



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

JOSELAINÉ CARVALHO SANTANA

**PRÉ-TRATAMENTO DE BIOMASSA PELO MÉTODO
ORGANOSOLV UTILIZANDO GLICEROL PARA OBTENÇÃO DE
AÇÚCARES REDUTORES**

***PRE-TREATMENT OF BIOMASS BY THE ORGANOSOLV
METHOD USING GLYCEROL TO OBTAINMENT REDUCING
SUGARS***





**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

JOSELAINÉ CARVALHO SANTANA

**PRÉ-TRATAMENTO DE BIOMASSA PELO MÉTODO
ORGANOSOLV UTILIZANDO GLICEROL PARA OBTENÇÃO DE
AÇÚCARES REDUTORES**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Sergipe, para a obtenção do título de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dra. Luciane Pimenta Cruz Romão

Coorientador: Prof. Dr. Alberto Wisniewski Junior

***PRE-TREATMENT OF BIOMASS BY THE ORGANOSOLV
METHOD USING GLYCEROL TO OBTAINMENT REDUCING
SUGARS***

Doctorate thesis presented to the Graduate Program in Chemistry of the Federal University of Sergipe to obtain Ph.D. in Chemistry.



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

S232 Santana, Joselaine Carvalho
Pré-tratamento de biomassa pelo método organosolv utilizando glicerol para obtenção de açúcares redutores / Joselaine Carvalho Santana ; orientadora Luciane Pimenta Cruz Romão - São Cristóvão, 2020.
126 f. : il.

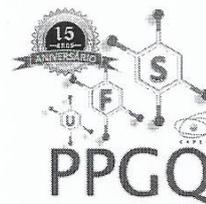
Tese (doutorado em Química) – Universidade Federal de Sergipe, 2020.

1. Química. 2. Aguapé (Planta). 3. Bagaço de cana. 4. Palha. 5. Coco. 6. Hidrólise – Enzimas. I. Romão, Luciane Pimenta Cruz orient. II. Título.

CDU 54



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
Programa de Pós-Graduação em Química
PPGQ



FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Tese de Doutorado de
Joselaine Carvalho Santana apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Química da Universidade Federal de Sergipe em
27/02/2020.

Prof.ª Dr.ª Luciane Pimenta Cruz Romão
Departamento de Química - UFS

Prof.ª Dr.ª Lisiane dos Santos Freitas
Departamento de Química - UFS

Prof. Dr. Alberto Wisniewski Jr.
Departamento de Química - UFS

Prof. Dr. Sandro Navickiene
Departamento de Química - UFS

Prof. Dr. Fabio de Melo Resende
Departamento de Engenharia Química - UFS

Prof. Dr. Alvaro Silva Lima
Universidade Tiradentes

RESUMO

A produção do etanol celulósico ainda não é economicamente viável, o principal entrave é a força intrínseca entre os componentes da biomassa. De modo que um pré-tratamento precisa ser realizado para desagregar a lignocelulose e disponibilizar os carboidratos para os processos de hidrólise enzimática e fermentação. Nesse contexto, o pré-tratamento organosolv com glicerol vem sendo investigado. O uso do glicerol mostra-se promissor devido ao seu aspecto sustentável econômico e ambientalmente. Nesse estudo, reações de pré-tratamento organosolv com glicerol, inicialmente aplicadas ao aguapé (*Eichhornia crassipes*), foram realizadas com avaliação dos efeitos das seguintes variáveis: tempo (10-120 min), temperatura (100-220 °C), razão sólido/líquido (1-6%), porcentagem de água (0-40%) e catalisador ferrita de cobalto (CoFe_2O_4) (0-10%). O objetivo foi otimizar o processo, a fim de maximizar o rendimento em açúcares na subsequente hidrólise enzimática. A condição otimizada, pelo delineamento experimental 2^{5-1} , foi a seguinte: tempo de 10 min, temperatura de 220 °C, razão sólido/líquido de 6%, 0% de água e 0% de catalisador, que resultou em 37% de açúcares liberados. Outras fontes de ferro também foram testadas (FeCl_3 e FeSO_4). Diferentemente do CoFe_2O_4 esses sais de ferro, adicionados na condição ótima, apresentaram atividade. O uso de FeSO_4 e FeCl_3 a $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ aumentou a liberação de açúcares para 41 e 51%, respectivamente. Evidenciando que a atividade do ferro é determinada pela forma em que se encontra disponível no meio reacional. Diante dessa otimização, foi realizado um planejamento fatorial 2^3 para investigar o sinergismo entre o tamanho de partícula ($< 0,85 - > 2,0 \text{ mm}$), a concentração de FeCl_3 ($0,025 - 0,175 \text{ mol.L}^{-1}$) e a temperatura ($160 - 220 \text{ °C}$), na desconstrução do aguapé, bagaço de cana, palha de milho e casca de coco verde. A análise dos efeitos indicou que o tipo de lignocelulose interfere na ação das variáveis, mas encontrou-se uma condição ótima em comum ($< 0,85 \text{ mm}$; $0,025 \text{ mol.L}^{-1}$; 220 °C), viável por usar pequena quantidade de catalisador. Para o aguapé essa nova otimização além de reduzir em 75% a quantidade usada de FeCl_3 , aumentou em 64% a quantidade de glicose produzida por 100 gramas de biomassa *in natura*, passando de 14 g/100 g para 23 g/100 g após 48 h de hidrólise enzimática, devido a maior recuperação de celulose na biomassa pré-

tratada. As biomassas pré-tratadas com essa combinação de fatores exibiram digestibilidade enzimática superior a 93% após 48 h, reflexo de uma eficiente redução da recalcitrância, devido à alta remoção de hemicelulose, aproximadamente 90%, relacionada ao uso do FeCl_3 que favoreceu a sua decomposição, também ocorreu considerável deslignificação. Ocorreu baixa formação de inibidores no hidrolisado, indicando que pode ser diretamente fermentado. Nos licores a fermentação poderá ser realizada após a separação do ácido acético, e a lignina removida para esses pode ser facilmente recuperada apenas por centrifugação. Testes realizados na condição ótima revelaram que o FeCl_3 é mais viável que o HCl , e que após o pré-tratamento a biomassa pode ser diretamente submetida a hidrólise enzimática sem lavagem e úmida. Além disso, o glicerol bruto, após tratamento simples, proporcionou a mesma eficácia do glicerol comercial.

Palavras-chave: Aguapé. Bagaço de cana. Palha de milho. Casca de coco. Pré-tratamento organosolv. Hidrólise enzimática.

ABSTRACT

*The production of the cellulosic ethanol is not yet economically viable, the main obstacle is the intrinsic strength between the components of biomass. Therefore, a pretreatment needs to be carried out to break down lignocellulose and make carbohydrates available for the enzymatic hydrolysis and fermentation processes. In this context, the organosolv pretreatment with glycerol has been investigated. The use of glycerol is promising due to its economically and environmentally sustainable aspect. Organosolv pretreatment reactions with glycerol, applied to water hyacinth (*Eichhornia crassipes*), were performed with evaluation of the effects of the following variables: time (10-120 min), temperature (100-220 °C), solid/liquid ratio (1-6%), water percentage (0-40%), and cobalt ferrite (CoFe_2O_4) catalyst (0-10%). The objective was to optimize the process in order to maximize the yield of sugars in subsequent enzymatic hydrolysis. The optimized condition obtained using a 2^{5-1} experimental design was as follows: time of 10 min, temperature of 220 °C, solid/liquid ratio of 6%, 0% water, and 0% catalyst, which resulted in 37% release of sugars. Others sources of iron were also tested (FeCl_3 and FeSO_4). Unlike CoFe_2O_4 , these added iron salts presented activity, under the optimal condition. The use of FeSO_4 and FeCl_3 at 0.1 mol.L^{-1} increased the release of sugars to 41 and 51%, respectively. It was evident that the activity of the iron was determined by the form in which it was present. In view of this optimization, a factorial design 2^3 was carried out to investigate the synergism between particle size (<0.85 - > 2.0 mm), FeCl_3 concentration (0.025 - 0.175 mol.L^{-1}) and temperature (160-220 °C), in the deconstruction of water hyacinth, sugarcane bagasse, corn straw and green coconut shell. The analysis of the effects indicated that the type of lignocellulose interferes with the action of the variables, but an optimal condition in common (<0.85 mm; 0.025 mol.L^{-1} ; 220 °C) was found, viable for using a small amount of catalyst. For water hyacinth, this new optimization, besides reducing the amount of FeCl_3 used by 75%, increased the amount of glucose produced per 100 grams of fresh biomass by 64%, from 14 g / 100 g to 23 g / 100 g after 48 h of enzymatic hydrolysis, due to greater cellulose recovery in the pre-treated biomass. Biomasses pretreated with this combination of factors exhibited enzymatic digestibility greater than 93% after 48 h, reflecting an efficient reduction in recalcitrance, due to the high removal of*

hemicellulose, approximately 90%, related to the use of FeCl₃ that favored its decomposition, also occurred considerable delignification. There was low formation of inhibitors in the hydrolyzate, indicating that it can be directly fermented. In liqueurs, fermentation can be carried out after the separation of acetic acid, and the lignin removed for them can be easily recovered only by centrifugation. Tests carried out in the optimum condition revealed that FeCl₃ is more viable than HCl, and that after pre-treatment the biomass can be directly subjected to enzymatic hydrolysis without washing and moist. In addition, crude glycerol, after simple treatment, provided the same effectiveness as commercial glycerol.

