma deslignificação de 83,9% do material de origem. A hidrólise enzimática foi realizada a 5% (m/v) de sólidos totais (base seca) em 50 mmol/L de tampão de acetato de sódio pH 5,5 empregando 5 mg de Cellic CTec2 por grama de substrato na presença de 0,1% (v/v) de azida de sódio. As reações ocorreram em uma incubadora a 50 °C e 220 rpm durante 72 h. Apesar das

condições de hidrólise enzimática terem sido diferentes, a quantidade de enzima utilizada no presente trabalho foi menor (3,53 mg de Cellic CTec3 por grama de substrato), resultando em um rendimento de glucose de $72,5 \pm 0,2\%$ após 72 h de hidrólise. Além disso, o pré-tratamento utilizado por esses autores teve como solvente o glicerol, que é um solvente mais caro e eventualmente problemático quando exposto a temperaturas muito altas devido à formação de acroleína por reações de desidratação.

FIGURA 27 - CINÉTICAS DAS HIDRÓLISES ENZIMÁTICAS DOS BAGAÇOS DE CANA-DE-AÇÚCAR DE ORIGEM E PRÉ-TRATADO COM 60% (v/v) DE ETANOL EM ÁGUA E 1% DE ÁCIDO OXÁLICO ASSISTIDO POR CO₂ SUPERCRÍTICO EM 170 °C E 15 min DE REAÇÃO.



A curva vermelha é uma ligação entre os pontos, enquanto a curva preta representa um ajuste polinomial de segunda ordem.

FONTE: A autora (2021).

Park *et al.* (2018) demonstraram que o pré-tratamento de palha de milho com uma solução contendo 30% etanol e 5% de peróxido de hidrogênio em água, a 150 °C e 60 min de reação removeu 77,7% da lignina presente no material de origem. Então, a palha de milho pré-tratada foi submetida à hidrólise enzimática a 50 °C, 150 rpm e 2,0% de sólidos totais (base seca), empregando tampão citrato 0,1 mol/L (pH 4,8) e 40 FPU/g de Cellic CTec2 em relação ao teor de glucanas do substrato. Os rendimentos de hidrólise obtidos foram de 69,7% após 72 h. Esses autores

utilizaram na hidrólise uma atividade enzimática 4 vezes superior ao utilizado no presente trabalho, e ainda assim a conversão de glucanas em glucose foi inferior.

Kim *et al.* (2018) estudaram o pré-tratamento *organosolv* de três tipos de herbáceas: miscanthus gigante, palha de milho e palha de trigo. Os pré-tratamentos envolveram tratamento em moinho de bolas e seguido de *organosolv* empregando 60% de etanol em água a 170 °C e 120 min de reação, em um reator rotativo pressurizado. Posteriormente, a hidrólise da enzima foi realizada a 50 °C com tampão citrato de sódio 50 mmol/L pH 4,8 e agitação a 150 rpm. A quantidade de enzima empregada no ensaio foi de 30 FPU/g de Cellic CTec2 em relação ao teor de glucanas do substrato. Os experimentos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 250 mL com um total volume de trabalho de 100 mL, e a concentração de glucana foi mantida em 1,0% (m/v). Miscanthus gigante, palha de milho e palha de trigo apresentaram rendimentos de hidrólise de cerca de 50%, 91% e 88%, respectivamente, após 96 h de incubação. Esses resultados indicam que diferentes biomassas apresentam diferentes suscetibilidades ao pré-tratamento, mesmo quando realizado sob as mesmas condições. Esse comportamento está provavelmente relacionado à composição química dos materiais, principalmente em relação ao teor de glucanas disponível para hidrólise enzimática. Vale também ressaltar que Kim *et al.* (2018) empregaram uma atividade enzimática 3 vezes maior do que a usada no presente trabalho.

Kim, T. H. *et al.* (2019) estudaram o fracionamento *organosolv* para a separação dos principais componentes da casca de arroz. O melhor resultado de deslignificação (77,5%) foi atingido a 180 °C com 60% (v/v) de etanol em água e 0,25% (m/v) de ácido sulfúrico. Após pré-tratamento, a hidrólise enzimática foi realizada nas seguintes condições: 50 °C e 150 rpm em tampão de citrato de sódio 0,05 mol/L pH 4,8 contendo 15 FPU/g de Cellic CTec2 em relação ao teor de glucanas do substrato. O rendimento de hidrólise do material pré-tratado foi de 85,2% após 72 h de incubação, que foi superior ao obtido no presente trabalho porque a atividade enzimática empregada nos ensaios foi cerca de 1,5 maior.

5 CONCLUSÃO

O pré-tratamento *organosolv* do bagaço de cana-de-açúcar foi realizado empregando diferentes catalisadores ácidos na ausência e na presença de scCO_2 em diferentes condições de processos, sendo que os parâmetros de decisão para o melhor pré-tratamento foram pautados nas taxas de recuperação mássica de glucanas e de deslignificação do material de origem.

Os pré-tratamentos empregando catalisadores ácidos (ácido acético, ácido cítrico e ácido oxálico), nas condições em 170 °C, 60 min de reação, 60% (v/v) etanol em água, levaram a uma hidrólise mais efetiva das hemiceluloses, em comparação aos tratamentos que ocorreram na ausência desses catalisadores, sendo que os maiores rendimentos de deslignificação ocorreram utilizando etanol e ácido oxálico na ausência e na presença de CO_2 , que removeram 85-86 % da lignina do bagaço de cana. Além disso, todas as amostras apresentam altas taxas de recuperação mássica de glucanas nos bagaços pré-tratados. É importante ressaltar que a quantidade de CO_2 empregada nos pré-tratamentos a 170°C por 60 min não teve efeito significativo sobre a recuperação de glucanas ou sobre a deslignificação do bagaço de cana. A principal vantagem percebida no emprego de scCO_2 foi a produção de materiais mais úmidos e de maior homogeneidade, provavelmente por aumentar a porosidade das fibras e aumentar a difusividade dos reagentes. Esse efeito foi ainda mais pronunciado para os experimentos realizados por 15 min de reação, demonstrando que o uso do cossolvente aumenta a eficiência do pré-tratamento *organosolv* investigado neste estudo.

A presença de água no meio reacional promoveu a hidrólise das hemiceluloses, aumentando a recuperação de seus componentes na fração líquida do pré-tratamento, enquanto a presença de etanol favoreceu a solubilização da lignina. Contudo, altas concentrações de etanol dificultaram a hidrólise das hemiceluloses e, com isso, fragmentos de lignina fortemente associados a esses carboidratos não puderam ser removidos. Portanto, o emprego de 60% de etanol em água gerou o melhor resultado de deslignificação, principalmente em pré-tratamentos realizados na presença de CO_2 . Por outro lado, a diminuição da presença de água no meio favoreceu a ocorrência de reações de esterificação, levando à formação de oxalato de etila. Por exemplo, experimentos com 80% de

etanol e 1% (m/v) ácido oxálico e na ausência e na presença de CO₂ levaram à conversão de $75,6 \pm 0,8\%$ e $80,17 \pm 0,04\%$ do ácido oxálico em oxalato de etila, comprometendo a eficiência do processo.

Por fim, foi realizado um planejamento fatorial com três variáveis em dois níveis (2³) e triplicata no ponto central para estudar o efeito da temperatura (150 a 190 °C), do tempo de reação (0 a 30 min) e da concentração do ácido oxálico (0,5 a 1,5 [m/v]) sobre o processo *organosolv*. As melhores condições foram de 170 °C por 15 min empregando 1% (m/v) de ácido oxálico, que apresentou alta recuperação mássica de glucanas (89%), bons níveis de deslignificação (86%) e recuperação de boa parte da lignina (56%) por precipitação com água. O bagaço de cana pré-tratado nessas condições foi então submetido à hidrólise enzimática para avaliar a acessibilidade das glucanas. O substrato pré-tratado apresentou um rendimento de conversão de glucose cerca de 11 vezes maior do que o observado para o material de origem. Deste modo, o pré-tratamento foi fundamental para alterar a estrutura do bagaço e tornar as glucanas mais disponíveis à conversão pelo processo de hidrólise enzimática. Além do mais, os licores concentrados oriundos do pré-tratamento permitiram a recuperação da lignina por precipitação com água e os extratos aquosos derivados desse processo apresentaram baixos teores de compostos inibitórios a processos fermentativos voltados à produção de ácidos orgânicos e etanol celulósico.

6 PERSPECTIVAS

Este trabalho ilustrou a viabilidade técnica de uma estratégia de fracionamento *organosolv* assistido por dióxido de carbono supercrítico. No entanto, para compreender as possibilidades reais de aplicação de tal processo, uma avaliação econômica deve ser realizada, ponderando diferentes combinações de matriz, variáveis de processo e diferentes produtos que poderiam ser obtidos através das correntes intermediárias de celulose, hemiceluloses e lignina.

Compostos derivados de materiais lignocelulósicos também podem ser formados durante o pré-tratamento, como os aldeídos furânicos (furfural e 5-hidroximetilfurfural), ácidos orgânicos (ácido fórmico e ácido levulínico) e compostos fenólicos. A seletividade do processo para a obtenção desses coprodutos poderá ser mais bem explorada no futuro. Exemplo disto é o furfural, que é considerado um produto químico de plataforma, de alto valor de mercado, passível de ser transformado em biocombustíveis, fármacos, agroquímicos e polímeros. Portanto, é importante que estudos futuros invistam na recuperação desse coproduto, e assim, aplicar o conceito de biorrefinaria, o que impactaria positivamente na economia do processo. Outra sugestão para estudos futuros seria a de avaliar o uso da lignina, obtida do licor de extração concentrado após o pré-tratamento, para aplicações práticas como na produção de compósitos, aditivos para concreto, resinas, fenóis, biocombustíveis, bio-óleo e gás de síntese, dentre outros produtos.

Estudos de hidrólise enzimática dos materiais pré-tratados ainda seriam necessários para dimensionar o potencial dessa tecnologia no uso em bioprocessos. Valeria a pena usar dados de hidrólise enzimática como função resposta em estudos de pré-otimização, investigando o efeito de variáveis de processo como a carga de sólidos totais e a concentração de enzimas. E ainda, nessa mesma esteira, investigar a fermentabilidade dos hidrolisados oriundos tanto do pré-tratamento quanto da hidrólise enzimática.

REFERÊNCIAS

- ACHARYA, S.; CHAUDHARY, A. Bioprospecting thermophiles for cellulase production: a review. **Brazilian Journal of Microbiology**. ISSN 1517-8382, p. 844-856, 2012.
- AGARWAL, U. P. Raman imaging to investigate ultrastructure and composition of plant cell walls: distribution of lignin and cellulose in black spruce wood (*Picea mariana*). **Planta**, 224(5), 1141, 2006.
- AGBOR, V.B.; CICEK, N.; SPARLING, R.; BERLIN, A.; LEVIN, D. B. (2011) Biomass pretreatment: fundamentals toward application. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 675–685, 2011.
- AGHBASHLO, M.; MANDEGARI, M.; TABATABAEI, M.; FARZAD, S.; SOUFIYAN, M. M.; GÖRGENS, J. F. Energy analysis of a lignocellulosic-based biorefinery annexed to a sugarcane mill for simultaneous lactic acid and electricity production. **Energy**, v. 149, p. 623-638, 2018.
- AJAO, O.; MARINOVA, M.; SAVADOGO, O.; PARIS, J. Hemicellulose based integrated forest biorefineries: implementation strategies. **Industrial Crops & Products**. v. 126, p. 250–260, 2018.
- ALONSO, E. The role of supercritical fluids in the fractionation pretreatments of a wheat bran-based biorefinery. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 133, part 2, p. 603-614, 2018.
- ALVIRA, P.; TOMAS-PEJO, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**. v. 101, p. 4851-4861, 2010.
- AMERAM, N.; MUHAMMAD, S.; YUSOF, N. A. A. N.; ISHAK, S.; ALI, A.; SHOPARWE, N. F.; TER, T. P. Chemical composition in sugarcane bagasse: Delignification with sodium hydroxide. **Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences**. v. 15, no. 2, p. 232-236, 2019.
- ARNI, S. A. Extraction and Isolation methods for lignin separation from sugarcane bagasse: A review. **Industrial Crops and Products**, v. 115, p. 330-339, 2018.
- ASOMANING, J.; HAUPT, S.; CHAE, M.; BRESSLER, D. C. Recent developments in microwave-assisted thermal conversion of biomass for fuels and chemicals, **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 92 642–657, 2018.
- BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**, v. 52, p. 858-875, 2011.
- BARUAH, J.; NATH, B. K.; SHARMA, R.; KUMAR, S.; DEKA, R. C. BARUAH, D. C.; KALITA, E. Recent Trends in the Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Value-Added Products. **Frontier Energy Research**, v. 6, no. 141, p. 1-19, 2018.