Keywords: *Water hyacinth. Sugarcane bagasse. Corn straw. Coconut shell. Organosolv pre-treatment. Enzymatic hydrolysis.*

Sumário

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Biomassa Lignocelulósica	3
1.1.1	Aguapé.....	6
1.1.2	Bagaço de Cana.....	8
1.1.3	Palha de Milho.....	8
1.1.4	Casca de Coco.....	9
1.2	Bioetanol.....	10
1.3	Etapas Envolvidas na Produção do Etanol Celulósico.....	13
1.3.1	Pré-Tratamento	13
1.3.2	Hidrólise.....	16
1.3.3	Fermentação	19
1.4	Técnicas de Pré-Tratamento de Biomassa Lignocelulósica	21
1.4.1	Pré-Tratamento Organosolv	22
1.4.1.1	Glicerol	24
1.5	Técnicas de Determinação de Açúcares Redutores.....	26
1.5.1	Método do Ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS).....	27
1.5.2	Métodos Cromatográficos.....	28
1.6	Planejamento Experimental.....	29
2	OBJETIVOS	38
2.1	Objetivo Geral.....	38
2.2	Objetivos Específicos	38
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
3.1	Coleta e Preparo das Biomassas	39
3.2	Pré-Tratamento Organosolv com Glicerol	42
3.2.1	Planejamento Fatorial 2^{5-1}	42
3.2.1.1	Estudo com a adição de Sais de Ferro.....	46
3.2.2	Planejamento 2^3	46
3.2.2.1	Aplicação do glicerol bruto.....	48
3.3	Recuperação da Lignina.....	49
3.4	Hidrólise Enzimática	49
3.5	Métodos de Análise	50
3.5.1	Determinação do Teor de Umidade e Cinzas.....	50
3.5.2	Determinação dos Açúcares Redutores Totais Pelo Método do Ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS).....	50
3.5.3	Determinação da Composição das Biomassas e Determinação dos Açúcares Redutores por HPLC.....	51

3.5.4	Determinação de HMF, Furfural e Ácido Acético.....	53
3.5.5	Obtenção dos Espectros na Região do Infravermelho.....	53
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
4.1	Planejamento Fatorial 2^{5-1}	54
4.1.1	Análise Estatística.....	58
4.1.1.1	Estudo na Condição Ótima com a Adição de Sais de Ferro.....	65
4.2	Atuação do Ferro nas Reações de Pré-Tratamento.....	69
4.3	Planejamento 2^3	71
4.3.1	Análise Estatística.....	75
4.3.2	Condição Ótima.....	87
4.3.2.1	Testes na Condição Ótima.....	89
4.3.2.2	Determinação de HMF, Furfural e Ácido Acético.....	92
4.3.2.3	Quantidade de Glicose Produzida via Hidrólise Enzimática.....	95
4.3.3	Recuperação da Lignina.....	99
4.3.4	Aplicação do Glicerol Bruto.....	102
5	CONCLUSÕES.....	107
6	PERSPECTIVAS DO TRABALHO.....	109
7	REFERÊNCIAS.....	110

Dedico esse trabalho ao meu filho, Lucas, e a minha irmã, Maria Flosina, por serem anjos em minha vida. E a minha mãe, Josinete, pelo apoio e preocupação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a minha família por serem minha fortaleza;

A minha orientadora, professora Luciane, por sempre se mostrar disposta a auxiliar no que foi preciso;

Ao meu coorientador, professor Alberto Wisniewski, pela importante contribuição;

Ao professor Sandro Navickiene, e aos colegas Bárbara Luísa, Luís Fabrício e Raphael Amâncio pelo auxílio nas análises cromatográficas;

A professora Ana Karla, pela contribuição com dicas importantes e auxílio nas análises pelo método DNS, além da infraestrutura disponibilizada;

A todos do Laboratório de Estudos da Matéria Orgânica Natural - LEMON, pela descontração e auxílio no que foi preciso, principalmente a Ana Cláudia, por sua importante ajuda na execução dos experimentos;

Ao grupo de Pesquisa em Petróleo e Energia da Biomassa – PEB;

Ao professor Carlos Alexandre e todos do LQA, pelo uso da centrífuga;

Ao professor Gabriel e a Carla, que por intermédio da professora Lisiane disponibilizaram o HPLC para uso;

Ao professor Narendra Narain, por ter cedido soluções padrão dos analitos em estudo para a realização de testes preliminares;

Aos responsáveis pelos laboratórios de graduação e pesquisa, dos quais precisei fazer uso do espaço ou de insumos;

A todos os colegas do PPGQ, em especial a Solange e a Roberta;

Aos membros da banca examinadora, por terem aceitado contribuir no melhoramento do trabalho;

Ao Condomínio de Laboratórios de Química Multiusuário – CLQM, pelo acesso a diversas técnicas de análise;

Ao Programa de Pós-Graduação em Química, bem como a todos os professores, pela infraestrutura concedida e ensinamentos transmitidos;

A CAPES e a FAPITEC-SE pelo apoio financeiro.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANEEL – Agência Nacional de Energia Elétrica

PROALCOOL – Programa Nacional do Álcool

SHF – *Separate Hydrolysis Fermentation* (Hidrólise e Fermentação em Separado)

SSP – *Simultaneous Saccharification and Fermentation* (Sacarificação e Fermentação Simultâneas)

DNS – Método do Ácido 3,5-dinitrosalicílico

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*

IR – Índice de Refração

ELSD - *Evaporative Light Scattering Detector* (Detector Evaporativo por Espalhamento de Luz)

MS – *Mass Spectrometry* (Espectrometria de Massas)

CAD - *Charged Aerosol Detector* (Detector de Aerossol Carregado)

UV/Vis – Ultravioleta/Visível

NREL – *National Renewable Energy Laboratory* (Laboratório Nacional de Energia Renovável)

LC/MS - *Liquid Chromatography/Mass Spectrometry* (Cromatografia Líquida/Espectrometria de Massas)

FTIR - *Fourier transform infrared spectroscopy* (Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier)

HMF - Hidroximetilfurfural

1 INTRODUÇÃO

A biomassa lignocelulósica, constituída predominantemente pelos polímeros lignina, celulose e hemicelulose, apresenta muitas características que a torna promissora como matéria-prima para a produção de bioetanol e outros produtos químicos de valor agregado [1-6]. A grande disponibilidade, o baixo custo e o potencial energético são os principais fatores que estimulam os estudos com diversos tipos de biomassa, citando-se como exemplo o aguapé, uma planta aquática considerada uma erva daninha invasora em muitas regiões do mundo [3, 7-10].

A obtenção do bioetanol a partir de biomassa lignocelulósica, chamado de etanol celulósico ou de segunda geração, está gerando boas expectativas no sentido de suprir as necessidades energéticas associadas ao uso de combustíveis sustentáveis. Para a produção deste é necessário reduzir a recalcitrância da biomassa em uma etapa de pré-tratamento, prosseguindo-se com a hidrólise enzimática e a fermentação. O pré-tratamento é a etapa mais importante do processo, uma vez que seus efeitos influenciam diretamente o rendimento das outras etapas, o que torna esse o principal desafio na obtenção do etanol celulósico. Tal fato tem intensificado o desenvolvimento de pesquisas que se dedicam a buscar métodos de pré-tratamento mais eficientes, econômicos e com poucos danos ao meio ambiente [11-14].

A literatura apresenta diversas técnicas de pré-tratamento de biomassa lignocelulósica que já foram ou continuam sendo estudadas. Os vários tipos são, comumente, classificados em físicos, químicos, biológicos ou físico-químicos [2, 4, 15, 16]. No caso do pré-tratamento químico, substâncias químicas são usadas para fracionar a biomassa, reduzindo, com isso, sua recalcitrância [15, 17]. O pré-tratamento organosolv é uma subcategoria desta modalidade e se mostra promissor, faz uso de solventes orgânicos para desconstruir a estrutura da lignocelulose [18-20].

O pré-tratamento organosolv, geralmente, proporciona um fracionamento eficiente dos componentes da biomassa, podendo ser aplicado no contexto da biorrefinaria devido à possibilidade de aproveitamento de todas as frações [19-21]. Uma variedade de solventes vêm sendo avaliados, porém a escolha desse

deve levar em consideração a segurança do processo, os impactos ambientais e a viabilidade econômica [18, 19]. Os álcoois de cadeia curta que apresentam baixo ponto de ebulição, como o etanol e o metanol, são muito empregados, a facilidade de recuperação desses é um dos principais aspectos favoráveis. Contudo, os riscos associados à volatilidade e inflamabilidade, por serem operados em alta pressão, restringem o desenvolvimento do processo [20, 22].

Portanto, o aperfeiçoamento do pré-tratamento organosolv poderá ser atingido por meio do uso de um solvente orgânico com alto ponto de ebulição, que possa ser operado a pressão atmosférica tornando o processo mais seguro, devendo apresentar também bons aspectos econômicos e ambientais [18, 20]. Diante disso, o glicerol, um solvente orgânico não tóxico e de alto ponto de ebulição, obtido em grande quantidade como subproduto da fabricação do biodiesel, apresenta potencial como solvente verde para o pré-tratamento de biomassa lignocelulósica, necessitando-se ampliar as pesquisas nesse sentido, de modo a possibilitar que o glicerol bruto possa ser utilizado diretamente [11, 23-26].

A temperatura e a duração de um processo de pré-tratamento são variáveis importantes a serem consideradas. Poucos trabalhos relacionados ao método organosolv com glicerol realizaram o pré-tratamento na região de 100°C [24, 27], a maioria avaliou temperaturas próximas ou superiores a 200 °C [11, 22, 23, 26]. Com relação ao tempo de reação alguns trabalhos avaliaram faixas amplas [11, 23, 28].

Outras variáveis que podem influenciar o pré-tratamento são a razão sólido/líquido e a porcentagem de água, essa última quando se trata do método organosolv com glicerol comercial, tendo em vista que trabalhos [22-24] fazem esse estudo como uma forma de simular a condição do glicerol bruto que, dentre outros, apresenta água em sua composição.

O pré-tratamento, também, é algumas vezes conduzido na presença de catalisadores como NaOH e Na₂CO₃ [29, 30], HCl [24] e H₂SO₄ [31]. Contudo, a corrosividade e a toxicidade associada a esses sistemas impulsiona a busca por catalisadores mais favoráveis. Sais metálicos como KCl, CaCl₂, AlCl₃, FeCl₃,

FeSO_4 , $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ estão sendo avaliados quanto ao melhoramento da digestibilidade enzimática de muitas biomassas [32-35].

Efeitos promissores são principalmente obtidos com o FeCl_3 . Liu et al. [36], ao estudarem o efeito de vários sais metálicos sobre a palha de milho, obtiveram melhor resultado com o FeCl_3 . Romero et al. [37] alcançaram altas recuperações de açúcar no pré-tratamento da palha de colza com soluções aquosas de FeCl_3 . Entretanto, o mecanismo de atuação dos sais metálicos ainda não foi completamente elucidado. Também, não se encontrou na literatura a utilização do pré-tratamento organosolv com glicerol em conjunto com catalisadores a base de ferro e sais metálicos em geral.

1.1 Biomassa Lignocelulósica

O conceito de biomassa é bastante amplo. Segundo a ANEEL (Agência Nacional de Energia Elétrica), biomassa é "todo recurso renovável oriundo de matéria orgânica (de origem animal ou vegetal) que pode ser utilizado na produção de energia" [38, p.77]. Assim, resíduos agrícolas e industriais, bem como matéria orgânica vegetal considerada invasora, como as ervas daninhas, são exemplos de biomassa.

A utilização de biomassa como fonte de energia apresenta vantagens como: grande disponibilidade; baixo custo, ausência de concorrência com a produção de alimentos, quando se trata de resíduos ou ervas daninhas; o fato de ser renovável; e o balanço nulo de emissões de dióxido de carbono, uma vez que, apesar de sua queima liberar CO_2 , esse foi previamente absorvido. Tais características possibilitam que a biomassa seja considerada um combustível verde [1-3].

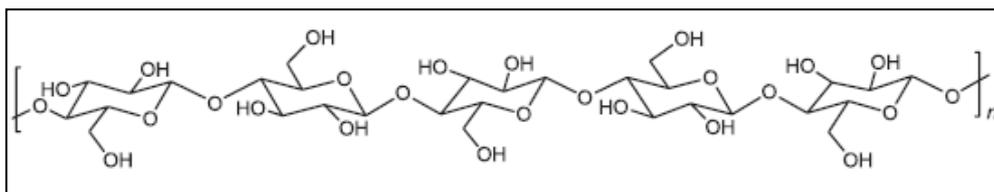
A biomassa lignocelulósica caracteriza-se por apresentar em sua composição predominantemente lignina, celulose e hemicelulose [2, 4-6], sendo considerada um dos recursos, ou até mesmo o recurso biológico renovável mais abundante da terra [2, 39]. Esses três componentes majoritários formam um material compósito complexo, chamado lignocelulose, que compõe a parede

celular da biomassa conferindo-lhe grande resistência e baixa reatividade [2, 4, 7].

A quantidade dos componentes majoritários que constituem a biomassa lignocelulósica varia com o tipo de biomassa, mas geralmente celulose representa 35-50%, hemicelulose 20-35% e lignina 10-25% da biomassa seca, correspondendo no total cerca de 90% da massa seca, o restante compreende uma pequena quantidade de cinzas, proteínas e extrativos [1, 2, 4, 7, 40].

A celulose é um polímero natural, ou seja, uma macromolécula, mais especificamente um polissacarídeo, um carboidrato formado por várias unidades de monossacarídeos. Sua unidade de repetição é unicamente a glicose, sendo, portanto, um homopolímero. Celulose é o polímero de carboidrato mais abundante do mundo [7], seus monômeros estão ligados por ligações β -1,4-glicosídicas que são covalentes e ocorrem pela combinação da hidroxila de um carbono anomérico (carbono ligado ao oxigênio central, carbono 1) com a hidroxila do carbono 4, produzindo água. Sua estrutura, que está representada na Figura 1, é linear e majoritariamente cristalina.

Figura 1: Representação estrutural da celulose.

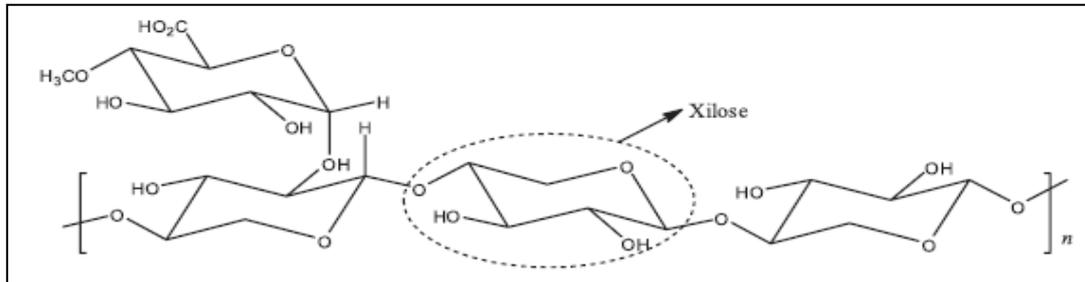


Fonte: Santos et al (2012) [7]

A hemicelulose, ao contrário da celulose, é um heteropolissacarídeo que apresenta em sua composição tanto pentoses (D-xilose e L-arabinose) quanto hexoses (D-glicose, D-manose, D-galactose), além de alguns ácidos [7, 8, 40]. A estrutura da hemicelulose é complexa, bastante ramificada e amorfa. Seu grau de ramificação é variável e interage facilmente com a celulose proporcionando estabilidade e flexibilidade à parede celular dos vegetais. Diferentemente da celulose, devido ao seu caráter amorfo e ramificado, a hemicelulose é hidrolisada com facilidade em seus monossacarídeos constituintes [1, 7], e é o segundo

polímero natural mais abundante do mundo [40, 41]. Uma representação simplificada da sua estrutura pode ser vista na Figura 2.

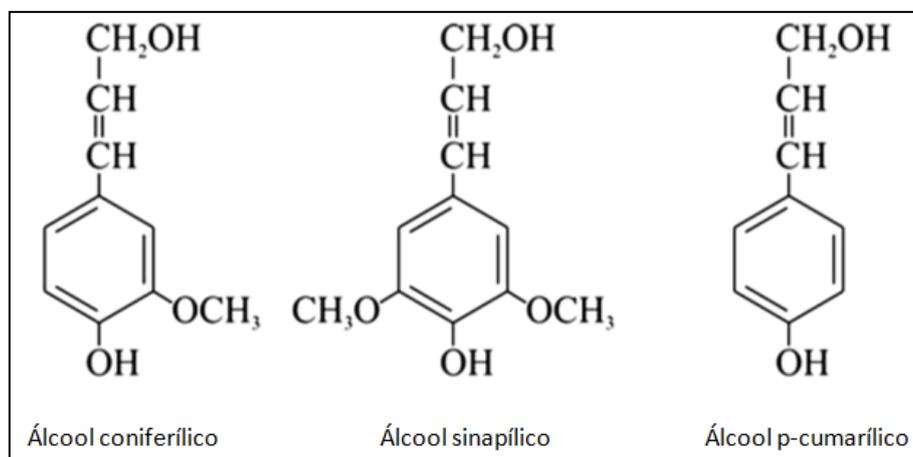
Figura 2: Representação estrutural da hemicelulose.