BECKER, J.; WITTMANN, C. A field of dreams: Lignin valorization into chemicals, materials, fuels, and health-care products. **Biotechnology Advances**, v. 37, 107360, 2019.

BENJAMIN, Y. H.; CHENG, H.; GÖRGENS, J. F. Optimization of dilute sulfuric acid pretreatment to maximize combined sugar yield from sugarcane bagasse for ethanol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v.172, p. 610-630, 2014.

BHAT, A. H.; KHAN, I.; USMANI, M. A.; UMAPATHI, R.; AL-KINDY, S.M.Z. Cellulose an ageless renewable green nanomaterial for medical applications: An overview of ionic liquids in extraction, separation and dissolution of cellulose. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.129, p. 750-777, 2019.

BHOWMICK, G.; SARMAH, A. K.; SEM, R. Lignocellulosic biorefinery as a model for sustainable development of biofuels and value added products. *Bioresource Technology*. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 1144-1154, 2018.

BRIENZO, M.; FIKIZOLO, S.; BENJAMIN, Y.; TYHODA, L.; GÖRGENS, J. Influence of pretreatment severity on structural changes, lignin content and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse samples. **Renewable Energy**. v. 104, p. 271-280, 2017.

BURUIANA, C. T.; VIZIREANU, C.; GARROTE, G.; PARAJO, J. C; Optimization of corn stover biorefinery for coproduction of oligomers and second generation bioethanol using non-isothermal autohydrolysis. **Industrial Crops and Products**, v. 54, p. 32–39, 2014.

BUSSEMAKER, M. J.; XU, F.; ZHANG, D. Manipulation of ultrasonic effects on lignocellulose by varying the frequency, particle size, loading and stirring. **Bioresource Technology**, v. 148, p. 15-23, 2013.

CARATELLI, C.; HAJEK, J.; CIRUJANO, F. G.; WAROQUIER, M.; XAMENA, F. X. L.; VAN SPEYBROECK, V. Nature of active sites on UiO-66 and beneficial influence of water in the catalysis of Fischer esterification. **Journal of Catalysis**. v. 352, p. 401-414, 2017.

CARPIO, L.G. T.; SOUZA, F. S. Optimal allocation of sugarcane bagasse for producing bioelectricity and second generation ethanol in Brazil: Scenarios of cost reductions. **Renewable Energy**. v.111, p. 771-780, 2017.

CARPITA, N. C.; GIBEAUT, D. M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: Consistency of molecular structure with the physical properties of walls during growth. **The Plant Journal**. v.3, p. 1-30, 1993.

CGEE, Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. **Bioetanol combustível: uma oportunidade para o Brasil**. Brasília, 2009.

CHANDEL, A. K.; ANTUNES, F. A.; de ARRUDA, P. V.; MILESSI, T. S.; da SILVA, S. S.; de ALMEIDA FELIPE, Md. G. **Dilute Acid Hydrolysis of Agro-Residues for the Depolymerization of Hemicellulose: State-of-the-Art, D-Xylitol**. Springer, p. 39–61, 2012.

CHANDEL, A. K.; GARLAPATLI, V. K.; SINGH, A. K.; ANTUNES, F.A.F.; da SILVA, S. S. The path forward for lignocellulose biorefineries: Bottlenecks, Solutions, and perspective on commercialization. **Bioresource Technology**, v. 264, p. 370-381, 2018.

CHATURVEDI, 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, p. 415-431, 2013.

CHERUBINI, F. The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. **Energy Conversion and Management**, v. 51, p. 1412-1421, 2010.

CHIARELLO, L. M. Otimização da explosão a vapor de *Eucalyptus urograndis* para produção de etanol celulósico. Tese de doutorado em Química, Universidade Federal do Paraná, Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exata, 2017.

CHIN, D.W.K.; LIM, S.; PANG, Y.L.; LIM, C.H.; SHUIT, S.H.; LEE, K.M.; CHONG, C.T. Effects of Organic Solvents on the *Organosolv* Pretreatment of Degraded Empty Fruit Bunch for Fractionation and Lignin Removal. **Sustainability**. v. 13, n0. 6757, 2021.

CHOTIROTSUKON, C.; RAITA, M.; CHAMPREDA, V.; LAOSIRIPOJANA, N. Fractionation of sugarcane trash by oxalic-acid catalyzed glycerol-based *organosolv* followed by mild solvent delignification. **Industrial Crops and Products**. v. 141, n0. 111753, p. 1-9, 2019.

CLARKE, C. J.; TU, W.-C.; LEVERS, O.; BRÖHL, A.; HALLETT, J. P. Green and sustainable solvents in chemical processes. **Chemical Reviews**, v. 118, p. 747–800, 2018.

COLLARD, F. X.; BLIN, J. A review on pyrolysis of biomass constituents: Mechanisms and composition of the products obtained from the conversion of cellulose, hemicelluloses and lignin. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 38, p. 594–608, 2014.

CREMASCO, M. A. **Operações Unitárias em Sistemas Particulados e Fluidodinâmicos**. Ed. Blucher, São Paulo, 423 f, 2012.

CRUZ, N. C.; SILVA, F. C.; TARELHO, L. A. C.; RODRIGUES, S. M. Critical review of key variables affecting potential recycling applications of ash produced at large-scale biomass combustion plants. **Resources, Conservation and Recycling**. v.150, art. no. 104427, 2019.

DEMIRBAS, A. Products from Lignocellulosic Materials via Degradation Processes, **Energy Sources**, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects, v. 30:1, p. 27-37, 2008.

DIMOS, K.; PASCHOS, T.; LOULOUDI, A.; KALOGIANNIS, K. G.; LAPPAS, A. A.; PAPAYANNAKOS, N.; KEKOS, D.; MAMMA, D. Effect of Various Pretreatment Methods on Bioethanol Production from Cotton Stalks. **Fermentation**, v.5, p- 1-2, 2019.

DOANE-WEIDEMAN, T.; LIESCHESKI, P. B. Analytical Supercritical Fluid Extraction for Food Applications (Chapter 5). In: LUTHRIA, D. L. **Oil extraction and analysis: critical issues and comparative studies**. Champaign: AOCS Publishing, p. 69-99, 2004.

DONG, C.; WANG, Y.; WANG, H.; LIN, C. S. K.; HSU, H.; LEU, S-Y. New Generation Urban Biorefinery toward Complete Utilization of Waste Derived Lignocellulosic Biomass for Biofuels and Value-Added Products. **Energy Procedia**, v. 158, p. 918-925, 2019.

DUFF, S. J. B.; MURRAY, M. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. **Bioresource Technology**, v. 55, p. 1-33, 1996.

DURDEVIC, S.; MILOVANOVIC, S.; SAVIKIM, K.; RISTIC, M.; MENKOVIC, N.; PLJEVLJAKUSIC, D.; PETROVIC, S.; BOGDANOVIC, A. Improvement of supercritical CO₂ and n-hexane extraction of wild growing pomegranate seed oil by microwave pretreatment. **Industrial Crops & Products**, v. 104, p. 21-27, 2017.

EOM, I.; OH, Y.; PARK, S. J.; LEE, S.; YU, J. Fermentative L-lactic acid production from pretreated whole slurry of oil palm trunk treated by hydrothermolysis and subsequent enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 185, p. 143-149, 2015.

ESCOBAR, E.L.N. Combination of green solvents for efficient biomass fractionation. Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Paraná. Curitiba/ PR. 127 f, 2021.

ESCOBAR, E. L. N.; da SILVA, T. A.; PIRICH, C. L.; CORAZZA, M. L.; PEREIRA, L. R. Supercritical Fluids: A Promising Technique for Biomass Pretreatment and Fractionation. **Frontier Bioengineering Biotechnology**, v. 8:252, p. 1-18, 2020.

ESPINOZA-ACOSTA, J. L.; TORRES-CHÁVEZ, P. I.; OLMEDO-MARTÍNEZ, J. L.; VEGA-RIOS, A.; FLORES-GALLARDO, S.; ZARAGOZA-CONTRERAS, E. A. Lignin in storage and renewable energy applications: A review. **Journal of Energy Chemistry**, v. 27, p. 1422-1438, 2018.

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

FERNANDO, S.; ADHIKARI, S.; CHANDRAPAL, C.; MURALI, N. Biorefineries: Current Status, Challenges and a Future Direction. **Energy & Fuels**, v. 20, p. 1727-1737, 2006.

FIGUEIREDO, P.; LINTINEN, K.; HIRVONEN, J. T.; KOSTIAINEN, M. A.; SANTOS, H. A. Properties and chemical modifications of lignin: Towards lignin-based nanomaterials for biomedical applications. **Progress in Materials Science**, v.93, p. 233-269, 2018.

FOCKINK, D. H.; SÁNCHEZ, J. H.; RAMOS, L. R. Comprehensive analysis of sugarcane bagasse steam explosion using autocatalysis and dilute acid hydrolysis (H₃PO₄ and H₂SO₄) at equivalent combined severity factors. **Industrial Crops & Products**, v.123, p. 563–572, 2018.

FRENCH, A. D. Cellulose. In: Roberts G., Watts A. European Biophysical Societies (eds) **Encyclopedia of Biophysics**. Springer, Berlin, Heidelberg. 2018.

GALIWANGO, E.; RAHMAN, N. S. A.; AL-MARZOUQI, A. H.; ABU-OMAR, M. M. Isolation and characterization of cellulose waste. **Heliyon**. v.5, p. 1-8 (e02937), 2019.

GAO, M.; XU, F.; LI, S.; JI, X.; CHEN, S.; ZHANG, D. Effect of SC-CO₂ pretreatment in increasing rice straw biomass conversion. **Biosystems Engineering**, v. 106, p. 470-475, 2010.

GASSON, J. R., FORCHEIM, D., SUTTER, T., HORNING, U., KRUSE, A. & BARTH, T. Modeling the Lignin Degradation Kinetics in an Ethanol/Formic Acid Solvolysis Approach. Part 1. Kinetic Model Development. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 51, p. 10595–10606, 2012.

GHAFFAR, S. H.; FAN, M. Structural analysis for lignin characteristics in biomass straw. **Biomass and Bioenergy**. v. 57, p. 264-279, 2013.

GHOSE, T.K.; Measurement of Cellulase Activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, p. 257-268, 1987.

GÍRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MARQUES, S.; BOGEL-LUKASIK, B. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4775-4800, 2010.

GOMIDE, J. L.; DEMUNER, B. J. Determinação do teor de lignina em material lenhoso: método Klason modificado. **O Papel**, v. 47, 1986.

GOMIDE, R. Operações com sistemas sólidos granulares. **Operações unitárias**, v. 1, 292 f., 1983.

HALLAC, B. B., SANNIGRAHI, P.; PU, Y.; RAY, M.; MURPHY, R. J., RAGAUSKAS, A. J. Effect of ethanol *organosolv* pretreatment on enzymatic hydrolysis of *Buddleja davidii* stem biomass. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 49, p. 1467–1472, 2010.

HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, A.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. Preparation of samples for compositional analysis - Technical Report: NREL/TP-510-42620. **National Renewable Energy Laboratory**, 2008.

HERRERO, M.; MENDIOLA, J. A.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2495-2511, 2010.

HERRERO, M.; MENDIOLA, J. A.; IBÁÑEZ, E.; TURNER, C.; WANG, J. Gas expanded liquids and switchable solvents. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 5, p. 24–30, 2017.

HOFSETZ, K.; SILVA, M. A. Brazilian sugarcane bagasse: Energy and non-energy consumption. **Biomass and Bioenergy**. v. 46, p. 564-573, 2012.

HUISHENG, L.; MIAOMIAO, R.; MINHUA, Z.; YING, C. Pretreatment of Corn Stover Using Supercritical CO₂ with Water-Ethanol as Co-solvent. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 21, p. 551—557, 2013.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). **A geografia da cana-de-açúcar**. Dinâmica Territorial da Produção Agropecuária. IBGE, Coordenação de Geografia. Rio de Janeiro. 172 p., 2017.

IEA Bioenergy, **Biorefineries: adding value to the sustainable utilization of biomass**. 2009.

International Energy Outlook 2016 (With Projections to 2040). Report Number: DOE/EIA-0484. U.S. Energy Information Administration. U.S. Department of Energy. 2016. Disponível em: <[https://www.eia.gov/outlooks/ieo/pdf/0484\(2016\).pdf](https://www.eia.gov/outlooks/ieo/pdf/0484(2016).pdf)>. Acessado em 26 de março de 2020.

ISLAM, K.; WANG, H.; REHMAN, S.; DONG, C.; HSU, H-Y., LIN, C. L. K.; YUAN, C. L.; LEU, S-Y. Sustainability metrics of pretreatment processes in a waste derived lignocellulosic biomass biorefinery. **Bioresource Technology**, v. 298, no. 122558, 2020.

JESSOP, P. G.; SUBRAMANIAM, B. Gas-Expanded Liquids. **Chemical review**, v. 107, p. 2666–2694, 2007.