Fonte: Santos et al (2012) [7]

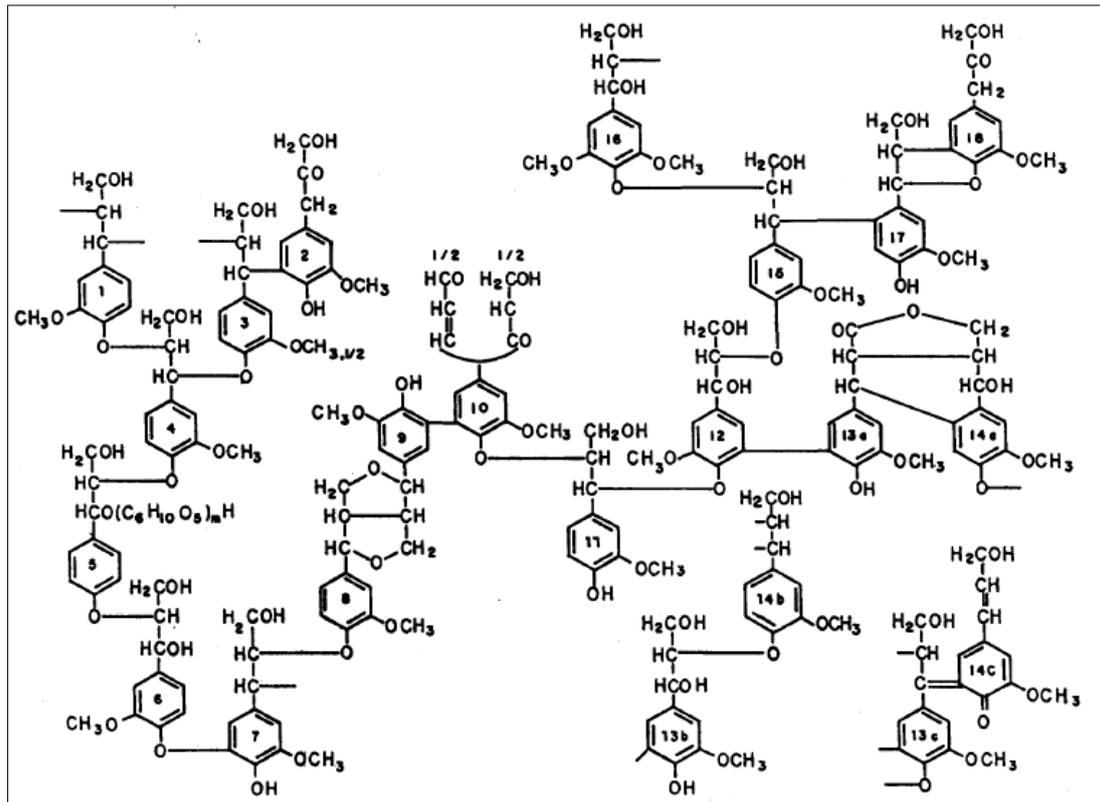
A lignina é um heteropolímero muito complexo, amorfo e ramificado, formado por uma polimerização aleatória de três diferentes unidades monoméricas fenólicas: o álcool p-cumarílico, o álcool coniferílico e o álcool sinapílico (Figura 3). A principal função da lignina é atuar como uma barreira protetora em torno da celulose e hemicelulose, sendo que, sua composição e organização depende da espécie da biomassa lignocelulósica [1, 7, 8, 40]. A Figura 4 ilustra uma representação da estrutura da lignina de madeira mole.

Figura 3: Estrutura das três unidades monoméricas que constituem a lignina.



Fonte: adaptada de Shahzadi et al (2014) [40]

Figura 4: Esquema estrutural proposto para a lignina de *Picea abies* (madeira mole).



Fonte: Piló-Veloso; Nascimento; Morais (1993) [42]

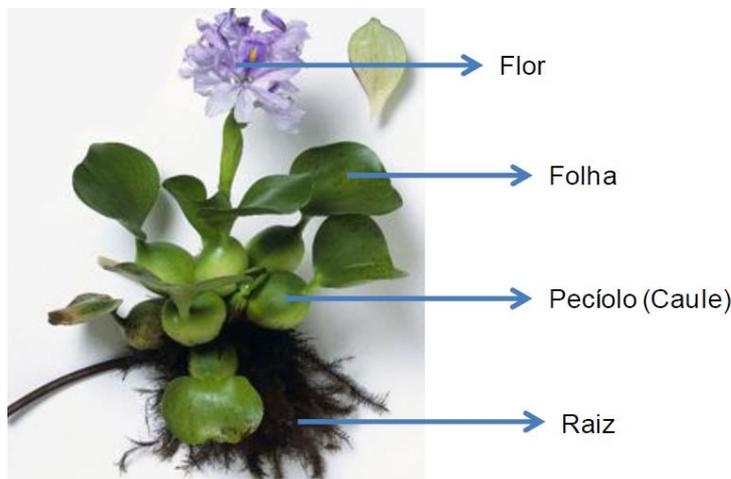
Vários tipos de biomassa lignocelulósica (palha de trigo e arroz, gramíneas; culturas lenhosas) vêm sendo estudadas no sentido de avaliar o potencial energético, a exemplo da produção de bioetanol e outros produtos químicos de valor agregado, bem como a viabilidade econômica do processo [4-7, 11, 40]. Entre as biomassas em estudo pode-se destacar o aguapé (*Eichhornia crassipes*), uma planta aquática encontrada, principalmente, em regiões tropicais e subtropicais [8, 9]. Sendo o bagaço de cana, a palha de milho, e a casca de coco outras biomassas avaliadas.

1.1.1 Aguapé

O aguapé, uma macrófita aquática flutuante da família das *Pontederiaceae*, é originário da bacia do rio Amazonas e se distribuiu por todo o mundo. Uma de suas principais características reside em sua capacidade de absorver poluentes dos ambientes aquáticos, o que lhe confere rápida

proliferação [43]. A Figura 5 ilustra as partes dessa planta que em algumas épocas do ano pode florescer, sendo possível observar o caule cheio de ar, o que permite que a mesma flutue.

Figura 5: Ilustração da planta aquática aguapé mostrando todas as suas partes.



Fonte: Holanda (2010) [44]

Por ter uma taxa de crescimento elevada e difícil de controlar, o aguapé é considerado uma erva daninha invasora em muitas partes do mundo, isso porque a medida que cresce de forma descontrolada reduz os nutrientes e oxigênio dos corpos d'água, o que causa prejuízo à flora e à fauna [3, 9, 12]. Sua taxa de crescimento chega a 220 kg / ha / dia, e sua população dobra a cada 5-15 dias [11, 12, 45]. Com isso, degrada os ecossistemas, obstrui as rotas de navegação e danifica os canais de irrigação e as instalações hidrelétricas [10].

Como solução para os diversos problemas causados pelo aguapé tem-se a sua utilização para a geração de energia, visando substituir os combustíveis fósseis ou pelo menos reduzir o consumo dos mesmos [10]. Sendo uma das biomassas lignocelulósicas avaliadas para a produção do etanol de segunda geração [11, 45]. Seu potencial energético está relacionado ao conteúdo de carboidratos. De acordo com estudos da literatura, utilizando diferentes metodologias, sua composição lignocelulósica é 20-35% de celulose, 22-40% de hemicelulose e 5-21% de lignina [3, 9, 10,12].

1.1.2 *Bagaço de cana*

O bagaço de cana-de-açúcar é um resíduo agroindustrial muito abundante no Brasil, proveniente da indústria sucroalcooleira, responsável pela produção do açúcar e do álcool combustível atualmente comercializado. A grande disponibilidade desse resíduo no país decorre do fato do Brasil possuir destaque mundial na produção de cana-de-açúcar e na exportação de açúcar e etanol [46].

O bagaço de cana é considerado um subproduto da cana-de-açúcar após a extração do caldo que é utilizado para a produção do açúcar e do álcool [47]. Atualmente, o bagaço é queimado nas caldeiras das usinas sucroalcooleiras para suprir as necessidades energéticas das mesmas. Contudo, o bagaço possui composição com alto teor de carboidratos, apresentando grande potencial para a produção do etanol celulósico [23]. Sendo possível ocorrer uma integração entre a produção do etanol de primeira e segunda geração.

A composição do bagaço de cana, determinada por alguns trabalhos que vêm avaliando sua viabilidade para a produção do bioetanol, consiste em: 39-49% de celulose; 22-27% de hemicelulose; e 22-27% de lignina [23, 47-49].

1.1.3 *Palha de milho*

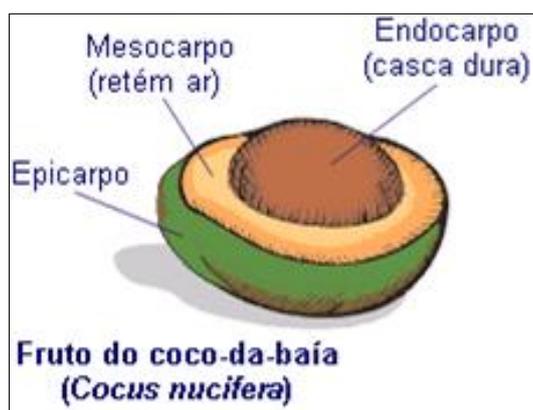
O milho é um importante produto agrícola no Brasil (principalmente para a produção de alimento e ração animal) e em muitas partes do mundo, a exemplo dos Estados Unidos, que se destaca na produção do milho para a geração do etanol combustível. Assim, o seu beneficiamento gera grande quantidade de resíduos, tendo-se em vista que o sabugo e a palha são descartados e muitas vezes subutilizados [50].

A palha de milho, no entanto, mostra-se uma biomassa promissora para a produção do bioetanol, devido a seu teor de carboidratos, abundância e renovabilidade [51]. A composição lignocelulósica da mesma, segundo alguns estudos que avaliaram seu potencial para a produção do etanol celulósico, é: 28-35% de celulose; 15-25% de hemicelulose; e 7-19% de lignina [33, 36, 52].

1.1.4 Casca de coco

O coco verde é um fruto produzido em grande quantidade em muitas partes do mundo (Brasil, Filipinas, Tailândia, Índia, Indonésia). O Brasil destaca-se nesse cenário mundial, sendo o quarto maior produtor [53]. A Figura 6 traz uma ilustração desse fruto, mostrando a denominação de algumas de suas partes.

Figura 6: Ilustração do coco verde.



Fonte: adaptada de http://educabras.com/enem/matéria/biologia/reino_vegetal/aulas/angiopermas [54]

Estima-se que a produção global da indústria de coco verde atinge cerca de 55 milhões de toneladas por ano [55]. Com isso, gera-se uma grande quantidade de resíduos, uma vez que após a extração da parte comestível (água de coco e carne do coco) as cascas, que representam cerca de 80% da massa inicial, são descartadas. Como essas são bem resistentes a degradação, devido à dureza característica associada a presença de lignina, demoram cerca de 8 anos no ambiente. Assim o descarte das mesmas vem se tornando um problema [56-58].

Diante disso, o aproveitamento da casca de coco para a produção de energia é uma excelente solução que poderá, até mesmo, valorizar esse resíduo. Trabalhos disponíveis na literatura mostram que essa biomassa já está sendo avaliada para a produção de bioetanol, devido a sua composição favorável: 26-33% de celulose; 16-29% de hemicelulose; 30-36% de lignina [55, 57, 59].

1.2 Bioetanol

A preocupação com a escassez dos combustíveis fósseis e principalmente com os danos ambientais que o seu uso excessivo causa não é recente, e vem motivando a comunidade científica a desenvolver pesquisas no sentido de buscar meios alternativos. Nesse cenário, a busca pelo desenvolvimento de biocombustíveis tornou-se constante por serem uma alternativa renovável e menos agressiva ao ambiente.

O bioetanol é um biocombustível já bastante utilizado como substituto parcial ou total da gasolina, que apresenta grande relevância mundial por seu relativo baixo custo e menor poder poluente. Sua queima é cerca de 60% menos poluente que a da gasolina, além do fato do CO₂ emitido ser neutro, por ter sido previamente absorvido pela biomassa que o originou [7, 41]. O bioetanol que é chamado de etanol de primeira geração é produzido através da fermentação de açúcares extraídos de produtos vegetais (biomassa), tais como: cana-de-açúcar, milho, beterraba, entre outros [60, 61].

O Brasil, juntamente com os Estados Unidos, se destaca por ser um dos maiores produtores do etanol de primeira geração [41, 60, 61]. A produção do bioetanol a partir da cana-de-açúcar tornou-se uma realidade no cenário comercial brasileiro com a criação, pelo governo, do Programa Nacional do Álcool (PROÁLCOOL), implantado em 1975 [60].

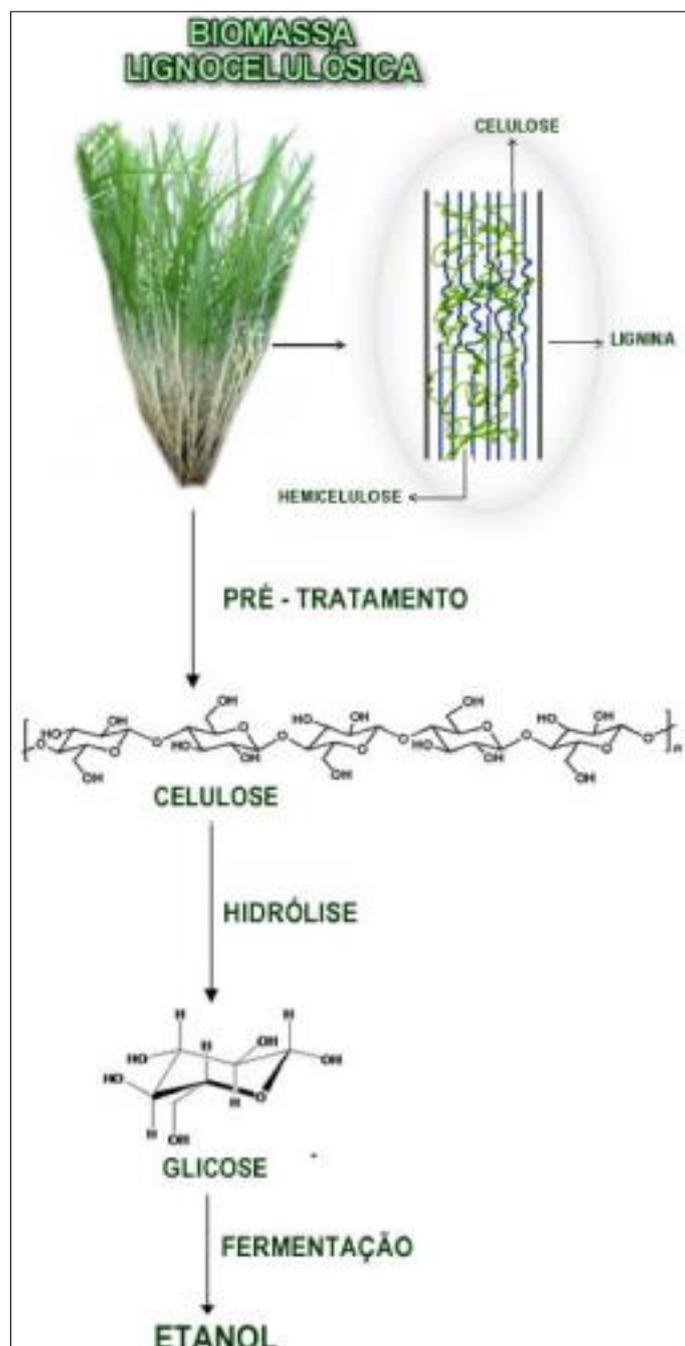
Apesar da produção e comercialização do etanol de primeira geração ser um grande avanço na busca de uma matriz energética sustentável "muito ainda precisa ser feito para aprimorar as cadeias de produção de etanol, visando sempre o aumento de produção e a minimização de impactos negativos ao meio ambiente" [41, p.2]. Um outro problema associado à produção do etanol de primeira geração é a competição entre alimento e combustível, em virtude de ser obtido de fontes alimentícias, principalmente da cana-de-açúcar e do milho, causando barreiras social e econômicas, que se traduzem em preocupação com a segurança alimentar e elevação do preço [4, 11, 62, 63].

Nesse contexto, a obtenção de bioetanol a partir de biomassa lignocelulósica tem ganhado destaque por ser uma fonte de açúcar alternativa, muito abundante, renovável, de baixo custo e não destinada a uso alimentar.

Assim, estudos estão sendo conduzidos no sentido de avaliar o potencial energético dos materiais lignocelulósicos, que na maioria das vezes são considerados residuais ou invasores, como a palha e o bagaço da cana-de-açúcar, resíduos resultantes da produção do etanol de primeira geração, sabugo de milho, pó e restos de madeira, bem como ervas daninhas invasoras [4, 7, 11, 41, 60-63].