JIANG, L.; FANG, Z.; LI, X.; LUO, J.; FAN, S. Combination of dilute acid and ionic liquid pretreatments of sugarcane bagasse for glucose by enzymatic hydrolysis. **Process Biochemistry**. v. 48, p. 1942-1946, 2013.

JIAO, G.; POUR, A. K. Extraction of anthocyanins from haskap berry pulp using supercritical carbon dioxide: Influence of co-solvent composition and pretreatment. **LWT**, v. 98, p. 237-244, 2018.

JORDAN, R. A.; BALDASSIN JUNIOR, R.; CORTEZ, L. A. B.; MOTOMIYA, A. V. A. Caracterização granulométrica de biomassa polidispersa pelo método de peneiramento mecânico. **Engenharia Agrícola**, v.36, n.1, p.102-113, 2016.

JOFFRES, B.; LAURENTI, D.; CHARON, N.; DAUDIN, A.; QUIGNARD, A.; GEANTER, C. Thermochemical Conversion of Lignin for Fuels and Chemicals: A Review. **Oil & Gas Science and Technology – Rev. IFP Energies nouvelles**, v. 68, no. 4, pp. 753-763, 2013.

KALOGIANNIS, K. G.; MATSAKAS, L.; LAPPAS, A. A.; ROVA, U.; CHRISTAKOPOULOS, P. Acid assisted *organosolv* delignification of beechwood and pulp conversion towards high concentrated cellulosic ethanol via high gravity enzymatic hydrolysis and fermentation. **Molecules**, v. 23, n. 7, p. 1–18, 2018.

KALOGIANNIS, K. G.; MATSAKAS, L.; LAPPAS, A. A.; ROVA, U.; CHRISTAKOPOULOS, P. Aromatics from beech wood *organosolv* lignin through thermal and catalytic pyrolysis. **Energies**, v. 12 (9), p. 1-11, 2019.

KAMM, B.; GRUBER, P. R.; KAMM, M. **Biorefineries – Industrial Processes and Products**. Vol. 1 .Wiley-VCH, 497 p., 2006.

KIM, D. Physico-Chemical Conversion of Lignocellulose: Inhibitor Effects and Detoxification Strategies. **Molecules**, v. 23, n. 2, p. 309-309, 2018.

KIM, H. K.; HONG, J. Supercritical CO₂ pretreatment of lignocelluloses enhances enzymatic cellulose hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 139-144, 2001.

KIM, J. Y.; LEE, H. W.; LEE, S. M.; JAE, J. J.; PARK, Y. K. Overview of the recent advances in lignocellulose liquefaction for producing biofuels, bio-based materials and chemicals. **Bioresource Technology**, v. 279, p. 373–384, 2019.

KIM, S. J.; UM, B. H.; IM, D. J.; LEE, J. H.; OH, K. K. Combined Ball Milling and Ethanol *Organosolv* Pretreatment to Improve the Enzymatic Digestibility of Three Types of Herbaceous Biomass. **Energies**, v.11, n0. 2457, p. 1-10, 2018.

KIM, T. H.; RYU, H. J.; OH, K. K. Improvement of *organosolv* fractionation performance for rice husk through a low acid-catalyzation. **Energies**, v. 12, p. 1-11, 2019.

KUBO, J. H.; KADLA, J. F. Hydrogen bonding in lignin: a Fourier transform infrared model compound study. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 2815-2821, 2005.

KUCHARSKA, K.; RYBARCZYK, P.; HOLOWACZ, I.; LUKAJTIS, R.; GLINKA, M.; KAMINSKI, M. Pretreatment of Lignocellulosic Materials as Substrates for Fermentation Processes. **Molecules**, v. 23, no. 2937, p. 1-32, 2018.

KUHAD, R. C.; GUPTA, R. KHASA, Y.; SINGH, A.; ZHANG, Y. H. P. Bioethanol production from pentose sugars: Current status and future prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.15, p. 4950–4962, 2011.

KUMAR, B.; BHARDWAJ, N.; AGRAWAL, K.; CHATURVEDI, V.; VERMA, P. Current perspective on pretreatment technologies using lignocellulosic biomass: An emerging biorefinery concept. **Fuel Processing Technology**, v. 199, no. 106244, p. 1-24, 2020.

KUMAR, P.; BARRETT, D. M.; DELWICHE, M. J.; STROEVE, P. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 48, n. 8, p. 3713-3729, 2009.

LI, L.; KIRAN, E. Interaction of supercritical fluids with lignocellulosic materials. **Industrials and Engineering Chemistry Research**, v. 27, p. 1301-1312, 1988.

LIU, C. G.; XIAO, Y., XIA. X.X.; ZHAO, X. Q.; PENG, L.; SRINOPHAKUN, P.; BAI, F. W. Cellulosic ethanol production: progress, challenges and strategies for solutions. **Biotechnol Advances**, v.37 (3), pp. 491-504, 2019.

LUO, Y.; LI, Z.; LI, X.; LIU, X.; FAN, J.; CLARK, J. H.; HU, C. The production of furfural directly from hemicellulose in lignocellulosic biomass: A review. **Catalysis Today**, v. 3019, p. 14-24, 2019.

LV, H.; YAN, L.; ZHANG, M.; GENG, Z.; REN, M.; SUN, Y. Influence of corn stover with ethanol-water as co-solvent on lignin degradation. **Chemical Engineering and Technology**, v. 36, n. 11, p. 1899-1906, 2013.

MCMILLAN, J. D. (1994) Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: Himmel, M. E.; Baker, J. O.; Overend, R. P. (Eds), **Enzymatic conversion of biomass for fuels production**. American Chemical Society, Washington, DC, p. 292-324. 1994.

MERCURE, J-F.; POLLITT, H.; VIÑUALES, J. E.; EDWARDS, N. R.; HOLDEN, P. B.; CHEWPREECHA, U.; SALAS, P.; SOGNAES, I.; LAM, A.; KNOBLOCH, F. Macroeconomic impact of stranded fossil fuel assets. **Nature Climate Change**, v. 8, p. 588–593, 2018.

MESA, L.; ALBERNAS, Y.; MORALES, M.; CORSANO, G.; GONZÁLEZ, E. Chapter 11 - Integration of *Organosolv* Process for Biomass Pretreatment in a Biorefinery. **Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery**, p. 229-254, 2016.

MOHAN, S. V.; MODESTRA, J. A.; AMULYA, K.; BUTTI, S. K.; VELVIZHI, G. A circular bioeconomy with biobased products from CO₂ sequestration. **Trends Biotechnol**, v. 34, p. 506–519, 2016.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPFLE, M., LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 673-686, 2005.

NARAYANASWAMY, N.; FAIK, A.; GOETZ, D. J., GU, T. Supercritical carbon dioxide pretreatment of corn stover and switchgrass for lignocellulosic ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 6995-7000, 2011.

NEVES, P. V.; PITARELO, A. P.; RAMOS, L. P. Production of cellulosic ethanol from sugarcane bagasse by steam explosion: Effect of extractives content, acid catalysis and different fermentation technologies. **Bioresource Technology**, v. 208, p.184-194, 2016.

NOTENBOOM, V.; BORASTON, A. B.; CHIU, P.; FREELOVE, A. C. J.; KILBURN, D. G.; ROSE, D. R. Recognition of cello-oligosaccharides by a family 17 carbohydrate-binding module: An X-ray crystallographic, thermodynamic and mutagenic study. **Journal of Molecular Biology**, v. 314, n. 4, p. 797-780, 2001.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. *Química Nova*, v. 33, no. 7, p.1549-1558, 2010.

OLIVA, J. M.; SÁEZ, F., BALLESTEROS, I.; GONZÁLEZ, A.; NEGRO, M. J.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, M. Effect of lignocellulosic degradation compounds from steam explosion pretreatment on ethanol fermentation by thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.105, p.141-154, 2003.

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

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

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: Sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 69-80, 2000.

PARK, Y. C.; KIM, J. S.; KIM, T. H. Pretreatment of corn stover using *organosolv* with hydrogen peroxide for effective enzymatic saccharification. **Energies**, v. 11, p. 1-5, 2018.

PASQUINI, D.; PIMENTA, M. T. B.; FERREIRA, L. H.; CURVELO, A. A. S. Extraction of lignin from sugar cane bagasse and *Pinus taeda* wood chips using ethanol-water mixtures and carbon dioxide at high pressures. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 36, p. 31-39, 2005a.

PASQUINI, D.; PIMENTA, M. T. B.; FERREIRA, L. H.; CURVELO, A. A. S. Sugar cane bagasse pulping using supercritical CO₂ associated with co-solvent 1-butanol/water. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 34, p. 125-131, 2005b.

PEITAK, A.; KORTE, S.; TAN, E.; DOWNARD, A.; SATAIGNER, M. P. Atomic force microscopy characterization of the surface wettability of natural fibres. **Applied Surface Science**, v. 253, p. 3627-3635, 2007.

PENG, B.; YAO, Z.; WANG, X.; CROMBEEN, M.; SWEENEY, D. G.; TAM, K. C. Cellulose-based materials in wastewater treatment of petroleum industry. **Green Energy & Environment**, v. 5, p. 37-49, 2020.

PENG, F.; PENG, P.; XU, F.; SUN, R. C. Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 4, p. 879-903, 2012.

PERAL, C. Chapter 5 - Biomass Pretreatment Strategies (Technologies, Environmental Performance, Economic Considerations, Industrial Implementation), Editor(s): Palmiro Poltronieri, Oscar Fernando D'Urso. **Biotransformation of Agricultural Waste and By-Products**, Elsevier, p.125-160, 2016.

PIRICH, C. L.; PICHETH, G. F.; FONTES, A. M.; DELGADO-AGUILAR, M.; RAMOS, L. P. Disruptive enzyme-based strategies to isolate nanocelluloses: a review. **Cellulose**, v. 27, p. 5457-5475, 2020.

PONNUSAMY, V. K.; NGUYEN, D. D.; DHARMARAJA, J.; SHOBANA, S.; BANU, J. R.; SARATALE, R. G.; CHANG, S. W.; KUMAR, G. A review on lignin structure, pretreatments, fermentation reactions and biorefinary potential. **Bioresource Technology**, v. 271, p. 462-472, 2019.

PROCÓPIO, S. O.; SILVA, A. A.; FERREIRA, E. A.; SILVA, A. F.; GALON, L. Chapter 7 - Weed Management. **Sugarcane: Agricultural Production, Bioenergy and Ethanol**, p. 133-159, 2015.

PULIGUNDLA, P.; OH, S-E.; MOK, C. Microwave-assisted pretreatment technologies for the conversion of lignocellulosic biomass to sugars and ethanol: A review. **Carbon Letters**. v.17, p. 1-10, 2016.

QIAO, H.; CUI, J.; OUJANG, S.; SHI, J.; OUJANG, J. Comparison of Dilute Organic Acid Pretreatment and a Comprehensive Exploration of Citric Acid Pretreatment on Corn Cob. **Journal of Renewable Materials**, v. 7, no. 11, p. 1197–1207, 2019.

QIN, L.; LIU, Z.H.; LI, B. Z.; DALE, B.E.; YUAN, Y. J. Mass balance and transformation of corn stover by pretreatment with different dilute organic acids. **Bioresource Technology**, v. 112, p. 319-326, 2012.

QIU, Z.; AITA, G. M.; WALKER, M. S. Effect of ionic liquid pretreatment on the chemical composition, structure and enzymatic hydrolysis of energy cane bagasse. **Bioresource Technology**. v.117, p. 251-256, p. 2012.

RALPH, J.; LAPIERRE, C.; BOERJAN, W. Lignin structure and its engineering. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 56, p. 240-249, 2019.

RAMOS, L. P.; SILVA, L.; BALLEM, A. C.; PITARELO, A. P.; CHIARELLO, L. M.; SILVEIRA M. H. L. Enzymatic hydrolysis of steam-exploded sugarcane bagasse using high total solids and low enzyme loadings. **Bioresource Technology**, v. 175, p. 195-202, 2015.

RAMOS, L. P.; SUOTA, M. J.; PAVANELI, G.; CORAZZA, M. L. The role of biomass pretreatment for sustainable biorefineries. **Bulgarian Chemical Communications**, v. 51, p. 62-68, 2019.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in the pretreatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, v. 26, p. 863-871, 2003.

RASMUSSEN, H., SOREMSSEN, H. R., MEYER, A. S. Formation of degradation compounds from lignocellulosic biomass in the biorefinery: Sugar reaction mechanisms. **Carbohydrate Research**, v. 385, p. 45-57, 2014.

RAUD, M.; KIKAS, T.; SIPPULA, O.; SHURPALI, N. Potentials and challenges in lignocellulosic biofuel production technology. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 111, p. 44-56, 2019.

REE, R.; V. ANNEVELINK, B. **Status Report Biorefinery 2007**. Agrotechnology and Food Sciences Group. 2007.