Quando o bioetanol é obtido a partir de biomassa lignocelulósica é chamado de etanol de segunda geração ou celulósico. Para sua produção são necessárias algumas etapas que estão ilustradas na Figura 7. A primeira etapa consiste em um pré-tratamento da biomassa visando romper a complexa estrutura formada entre a lignina-hemicelulose-celulose, de modo a tornar a hemicelulose e a celulose disponíveis para a próxima etapa. A segunda etapa é a hidrólise, a qual consiste em quebrar a celulose e a hemicelulose em seus monômeros, açúcares fermentáveis. Na terceira etapa tem-se a fermentação dos açúcares obtidos, produzindo-se o bioetanol que por fim é destilado [11-14].

Figura 7: Ilustração da produção do bioetanol a partir de biomassa lignocelulósica.



Fonte: Santos et al (2012) [7].

O etanol celulósico está gerando boas expectativas no sentido de suprir as necessidades energéticas mundiais associadas ao uso de combustíveis. Entretanto, considerando-se as tecnologias disponíveis, a sua produção ainda não é economicamente viável e apresenta algumas dificuldades. Entre as etapas de produção o pré-tratamento é a mais importante, por influenciar diretamente

no rendimento das outras etapas, sendo o principal entrave na obtenção do etanol celulósico devido aos custos associados. Diante disso, o foco da maioria das pesquisas centra-se em buscar métodos de pré-tratamento mais eficientes, econômicos e com poucos danos ao ambiente [7, 11, 14]. Além disso, uma forma de tornar o processo mais viável é introduzir a ideia de biorrefinaria, de modo a possibilitar a conversão da biomassa em bioetanol e também em produtos químicos de valor agregado, minimizando a geração de resíduos e maximizando os lucros [3, 5].

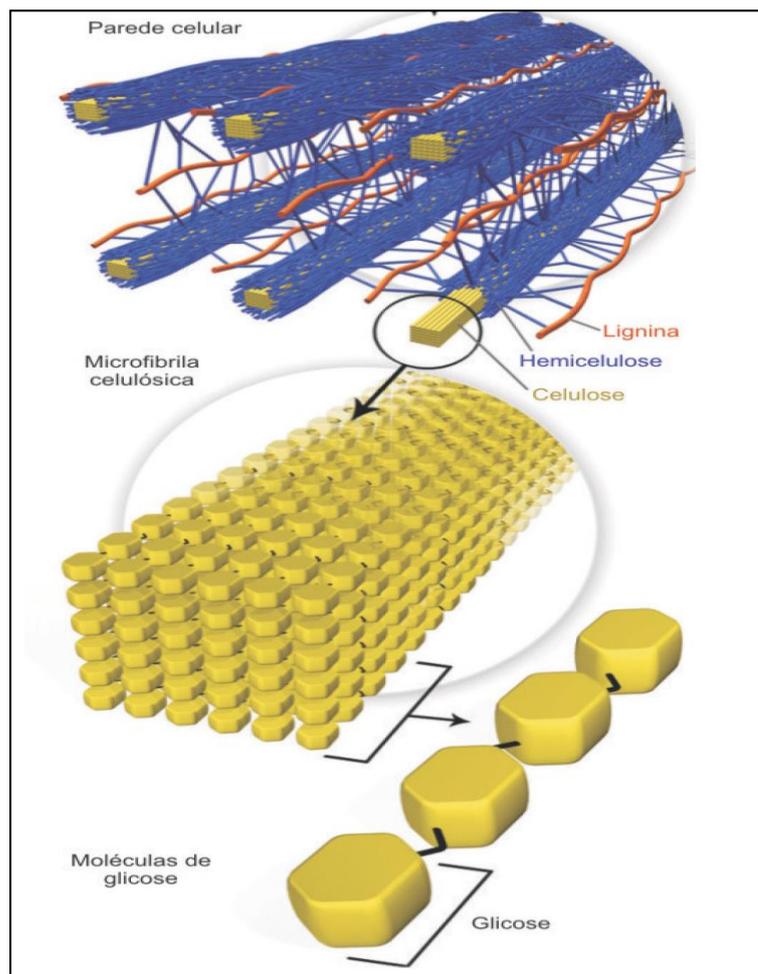
1.3 Etapas Envolvidas na Produção do Etanol Celulósico

1.3.1 Pré-Tratamento

Quando se trata da produção do etanol celulósico uma etapa inicial de pré-tratamento se faz necessária devido às fortes interações existentes entre os três componentes majoritários da biomassa lignocelulósica, força que é comumente chamada de recalcitrância e dificulta a obtenção dos açúcares fermentáveis na etapa de hidrólise por causa do baixo acesso que se tem à hemicelulose e, principalmente, à celulose. De modo que, os rendimentos em açúcares fermentáveis são muito baixos ao se realizar a hidrólise da lignocelulose sem a mesma ter passado previamente por uma etapa de pré-tratamento [3, 5, 7, 16, 61].

O difícil acesso à macromolécula celulose, a fonte mais importante de açúcares redutores, é explicado pela forma como os três principais componentes da biomassa lignocelulósica estão organizados. Na celulose há a presença de ligações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares, estas últimas são responsáveis pela formação da fibra vegetal, formada pelo alinhamento de seis a oito moléculas de celulose, formando uma microfibrila longa e resistente. A hemicelulose, por sua vez, recobre a celulose, o que leva à formação do domínio celulose-hemicelulose, que é envolto pela lignina, como se observa na Figura 8 [7].

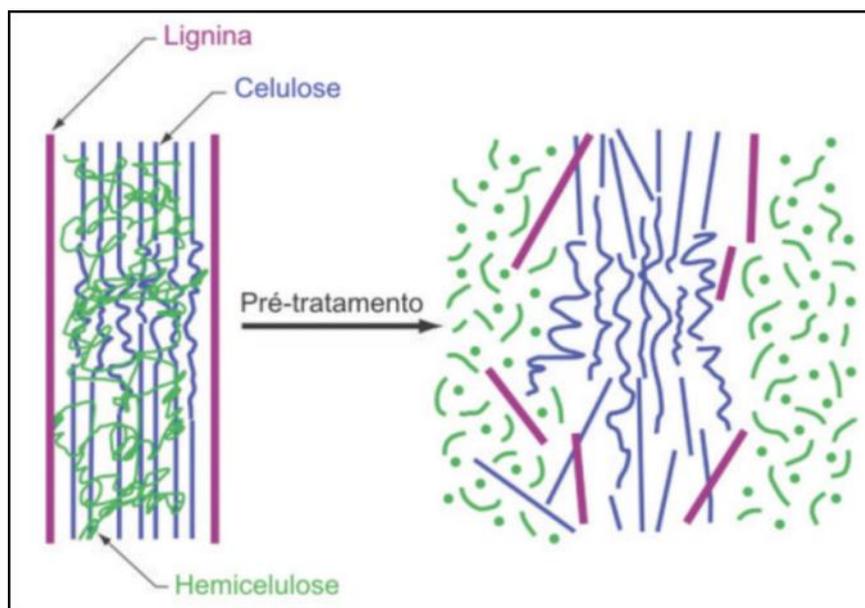
Figura 8: Ilustração da estrutura recalcitrante formada pelos principais componentes da lignocelulose.



Fonte: adaptada de Santos et al (2012) [7].

A importância do pré-tratamento reside no fato dele possibilitar a ruptura da complexa estrutura formada entre a lignina, a celulose e a hemicelulose presentes na parede celular da biomassa lignocelulósica (Figura 9), o que melhora a acessibilidade a seus componentes e permite uma completa exploração dos mesmos, aumentando a valorização desse tipo de biomassa. Assim, o principal objetivo do pré-tratamento é alterar a estrutura da biomassa para que a hidrólise da celulose e da hemicelulose possa ser conseguida de forma rápida e com bons rendimentos, sendo que para isso a lignina deve ser removida [3-5, 16, 17].

Figura 9: Ilustração das alterações estruturais que o pré-tratamento causa na biomassa lignocelulósica.



Fonte: Santos et al (2012) [7].

A etapa de pré-tratamento é considerada a mais desfavorável economicamente, porém a realização da hidrólise sem o pré-tratamento é bem menos favorável [2, 13, 16]. Desta maneira, o pré-tratamento é a etapa mais desafiadora na produção de etanol celulósico por influenciar diretamente às outras etapas do processo, sendo fundamental encontrar uma situação de equilíbrio para os efeitos causados pelo mesmo, porque um pré-tratamento ineficiente resulta em um material pouco hidrolisável e um muito agressivo leva a produção de substâncias tóxicas que inibem a ação dos micro-organismos nas demais etapas [16, 17].

Os efeitos esperados quando se realiza um pré-tratamento são: a redução do grau de cristalinidade da celulose, de modo a aumentar a sua fração amorfa, que é a forma mais adequada para uma hidrólise eficiente; o aumento da área superficial, devido a remoção da lignina e alteração da estrutura; bem como, a diminuição do grau de polimerização [7, 17].