RESCH, M. G.; BAKER, J. O.; DECKER, S. R. Low Solids Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass - Laboratory Analytical Procedure (LAP). Technical Report: NREL/TP-5100-6335. **National Renewable Energy Laboratory**, 2015.

ROMANÍ, A., LARRAMENDI, A.; YANEZ, R.; CANCELA, A.; SANCHEZ, A.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Valorization of *Eucalyptus nitens* bark by *organosolv* pretreatment for the production of advanced biofuels. **Industrial Crops and Products**, v. 132, p. 327-335, 2019.

RUIZ, H. A.; RODRÍGUEZ-JASSO, R. M.; FERNANDES, B. D.; FERNANDES, B. D.; VICENTE, A. A.; TEXEIRA, J. A. Hydrothermal processing, as an alternative for upgrading agriculture residues and marine biomass according to the biorefinery concept: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 21, p.35-51, 2013.

RUIZ, K. C.; BALLINAS-CASARRUBIAS, L.; RODRÍGUEZ, E. S. M.; de Gyves, J.; ROBLES-VENZOR, J. C.; GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, G. Cellulose recovery from *Quercus sp.* sawdust using ethanosolv pretreatment. **Biomass Bioenergy**, v. 111, p. 114–124, 2018.

SAHA, S.; SHARMA, A.; PURKAYASTHA, S.; PANDEY, K.; DHINGRA, S. Bio-plastics and biofuel: Is it the way in future development for end users? **Plastics to Energy: Fuel, Chemicals, and Sustainability Implications**, p. 365-376, 2019.

SARKANEN, K.V. "Acid-Catalized Delignification of Lignocellulosics in Organic Solvents, Progress in **Biomass Conversion**, v. 2, p. 127-144, 1980.

SCHREMS, M; LIEBNER, F.; BETZ, M.; ZEILINGER, M.; BOHMDORFER, S.; ROSENAU, T.; POTTHAST, A. Understanding the impact of supercritical carbon dioxide on the delignification mechanism during *organosolv* pulping: A model compound study. **Journal of Wood Chemistry and Technology**, v. 32, p. 225–237, 2012.

SCHWALD, W.; CHAN, M.; BREUIL, C.; SADDLER, J. N. Comparison of HPLC and colorimetric methods for measuring cellulolytic activity. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 28, p. 398-403, 1998.

SERNA, L. V. D.; ALZATE, C. E. O.; ALZATE, C. A. C. Supercritical fluids as a green technology for the pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 113-120, 2016.

SERRANO-RUIZ, J. C. **New microbial technologies for advanced biofuels: toward more sustainable production methods**. Part II: pretreatments. New Jersey: Apple Academic Press, p. 150, 2015.

SILVA, R.; HARAGUCHI, S. K.; MUNIZ, E.C.; RUBIRA, A. F. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Química Nova**, v. 32, no.3, p. 661-671, 2009.

SILVEIRA, M. H. L.; CHANDEL, A. K.; VANELLI, B. A.; SACILOTTO, K. S.; CARDOSO, E. B. Production of hemicellulosic sugars from sugarcane bagasse via steam explosion employing industrially feasible conditions: Pilot scale study. **Bioresource Technology Reports**. v.3, p. 138-146, 2018.

SILVEIRA, M. H. L.; MORAIS, A. R. C.; DA COSTA, A. M. L.; OLEKSZYSZEN, D. N.; BOGEL-LUKASIK, R.; ANDREAUS, J.; RAMOS, L. P. Current pretreatment technologies for the development of cellulosic ethanol & biorefineries. **ChemSusChem**. v. 8, p.3366-3390, 2015a.

SILVEIRA, M. H. L. Pré-tratamento de bagaço de cana com CO₂ supercrítico na presença de etanol e líquido iônico: Pré-otimização das variáveis do processo e avaliação da acessibilidade dos substratos produzidos. Tese de doutorado em Química, Universidade Federal do Paraná, Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exata. Curitiba/ PR, 131 f, 2014.

SILVEIRA, M. H. L.; VANELLI, B. A.; CORAZZA, M. L.; RAMOS, L. P. Supercritical carbon dioxide combined with 1-butyl-3-methylimidazolium acetate and ethanol for the pretreatment and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 192, p. 389-396, 2015b.

SINDHU, R.; BINOD, P.; PANDEY, A. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass - An overview. **Bioresource Technology**, v.199, p.76-82, 2016.

SINGH, B.; VERMA, A.; POOJA; MANDAL, P. K.; DATTA, S. A biotechnological approach for degradation of inhibitory compounds present in lignocellulosic biomass hydrolysate liquor using *Bordetella* sp. BTIITR. **Chemical Engineering Journal**, v. 328, p. 519-526, 2017.

SINGH, R.; SINGH, S.; TRIMUKHE, K. D.; PANDARE, K. V.; BASTAWADE, K. B.; GOKHLE, D. V.; VARMA, A. J. Lignin- carbohydrate complexes from sugarcane bagasse: preparation purification, and characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 62, p. 57-66, 2005.

SJÖSTRÖM, E. **Wood chemistry: fundamentals and application**. 2 ed. London: Academic Press, 293 p, 1993.

SLUITER, A.; HAMES, B.; HYMAN, D.; PAYNE, C.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; WOLFE, J. Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples - Technical Report: NREL/TP-510-42621, **National Renewable Energy Laboratory**, 2008b.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C. SLUITER, J.; TEMPLETON, D. Determination of Ash in Biomass - Technical Report NREL/TP-510-42622. **National Renewable Energy Laboratory**, 2008c.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D. Determination of carbohydrates and lignin in biomass. Laboratory Analytical Procedure: Technical Report NREL/TP-510-42618. **National Renewable Energy Laboratory**, 2008e.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples. Technical Report NREL/ TP-510-42623. **National Renewable Energy Laboratory**, 2008d.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. Laboratory Analytical Procedure: Technical Report NREL/TP-510-42618. **National Renewable Energy Laboratory**, 2011.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass - Technical Report NREL/TP-510-42618, **National Renewable Energy Laboratory**, 2012.

SLUITER, A.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. Determination of Extractives in Biomass - Technical Report: NREL/TP-510- 42619, **National Renewable Energy Laboratory**, 2008a.

STARK, N. M.; YELLE, D. J.; AGARWAL, U. P. Techniques for characterizing lignin. **Lignin in Polymer Composites**, p. 49 - 66, 2016.

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

SURIYACHAI, N.; CHAMPREDA, V.; KRAIFUL, N.; TECHANAN, W.; LAOSIRIPOJANA, N. Fractionation of lignocellulosic biopolymers from sugarcane bagasse using formic acid-catalyzed *organosolv* process. **3 Biotech**, v. 8, n. 5, p. 1–14, 2018.

SZCZERBOWSKI, D.; PITARELO, A. P.; FILHO ZANTONÁ, A.; RAMOS, L. P. Sugarcane biomass for biorefineries: comparative composition of carbohydrate and non-carbohydrate components of bagasse and straw. **Carbohydrate Polymers**, v. 114, p. 95-101, 2014.

TAYLOR, B. N.; KUYATT, C. E. Guidelines for Evaluating and Expressing the Uncertainty of NIST Measurement Results. Physics Laboratory. **National Institute of Standards and Technology**. NIST Technical Note 1297, 1994.

TANSHASHI, M. Characterization and degradation mechanism of wood components by steam explosion and utilization of exploded wood. **Wood research**, v.77, p. 49-117, 1990.

TERRETT, O.M.; DUPREE, P. Covalent interactions between lignin and hemicelluloses in plant secondary cell walls. **Current opinion in biotechnology**, v.56, p. 97-104, 2019.

VALETTE, N.; PERROT, T.; SORMANI, R.; GELHAYE, E.; MOREL-ROUHIER, M. Antifungal activities of wood extractives. **Fungal Biology Reviews**, v.31, p. 113-123, 2017.

VANHOLME, R.; DE MEESTER, B.; RALPH, J.; BOERJAN, W. Lignin biosynthesis and its integration into metabolism. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 56, p. 230-239, 2019.

WANG, H.; PUD, Y.; RAGAUSKAS, A.; YANGA, B. From lignin to valuable products—strategies, challenges, and prospects. **Bioresource Technology**, v.271, p. 449–461, 2019.

WANG, Y.; LENG, L.; ISLAM, M. K.; LIU, F.; LIN, C. S. K.; LEU, S-Y. Substrate-Related Factors Affecting Cellulosome-Induced Hydrolysis for Lignocellulose

Valorization. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, no. 3354, p. 1-17, 2019.

WEI-KIT, D.; LIM, S.; YEAN-LING, P.; KAM-HUEI, W. Application of *Organosolv* Pretreatment on Pennisetum Purpureum for Lignin Removal and Cellulose Recovery. **ACM ISBN**. p. 84-90, 2017.

WEN, J. L.; SUN, S. L.; YUAN, T. Q.; XU, F.; SUN, R. C. Structural Elucidation of Lignin Polymers of Eucalyptus Chips During *Organosolv* Pretreatment and Extended Delignification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 11067–11075, 2013.

WILD, P. J.; HUIJGEN, W. J. J.; VAN DER LINDEN, R.; DEN UIL, H.; SNELDERS, J.; LEUVEN, K.; BENJELLOUN-MLAYAH, B. *Organosolv* Fractionation of Lignocellulosic Biomass for an Integrated Biorefinery. **ECN-V--14-010**, 2015.

WITKOWSKI, A.; MAJKUT, M.; RULIK, S. Analysis of pipeline transportation systems for carbon dioxide sequestration. **Archives of thermodynamics**, v. 35, no. 1, p. 117–140, 2014.

WOOD, T. M.; MCGRAE, S. Synergism between enzymes involved in the solubilization of native cellulose. In: Ross D. Brown Jr. LJ, editor. **Hydrolysis of Cellulose: Mechanisms of Enzymatic and Acid Catalysis**, p.181-209, 1979.

WU, M.; PANG, J.; ZHANG, X.; SUN, R. Enhancement of Lignin Biopolymer Isolation from Hybrid Poplar by *Organosolv* Pretreatments. **International Journal of Polymer Science**, v. 2014, no. 194726, p. 1-10, 2014.

YÁÑEZ, M.; MATSUHIRO, B.; NUÑES, P., S., HUBBELL, C. A., SANNIGRAHI, P. & RAGAUSKAS, A. J. Physicochemical Characterization of Ethanol *Organosolv* Lignin (Eol) from *Eucalyptus Globulus*: Effect of Extraction Conditions on the Molecular Structure. **Polymer Degradation and Stability**, v. 110, p. 184-194, 2014.

YUAN, W.; GONG, Z.; WNAG, G.; ZHOU, W.; LIU, Y.; WANG, X.; ZHAO, M. Alkaline *organosolv* pretreatment of corn stover for enhancing the enzymatic digestibility. **Bioresource Technology**, v.265, p.464–470, 2018.

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

ZHANG, Y. H. P.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, p.797–824, 2004.

ZHANG, Z.; HARRISON, M. D.; RACKEMANN, D. W.; DOHERTY, W. O. S.; O'HARA, I. M. *Organosolv* pretreatment of plant biomass for enhanced enzymatic saccharification. **Green Chemistry**, v. 18, no. 2, p. 360–381, 2016.

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

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

ZHUANG, X.; WANG, W.; YU, Q.; QI, W.; WANG, Q.; TAN, X.; ZHOU.; YUAN, Z. Liquid hot water pretreatment of lignocellulosic biomass for bioethanol production accompanying with high valuable products, **Bioresource Technology**, v. 199, p. 68-75, 2016.

APÊNDICE A - DADOS DE CONTROLES DOS PRÉ-TRATAMENTOS

TABELA A1 - DADOS DOS PRÉ-TRATAMENTOS DE BAGAÇO DE CANA A 170 °C, COM 25 g DE CO₂, 60% (v/v) ETANOL E 60 min DE REAÇÃO PARA DEFINIÇÃO DO MELHOR CATALISADOR.

Experimento	Bagaço (g)	Catalisador (g)	Quantidade de CO ₂ (g)	Tempo de aquecimento (min)	Tempo de reação (min)	Tempo de resfriamento (min)	Tempo de despressurização (min)	Tempo total da reação (min)	ΔT da reação (°C)
EtOH + CO ₂	6,003 ± 0,001	0,604 ± 0,003	24,9 ± 0,2	18 ± 1	60	30 ± 1	46 ± 1	159 ± 1	171,9 ± 0,1
EtOH + ácido Acético + CO ₂	6,006 ± 0,002	0,607 ± 0,001	24,92 ± 0,05	22 ± 3	60	30 ± 1	47 ± 3	164 ± 3	171,8 ± 0,4
EtOH + ácido cítrico + CO ₂	6,006 ± 0,004	0,607 ± 0,001	24,9 ± 0,2	23 ± 2	60	30 ± 1	46 ± 2	164 ± 2	170 ± 3
EtOH + ácido oxálico + CO ₂	6,004 ± 0,002	0,603 ± 0,003	24,9 ± 0,2	20 ± 2	60	30 ± 1	46 ± 2	161 ± 2	171 ± 2
EtOH (sem CO ₂)	6,006 ± 0,001	0,602 ± 0,002	Ausência	28 ± 2	60	30 ± 1	Ausência	123 ± 2	170,33 ± 0,01
EtOH + ácido acético (sem CO ₂)	6,004 ± 0,001	0,603 ± 0,003	Ausência	30 ± 3	60	30 ± 1	Ausência	125 ± 3	170,3 ± 0,6
EtOH + ácido cítrico (sem CO ₂)	6,004 ± 0,001	0,602 ± 0,002	Ausência	30 ± 3	60	30 ± 1	Ausência	125 ± 3	170,5 ± 0,2
EtOH + ácido oxálico (sem CO ₂)	6,007 ± 0,001	0,606 ± 0,002	Ausência	31 ± 3	60	30 ± 1	Ausência	126 ± 3	170,7 ± 0,2

FIGURA A1 - PERFIS DE TEMPERATURA E PRESSÃO DOS PRÉ-TRATAMENTOS DE BAGAÇO DE CANA A 170 °C, COM 25 g DE CO₂, 60% (v/v) DE ETANOL E 60 min DE REAÇÃO PARA DEFINIÇÃO DO MELHOR CATALISADOR.

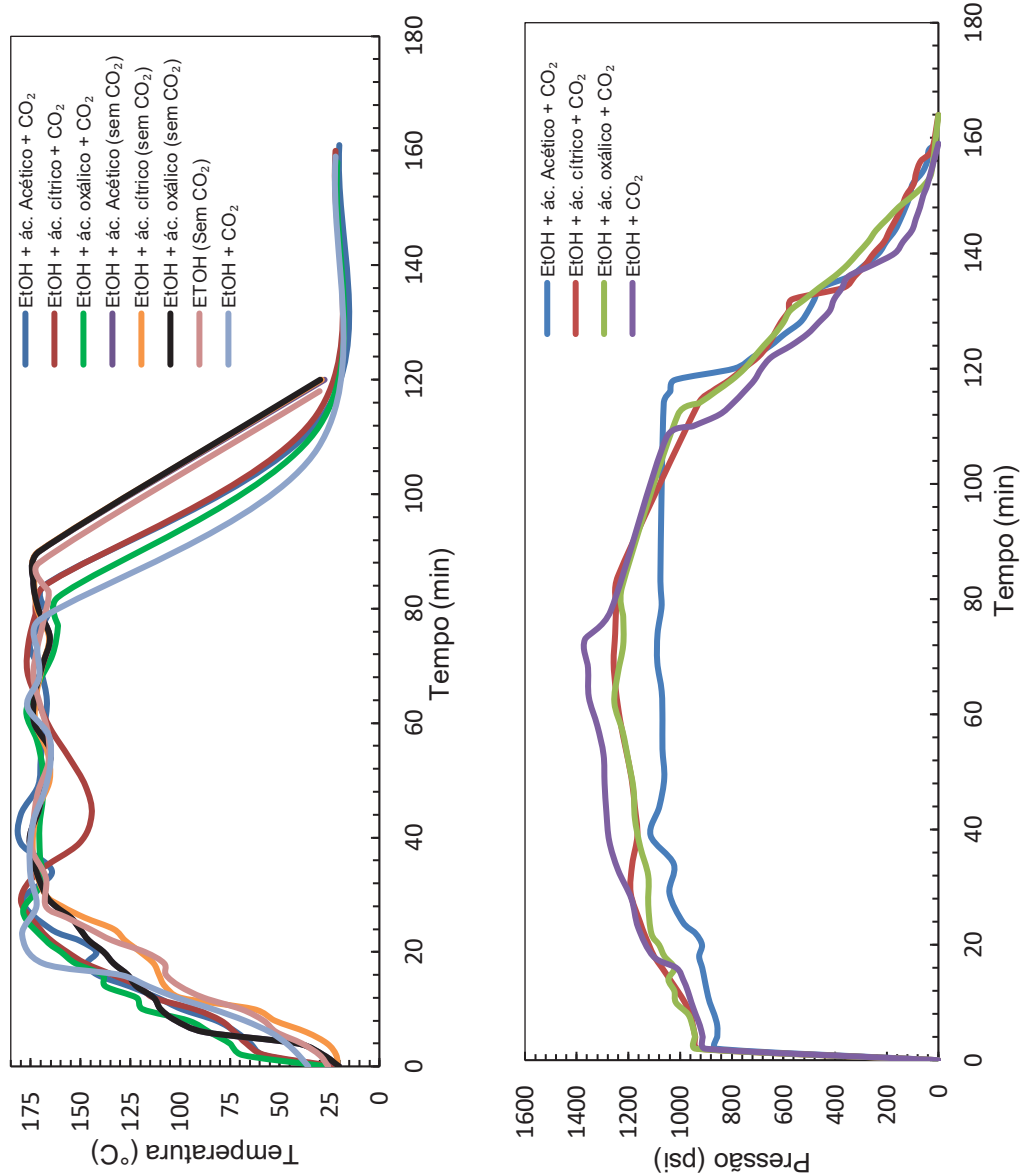


TABELA A2 - DADOS DOS PRÉ-TRATAMENTOS DE BAGAÇO DE CANA A 170 °C, 60% (v/v) DE ETANOL E 60 min DE REAÇÃO PARA DEFINIÇÃO DA QUANTIDADE DE CO₂.

Experimento	Bagaço (g)	Catalisador (g)	Quantidade de CO ₂ (g)	Tempo de aquecimento (min)	Tempo de reação (min)	Tempo de resfriamento (min)	Tempo de despressurização (min)	Tempo total da reação (min)	ΔT da reação (°C)
EtOH + ácido oxálico (sem CO ₂)	6,007± 0,001	0,606 ± 0,002	Ausência	31 ± 3	60	30 ± 1	Ausência	126 ± 3	170,7 ± 0,2
EtOH + ácido oxálico + 25 g de CO ₂	6,004 ± 0,002	0,603 ± 0,003	24,9 ± 0,2	20 ± 2	60	30 ± 1	46 ± 2	161 ± 2	171 ± 2
EtOH + ácido oxálico + 35 g de CO ₂	6,005	0,604	34,9	26	60	30 ± 1	46	167	169,4
EtOH + ácido oxálico + 50 g de CO ₂	6,005	0,605	50,9	28	60	30 ± 1	42	165	170,8

FIGURA A2 - PERFIS DE TEMPERATURA E PRESSÃO DOS PRÉ-TRATAMENTOS DE BAGAÇO DE CANA A 170 °C, 60% (v/v) DE ETANOL E 60 min DE REAÇÃO PARA DEFINIÇÃO DA QUANTIDADE DE CO₂.

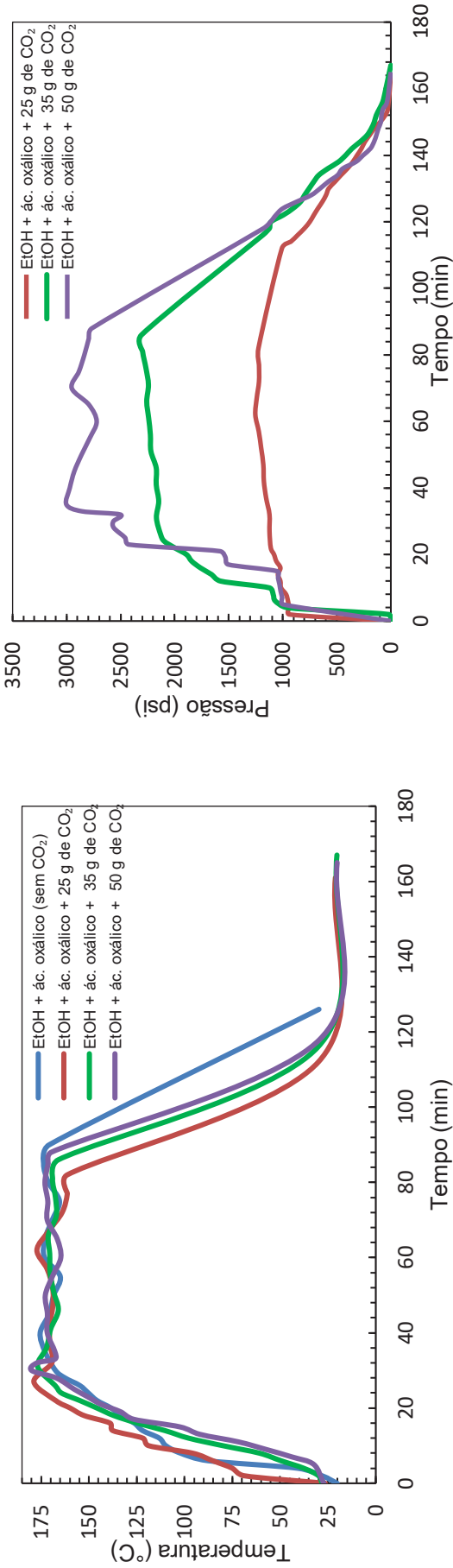


TABELA A3 - DADOS DOS PRÉ-TRATAMENTOS DE BAGAÇO DE CANA A 170 °C, 25 g DE CO₂ E 60% (v/v) DE ETANOL PARA DEFINIÇÃO DO TEMPO DE REAÇÃO.

Experimento	Bagaço (g)	Catalisador (g)	Quantidade de CO ₂ (g)	Tempo de aquecimento (min)	Tempo de reação (min)	Tempo de resfriamento (min)	Tempo de despressurização (min)	Tempo total da reação (min)	ΔT da reação (°C)
EtOH + ácido oxálico (Sem CO ₂) (60 min)	6,007± 0,001	0,606 ± 0,002	Ausência	31 ± 3	60	30 ± 1	Ausência	126 ± 3	170,7 ± 0,2
EtOH + ácido oxálico + CO ₂ (60 min)	6,004 ± 0,002	0,603 ± 0,003	24,9 ± 0,2	20 ± 2	60	30 ± 1	46 ± 2	161 ± 2	171 ± 2
EtOH + ácido oxálico (Sem CO ₂) (15 min)	6,005 ± 0,002	0,604 ± 0,003	Ausência	38 ± 3	15	30 ± 1	Ausência	88 ± 3	170,4 ± 0,5
EtOH + ácido oxálico + CO ₂ (15 min)	6,006± 0,001	0,608 ± 0,001	25,02 ± 0,04	20 ± 3	15	30 ± 1	47 ± 1	117 ± 3	170,4 ± 0,3

FIGURA A3 - PERFIS DE TEMPERATURA E PRESSÃO DOS PRÉ-TRATAMENTOS DE BAGAÇO DE CANA A 170 °C, 25 g DE CO₂ E 60% (v/v) DE ETANOL PARA DEFINIÇÃO DO TEMPO DE REAÇÃO.

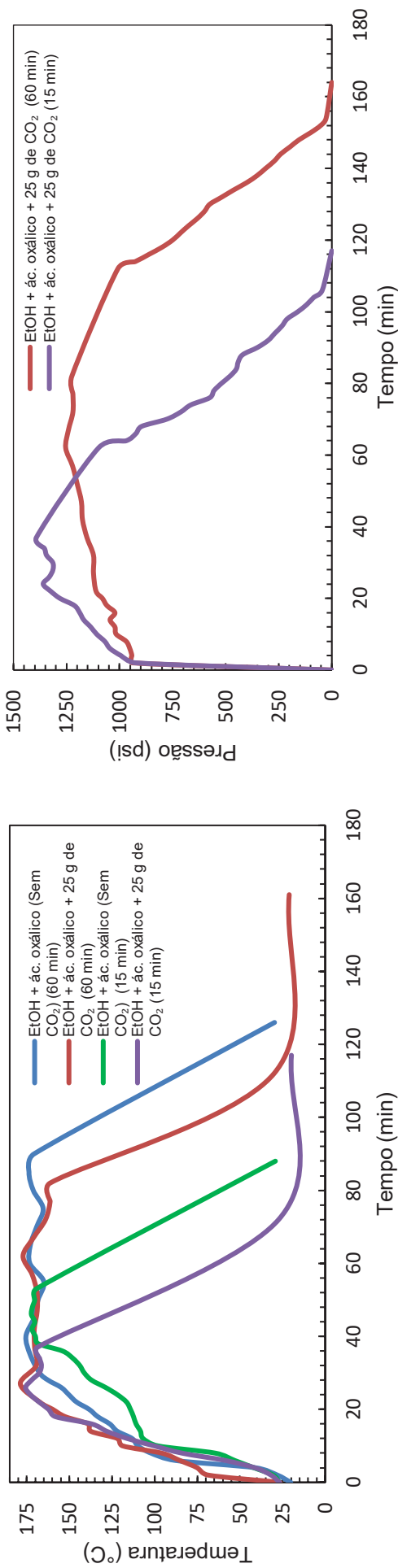


TABELA A4 - DADOS DOS PRÉ-TRATAMENTOS DE BAGAÇO DE CANA A 170 °C, 25 g DE CO₂ E 15 min DE REAÇÃO PARA DEFINIÇÃO DA MELHOR PORÇÃO ETANOL EM ÁGUA.