Encontrar uma técnica de pré-tratamento que promova os resultados desejados torna-se ainda mais difícil quando se consideram as características particulares de cada tipo de biomassa, pois pesquisas têm mostrado que os efeitos do pré-tratamento são dependentes das mesmas. Zhu e Pan (2010) [64],

por exemplo, observaram que devido as diferenças existentes nas características químicas e físicas entre a biomassa lenhosa e agrícola, o processo de pré-tratamento muda significativamente.

Diante das questões levantadas acerca do pré-tratamento, a literatura considera que uma técnica eficiente deve: (1) preservar a fração de pentoses, ou seja, a hemicelulose, que devido a sua característica amorfa, menos resistente que a celulose, pode ser convertida em produtos indesejáveis no pré-tratamento; (2) proporcionar alta disponibilidade de celulose na etapa de hidrólise; (3) minimizar o gasto energético; (4) reduzir o custo associado a redução de tamanho das matérias-primas; (5) minimizar os gastos com produtos químicos, reduzindo o seu consumo; (6) evitar a produção de inibidores biológicos; (7) separar a lignina, que pode ser usada como um coproduto valioso; (8) evitar a formação de subprodutos; (9) necessitar de baixo investimento e custo operacional [2, 7, 8, 13, 16].

1.3.2 *Hidrólise*

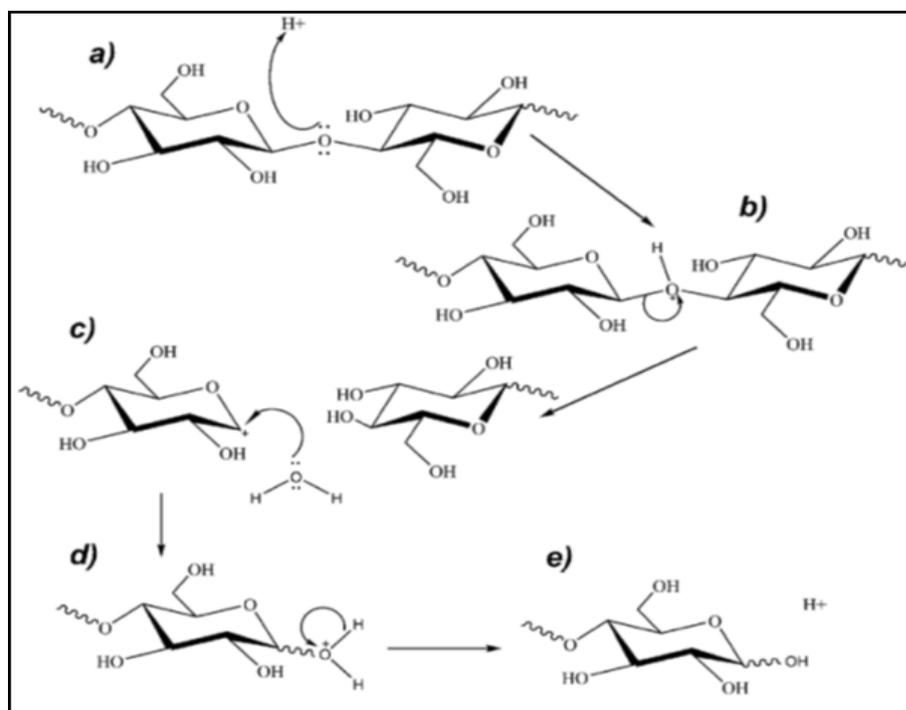
A hidrólise é a etapa seguinte depois do pré-tratamento, na qual a celulose e a hemicelulose, polímeros de carboidratos, são convertidos em açúcares monoméricos [13, 16, 17, 65]. Métodos de hidrólise aplicáveis a material lignocelulósico estão descritos na literatura [16, 61], e uma característica comum a todos é que o material a ser hidrolisado seja mecanicamente reduzido em tamanho, a fim de aumentar a sua área superficial [61].

Os dois métodos de hidrólise mais amplamente divulgados e utilizados são a hidrólise ácida e a hidrólise enzimática [16, 61, 65]. Há também alguns tipos de hidrólise de lignocelulose que não usam nem produtos químicos, nem enzimas, a exemplo da irradiação que utiliza raios gama, feixe de elétrons ou micro-ondas. Contudo, tais métodos hidrolíticos não apresentam importância comercial [16].

Na hidrólise ácida, as etapas de pré-tratamento e hidrólise podem ser realizadas em um único processo [16], além de poder ser conduzida de duas formas diferentes: com ácido concentrado ou ácido diluído [16, 65, 66]. A hidrólise ácida tem início quando o oxigênio glicosídico é protonado (Figura 10)

(a), ocorrendo o rompimento da ligação C₁-O (b), gerando um carbocátion que é estabilizado pela deslocalização eletrônica dos elétrons do átomo de oxigênio do anel glicosídico, adjacente ao carbono 1 (c). No próximo passo do mecanismo proposto, o carbono C₁ sofre um ataque nucleofílico pela molécula de água (d), com posterior regeneração do ácido (e) [61].

Figura 10: Ilustração do mecanismo de hidrólise ácida da molécula de celulose.



Fonte: Ogeda; Petri (2010) [61].

O processo de hidrólise com ácido concentrado é realizado em temperatura branda (em torno de 30°C), mas com um tempo de reação relativamente longo. Se mostra eficiente na conversão em açúcares redutores, tanto da celulose quanto da hemicelulose, proporcionando bons rendimentos de hexoses e pentoses, além de ocasionar baixa degradação. Entretanto, o ácido é utilizado em grande quantidade, apresentando elevado custo, sendo necessária sua reciclagem, o que demanda mais gastos. Além disso, há os fatores associados a toxicidade e a natureza corrosiva do ácido, que requer reatores resistentes à corrosão. Desta forma, esses pontos são entraves que limitam a viabilidade do processo [16, 41, 61, 65].

Na hidrólise com ácido diluído, comumente, usa-se o H_2SO_4 , pelo menor preço e pequenos problemas com corrosão. Nesse processo, a concentração do

ácido é, geralmente, menor que um por cento, sendo preciso utilizar temperaturas elevadas (120 - 230 °C) para alcançar a conversão da celulose em glicose. Porém, nessas condições de temperatura, as pentoses da hemicelulose e, também, em uma menor proporção, as hexoses, são degradadas. Para evitar este problema, a hidrólise com ácido diluído é realizada em dois estágios, em que o primeiro é realizado em condições mais amenas de temperatura, visando maximizar os rendimentos em açúcares redutores provenientes da hemicelulose, evitando a degradação. O segundo estágio é realizado em temperaturas mais altas para proporcionar a conversão da celulose, que possui uma estrutura mais rígida (cristalina). Contudo, o aumento de temperatura requerido pode ocasionar a geração de produtos secundários, havendo também dificuldades no controle do tempo de reação. Sendo que, os principais empecilhos residem no baixo rendimento, custos significativos, e produtos de degradação [16, 41, 61, 65].

A hidrólise enzimática utiliza a ação de enzimas para converter os materiais lignocelulósicos em açúcares redutores e se mostra um processo bastante promissor. Apresenta como vantagens: um elevado rendimento em açúcares fermentáveis, sem que ocorra a formação de subprodutos, devido ao fato das enzimas reagirem em pontos bastante específicos; baixa toxicidade e ausência de problemas com corrosão. É, comumente, realizada em condições suaves de pH e temperatura, sendo, portanto, uma alternativa ambientalmente correta, que apresenta como principal limitação os custos associados à aquisição das enzimas [16, 17, 41, 61, 65, 66].

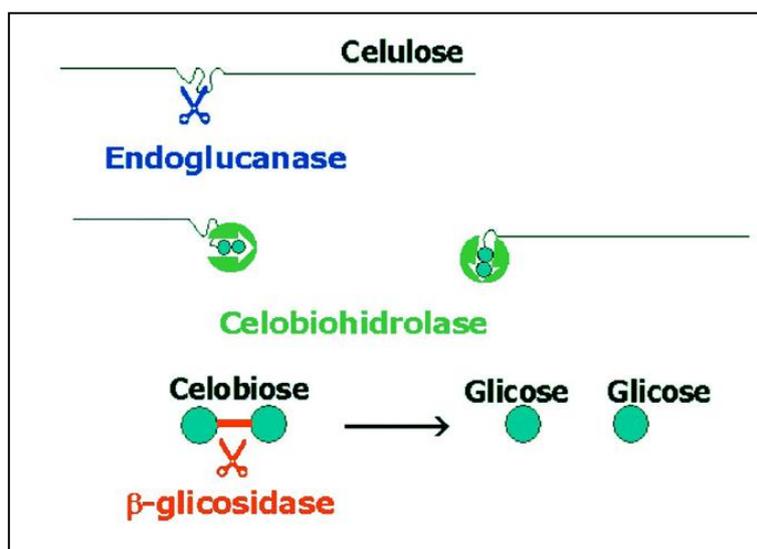
A hidrólise da celulose é geralmente realizada por uma enzima chamada celulase, que é produzida por micro-organismos, como fungos e bactérias. Porém, a hidrólise da hemicelulose requer uma complexa mistura de enzimas hemicelulolíticas, no entanto, nesse último caso, o acesso ao substrato é facilitado, devido a sua estrutura amorfa [16, 17].