Experimento	Bagaço (g)	Catalisador (g)	Quantidade de CO ₂ (g)	Tempo de aquecimento (min)	Tempo de reação (min)	Tempo de resfriamento (min)	Tempo de despressurização (min)	Tempo total da reação (min)	ΔT da reação (°C)
100% H ₂ O + ácido oxálico (Sem CO ₂)	6,001	0,601	Ausência	32	15	30 ± 1	Ausência	82	170,8
100% H ₂ O + ácido oxálico + 25 g de CO ₂	6,004	0,603	24,76	24	15	30 ± 1	46	120	169,9
40% EtOH + ácido oxálico (Sem CO ₂)	6,007	0,608	Ausência	40	15	30 ± 1	Ausência	90	170,9
40% EtOH + ácido oxálico + 25 g de CO ₂	6,006	0,608	25,02	22	15	30 ± 1	46	118	170,8
60% EtOH + ácido oxálico (Sem CO ₂)	6,005 ± 0,002	0,604 ± 0,003	Ausência	38 ± 3	15	30 ± 1	Ausência	88 ± 3	170,4 ± 0,5
60% EtOH + ácido oxálico + 25 g de CO ₂	6,006 ± 0,001	0,608 ± 0,001	25,02 ± 0,04	20 ± 3	15	30 ± 1	47 ± 1	117 ± 3	170,4 ± 0,3
80% EtOH + ácido oxálico (Sem CO ₂)	6,008	0,601	Ausência	46	15	30 ± 1	Ausência	96	168,7
80% EtOH + ácido oxálico + 25 g de CO ₂	6,007	0,602	25,09	38	15	30 ± 1	48	136	170,0

FIGURA A4 - PERFIS DE TEMPERATURA E PRESSÃO DOS PRÉ-TRATAMENTOS DE BAGAÇO DE CANA A 170 °C, 25 g DE CO₂ E 15 min DE REAÇÃO PARA DEFINIÇÃO DA MELHOR PORÇÃO ETANOL EM ÁGUA.

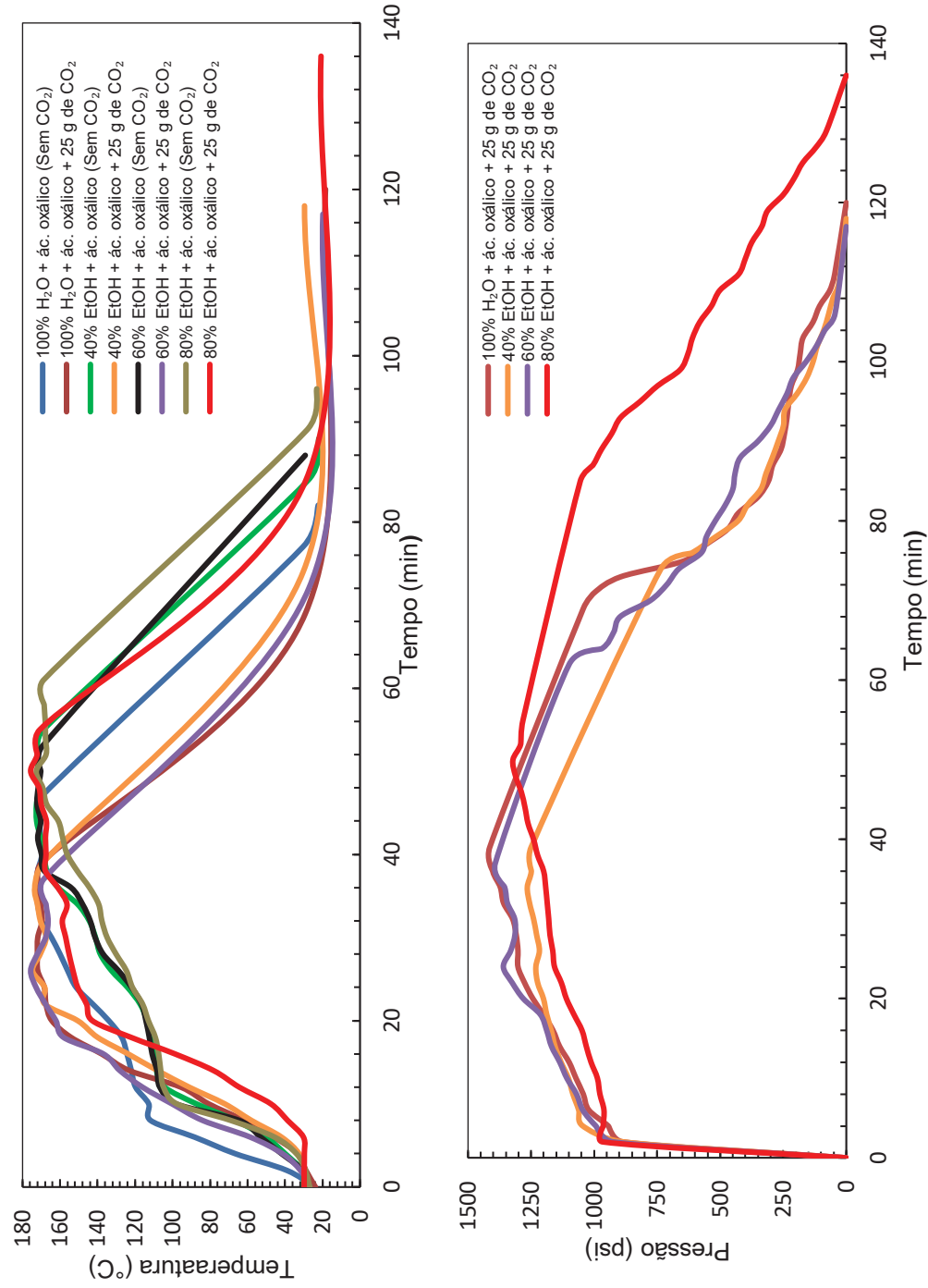
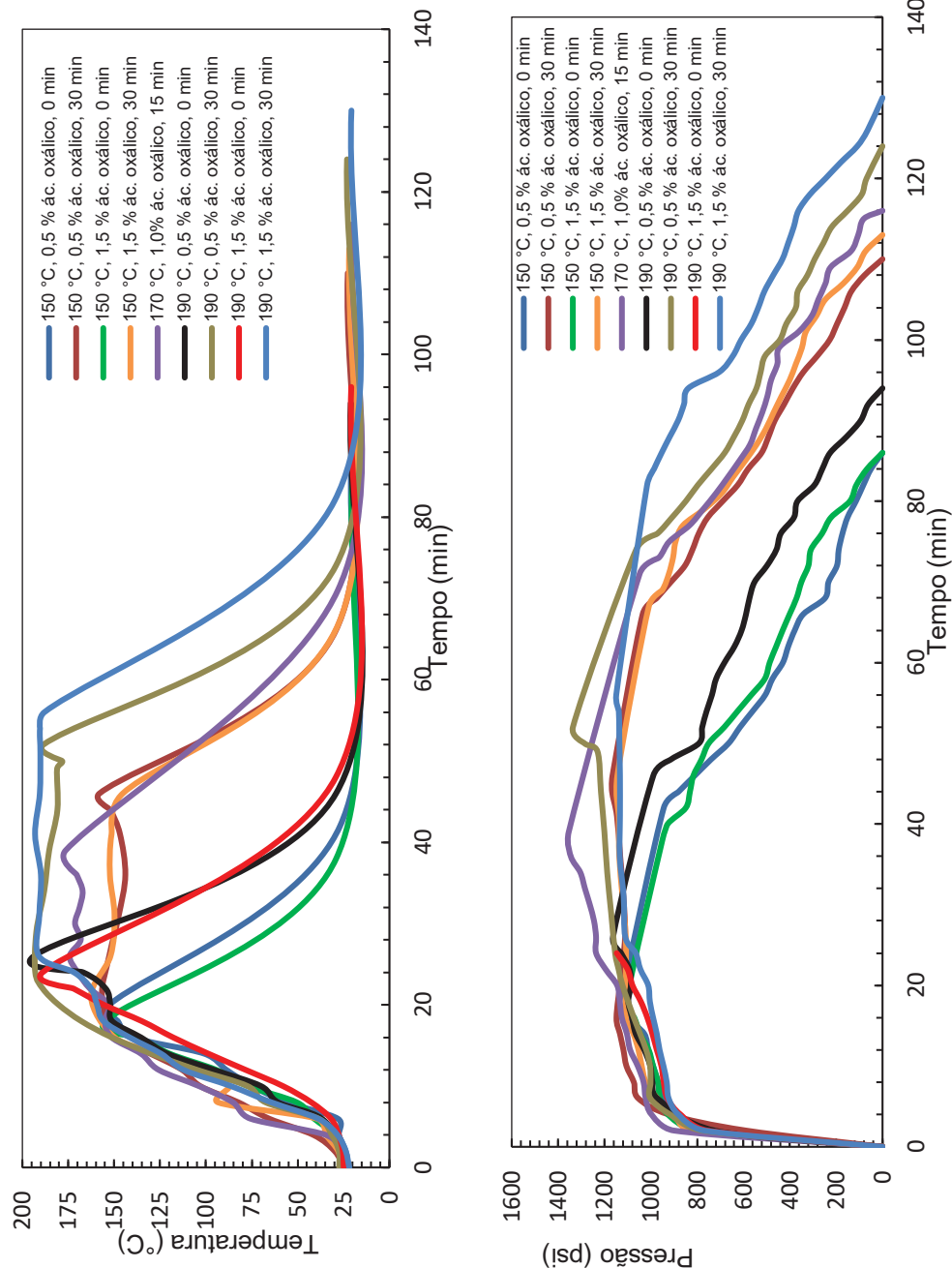


TABELA A5 - DADOS DOS PRÉ-TRATAMENTOS ORGANOSOLV DE BAGAÇO DE CANA NA PRESENÇA DE DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO COM PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.

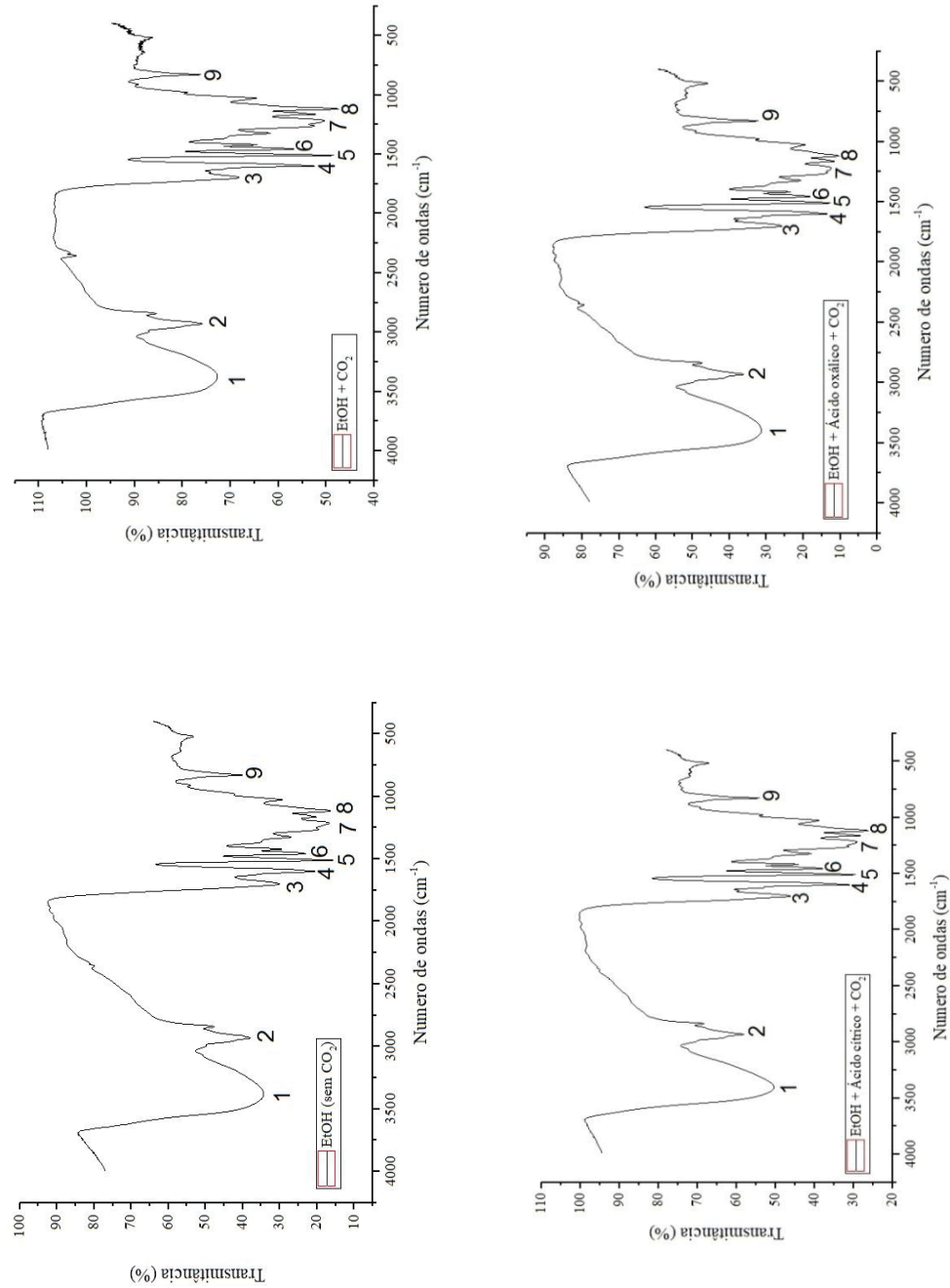
T (°C)	Ácido oxálico (%) [m/v]	Tempo (min)	Bagaço (g)	Catalisador (g)	Quantidade de CO ₂ (g)	Tempo de aquecimento (min)	Tempo de resfriamento (min)	Tempo de despressurização (min)	Tempo total da reação (min)	ΔT da reação (°C)
150	0,5	0	6,001	0,300	25,02	20	22	44	86	Até atingir 150
150	0,5	30	6,001	0,300	24,89	16	20	44	110	150,88
150	1,5	0	6,001	0,900	25,08	18	20	48	86	Até atingir 150
150	1,5	30	6,001	0,900	25,05	16	21	46	113	151,87
170	1,0	15	6,009 ± 0,001	0,6003 ± 0,0002	25,03 ± 0,01	23 ± 1	32 ± 3	45 ± 3	115 ± 1	150,5 ± 0,7
190	0,5	0	6,002	0,300	25,03	26	20	48	94	Até atingir 190
190	0,5	30	6,001	0,301	25,05	24	22	48	124	189,97
190	1,5	0	6,001	0,901	25,08	24	24	48	96	Até atingir 190
190	1,5	30	6,001	0,900	25,09	26	26	48	130	190,49

FIGURA A5 - PERFIS DE TEMPERATURA E PRESSÃO DOS PRÉ-TRATAMENTOS ORGANOSOLV DE BAGAÇO DE CANA NA PRESENÇA DE DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO COM PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.



APÊNDICE B - ESPECTROS NO INFRAVERMELHO DE LIGNINA RECUPERADA DO LICOR DE EXTRAÇÃO CONCENTRADO
APÓS PRÉ-TRATAMENTO

FIGURA B1 - ESPECTROS NO INFRAVERMELHO DA LIGNINA RECUPERADA DO LICOR DE EXTRAÇÃO APÓS PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE A 170 °C, 60% (v/v) DE ETANOL EM ÁGUA E 60 min DE REAÇÃO.



APÊNDICE C - PERFIS DE ESPECTROFOTOMETRIA NO UV/VISÍVEL DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS DOS PRÉ-TRATAMENTOS

FIGURA C1 - PERFIS UV/VISÍVEL DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS DOS PRÉ-TRATAMENTOS DE BAGAÇO DE CANA A 170 °C, COM 25 g DE CO₂, 60% (v/v) DE SOLVENTE E 60 min DE REAÇÃO PARA DEFINIÇÃO DO MELHOR CATALISADOR.

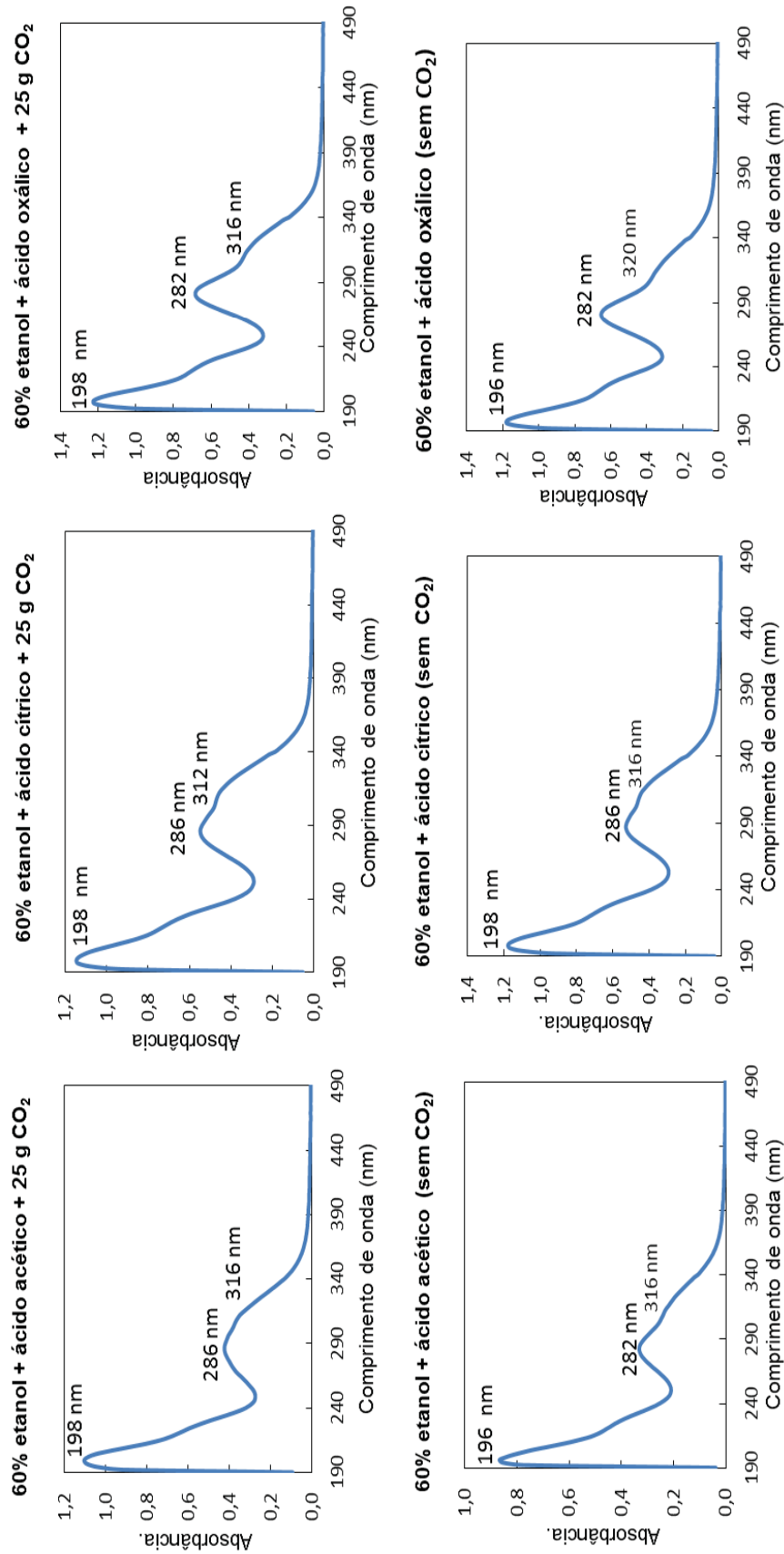


FIGURA C2 - PERFIS UV/VISÍVEL DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS DOS PRÉ-TRATAMENTOS DE BAGAÇO DE CANA A 170 °C, 60% (v/v) DE ETANOL E 60 min DE REAÇÃO PARA DEFINIÇÃO DA QUANTIDADE DE CO₂.

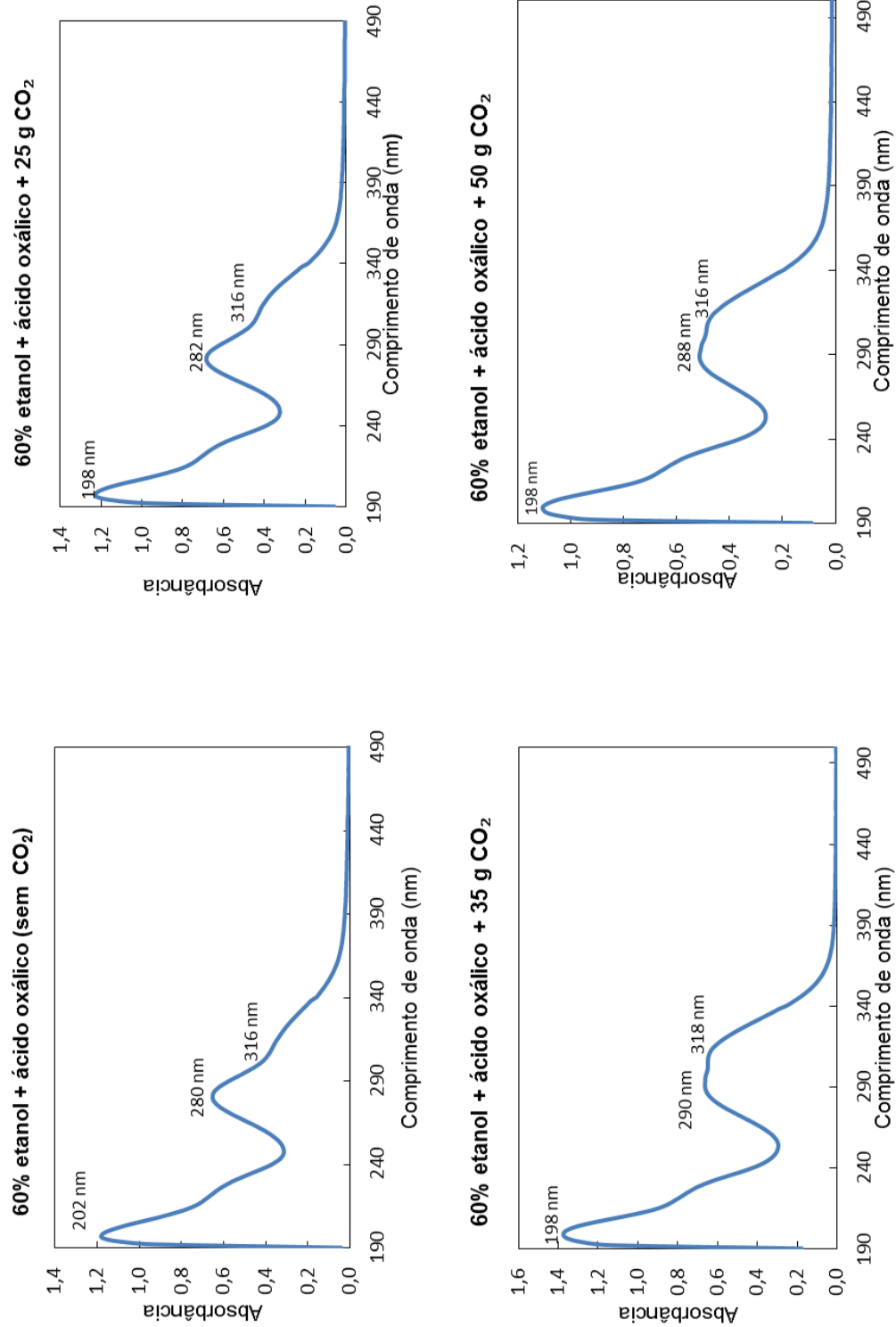


FIGURA C3 - PERFIS UV/VISÍVEL DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS DOS PRÉ-TRATAMENTOS DE BAGAÇO DE CANA A 170 °C, 25 g DE CO₂ E 60% (v/v) DE ETANOL EM ÁGUA PARA DEFINIÇÃO DO TEMPO DE REAÇÃO.

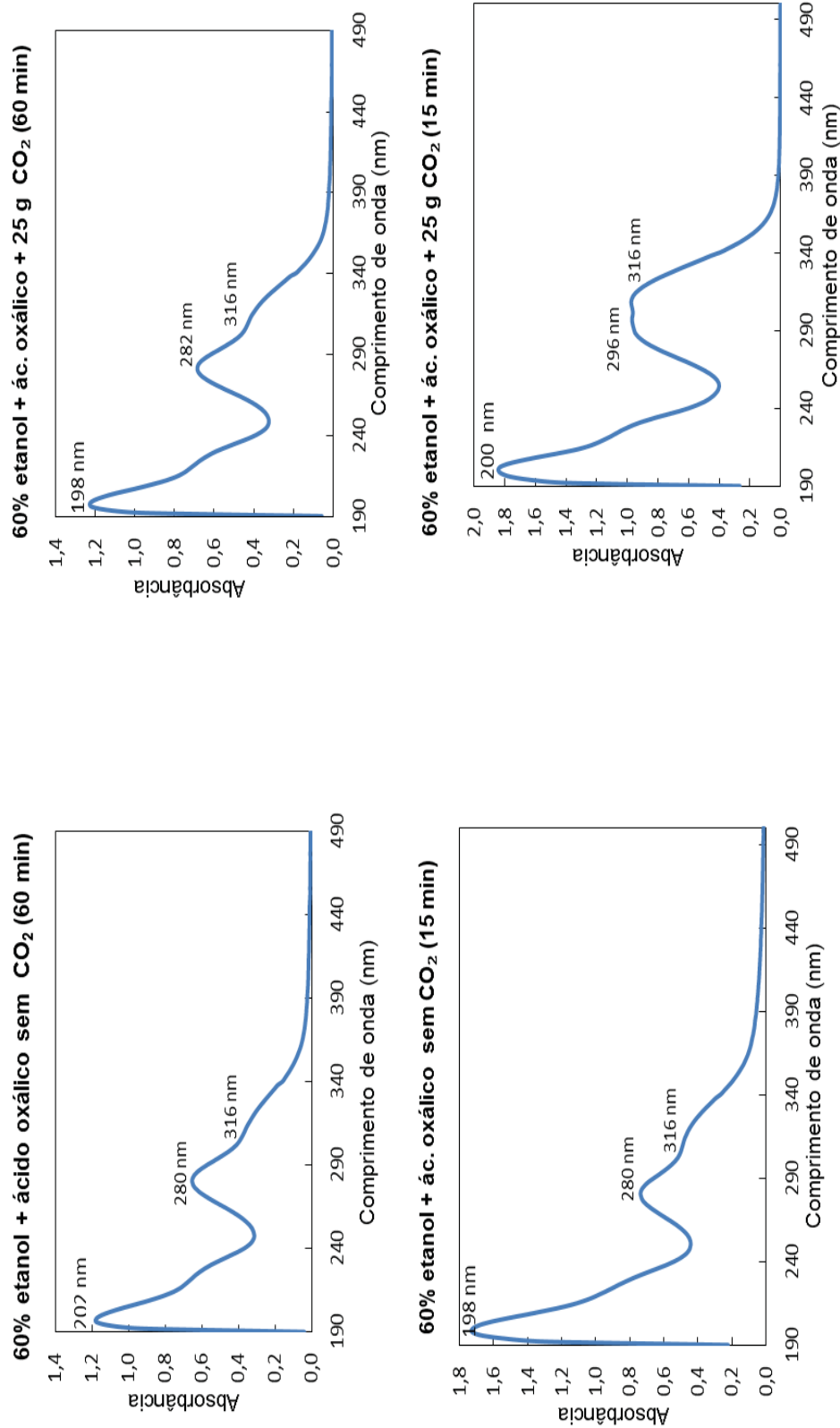


FIGURA C4 - PERFIS UV/VISÍVEL DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS DOS PRÉ-TRATAMENTOS DE BAGAÇO DE CANA A 170 °C, 25 g DE CO₂ E 15 min DE REAÇÃO PARA DEFINIÇÃO DA MELHOR PORÇÃO SOLVENTE/ÁGUA.

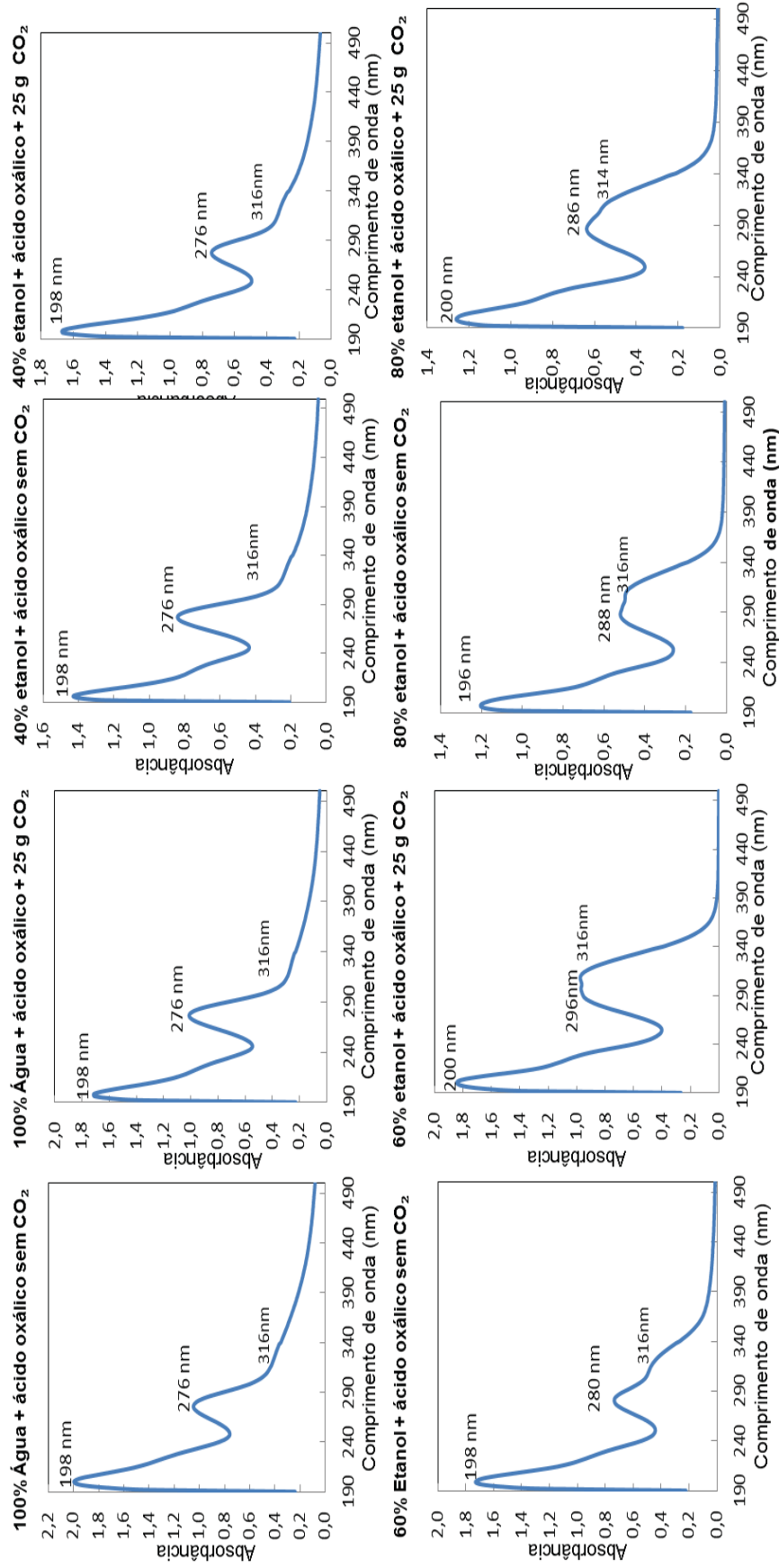
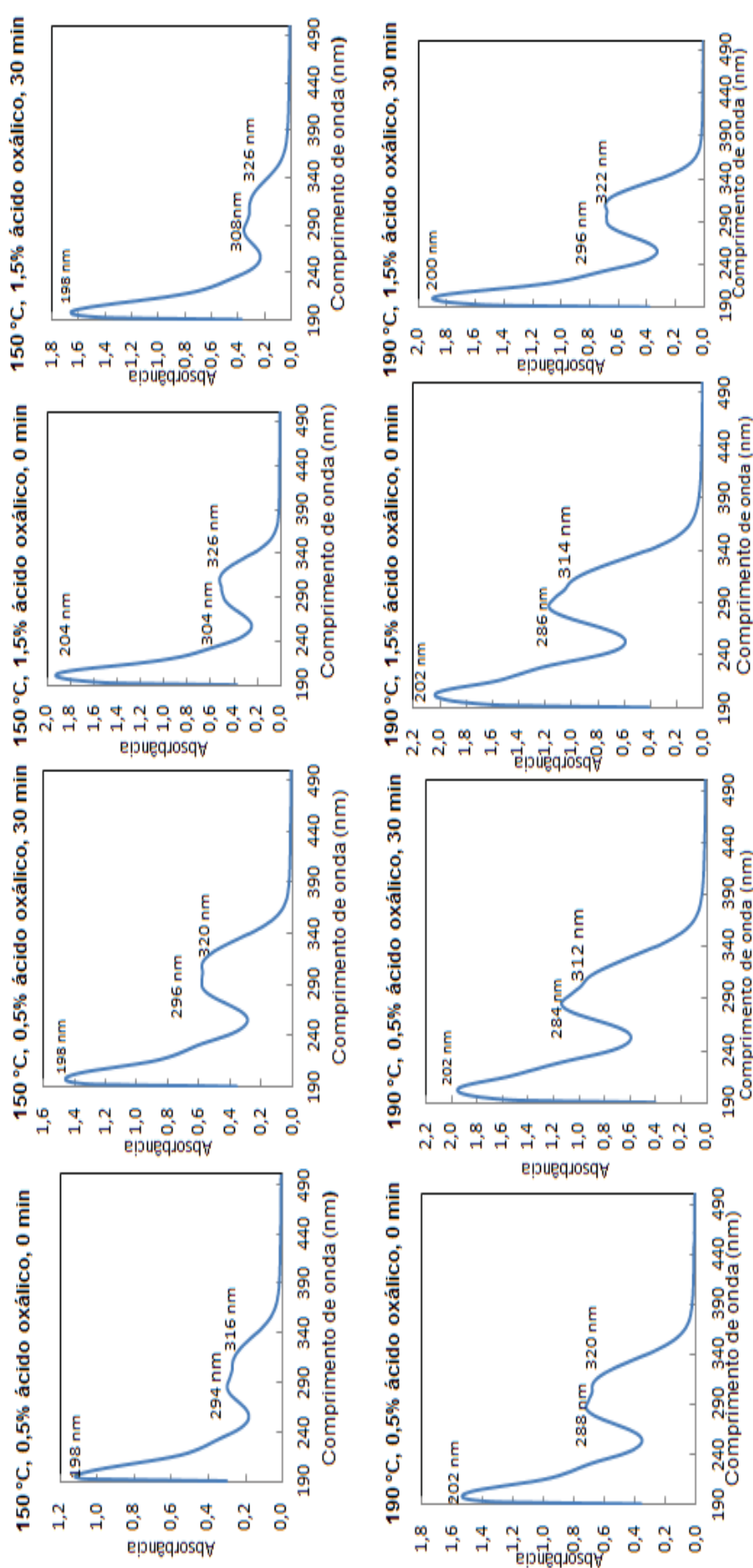
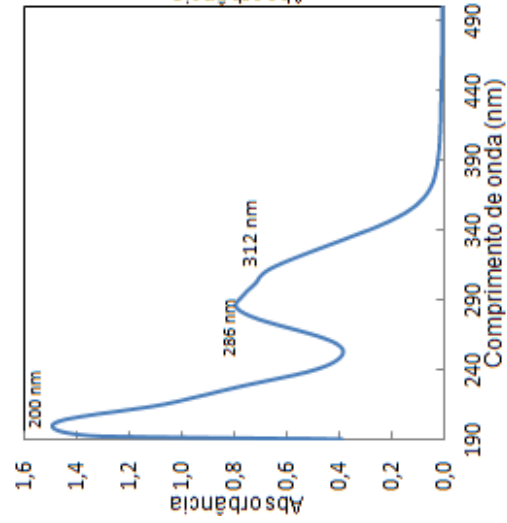


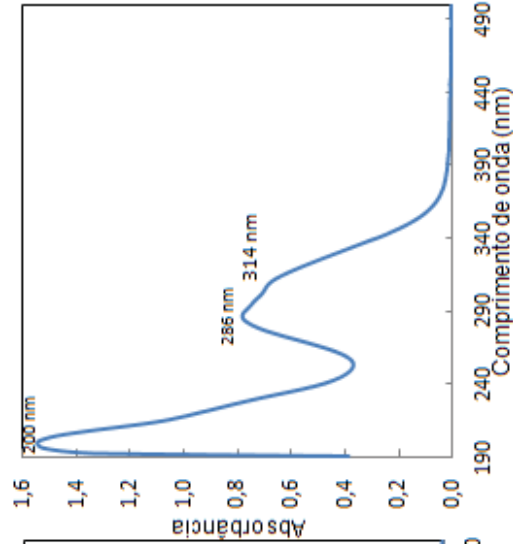
FIGURA C5 - PERFIS Uv/vISÍVEL DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS DOS PRÉ-TRATAMENTOS ORGANOSOLV DE BAGAÇO DE CANANA PRESENÇA DE DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO COM PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.



170 °C, 1,0% ácido oxálico, 15 min



170 °C, 1,0 % ácido oxálico, 15 min



170 °C, 1,0% ácido oxálico, 15 min