A hidrólise enzimática da celulose é afetada por fatores como: a concentração do substrato (celulose); a carga da enzima celulase; a atividade da celulase, as condições reacionais (temperatura, pH, entre outros); e a inibição do produto final. Sendo que, a taxa de hidrólise enzimática, quando se trata da enzima celulase, está relacionada às características da celulose, que incluem a

estrutura molecular, a cristalinidade, a área superficial, o grau de polimerização, bem como o teor de lignina [13, 16, 17].

A celulase é um conjunto de enzimas que atuam de forma sinérgica para hidrolisar a celulose, sendo dividida em três grupos: endo-1,4- β -D-glucanases (endoglucanases); exo-1,4- β -D-glucanases (celobio-hidrolases); e 1,4- β -D-glucosidases. O mecanismo aceito para a hidrólise enzimática da celulose está representado na Figura 11. A primeira ação enzimática é feita pela endoglucanase, que age nas regiões amorfas da celulose quebrando as ligações glicosídicas. No segundo estágio da ação enzimática a celobio-hidrolase atua nos terminais reductores das cadeias de celulose, originando a D-celobiose que é em seguida hidrolisada pela 1,4- β -D-glucosidase (β -glicosidase) em monômeros de D-glicose [16, 61].

Figura 11: Ilustração do mecanismo aceito para a ação enzimática da celulase sobre a celulose.



Fonte: Ogeda; Petri (2010) [61].

1.3.3 Fermentação

A fermentação é a etapa em que ocorre a conversão dos açúcares fermentáveis em etanol pela ação de micro-organismos. Esses açúcares, obtidos a partir da hidrólise da lignocelulose, apresentam em sua composição tanto hexoses quanto pentoses, sendo que, um dos maiores entraves associados a uma fermentação sustentável e econômica consiste em encontrar linhagens

microbianas que possam fermentar a glicose, bem como os outros açúcares presentes (xilose, arabinose, celobiose, galactose e manose), garantindo um alto rendimento em etanol [13, 17, 41, 66].

Outra dificuldade, associada ao processo fermentativo, refere-se a possível presença de compostos secundários gerados no processo de pré-tratamento (hidroximetilfurfural-HMF, furfural, ácido acético), os quais inibem a atividade dos micro-organismos, portanto, caso ocorra a formação de tais compostos, faz-se necessário realizar, antes da fermentação, um processo de destoxificação [62].

O micro-organismo mais conhecido para a produção de etanol a partir de hexoses é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que, contudo, não é capaz de fermentar as pentoses [16, 17, 62, 65]. Para uma produção de etanol promissora em nível comercial, deve-se buscar a utilização de micro-organismos que tenham um conjunto de características ideais, tais como: proporcionar elevados rendimentos em etanol; poder ser aplicado em substratos diversificados; ser capaz de suportar altas concentrações de etanol e também altas temperaturas; e possuir tolerância a presença de inibidores no hidrolisado. Nesse sentido, tem-se feito uso da engenharia genética na busca de micro-organismos melhorados [16, 17].

A fermentação pode ser realizada em um processo separado da hidrólise, chamado de SHF (*Separate Hydrolysis Fermentation*), em que a hidrólise e posterior fermentação são feitas em reatores diferentes, apresentando como vantagens a otimização das temperaturas requeridas para a hidrólise e para a fermentação. Contudo, a principal limitação desse processo em separado é a ação inibitória causada pela celobiose e pela glicose, formadas no processo de hidrólise, frente a enzima celulase, o que ocasiona perdas significativas no rendimento. Embora as perdas possam ser melhoradas pela adição de celulose em grande quantidade, há o problema da elevação dos custos [16, 61, 66, 67].

Uma outra forma de realizar a fermentação é conduzi-la simultaneamente à hidrólise, processo chamado de SSP (*Simultaneous Saccharification and Fermentation*), pois a hidrólise também pode ser chamada de sacarificação. Nesse processo a hidrólise e a fermentação são realizadas em um mesmo

reator, eliminando o problema da inibição enzimática, pois nessa situação a glicose, assim que é formada, é convertida a etanol. Vantagens adicionais associadas a esse processo são as reduções de custos com equipamento, menor formação de produtos indesejáveis e, principalmente, o aumento do rendimento em etanol. Apresenta como desvantagens a necessidade de se encontrar uma condição intermediária de temperatura e pH para as enzimas e micro-organismos presentes no processo [16, 17, 61, 66, 67]. A literatura, também, relata a existência de outros processos que buscam cada vez mais integrar as etapas envolvidas na produção do etanol celulósico [16, 17, 65, 66].

1.4 Técnicas de Pré-Tratamento de Biomassa Lignocelulósica

Muitas técnicas de pré-tratamento de biomassa lignocelulósica são apresentadas na literatura com o objetivo de reduzir a sua recalcitrância. Os vários tipos de pré-tratamento são, comumente, classificados em categorias: físicos, químicos, biológicos e físico-químicos [2, 4, 15, 16]. Porém, a maioria destes métodos ainda não alcançaram uma eficiência adequada, apresentando limitações técnicas ou econômicas quando se tratam de processos em grande escala [16, 65].

O pré-tratamento físico ocasiona alterações na estrutura da biomassa devido à aplicação de uma força mecânica ou pela ação de algum tipo de irradiação (micro-ondas, raios gama, feixe de elétrons, entre outros), além de processos envolvendo extrusão. Os principais efeitos causados por esse são a redução do tamanho de partícula da lignocelulose, aumento da área específica, redução do grau de polimerização e cristalinidade da celulose. Contudo, os efeitos que de fato serão ocasionados dependem das características da biomassa [1, 2, 15].

O pré-tratamento biológico faz uso de micro-organismos com o objetivo de reduzir a recalcitrância da biomassa lignocelulósica. Se mostra um método seguro, com baixo custo energético e necessidade de pouco suporte mecânico, além de não utilizar produtos químicos. Contudo, o baixo rendimento obtido dificulta sua implementação, apresenta também um expressivo custo associado a obtenção dos micro-organismos [1, 17].

No pré-tratamento químico, substâncias químicas são utilizadas para fracionar a estrutura da biomassa lignocelulósica, facilitando o acesso à celulose. Alguns tipos de pré-tratamento, dessa categoria, já vêm sendo avaliados a um certo tempo e alguns são usados industrialmente. Existem várias subcategorias do pré-tratamento químico, sendo que, as mais amplamente divulgadas são: pré-tratamento alcalino; pré-tratamento ácido; pré-tratamento com líquido iônico e pré-tratamento organosolv [1, 2, 15, 17]. É importante ressaltar que os resultados obtidos dependem do produto químico utilizado, sendo fundamental avaliar concentração, temperatura, tempo de reação, tipo de reator e uso de catalisador [2].

1.4.1 Pré-Tratamento Organosolv

O pré-tratamento organosolv faz uso de solventes orgânicos como principal estratégia de desconstrução da biomassa lignocelulósica. Os solventes mais utilizados são os álcoois alifáticos de cadeia curta (metanol e etanol) e, mais recentemente, vem destacando-se o uso de poliálcoois (glicerol, etilenoglicol e trietilenoglicol), sendo também estudados os ácidos orgânicos, acetona, dioxano e fenol [18-20, 68]. A aplicação de solventes orgânicos em processos que utilizam biomassa lignocelulósica foi bastante estudada desde o desenvolvimento das indústrias de celulose e papel, processo conhecido como polpação [18, 19, 23, 69]. Atualmente, a utilização de tais solventes no pré-tratamento da lignocelulose, com o objetivo de aprimorar a sacarificação enzimática, emergiu como uma possibilidade promissora [18, 21, 22, 70].

O aspecto promissor do pré-tratamento organosolv relaciona-se ao fato dele possibilitar o fracionamento eficiente dos componentes da biomassa, tendo características potenciais para ser aplicado no contexto da biorrefinaria, agregando valor ao processo, além de contribuir na redução dos impactos ambientais [19, 20, 21, 69]. A celulose é recuperada na fração sólida com pouca degradação, enquanto grande parte da lignina e hemicelulose encontram-se dissolvidas no solvente orgânico. Com a remoção desses últimos a recalcitrância da biomassa é significativamente reduzida, além de ocorrer um aumento na área superficial e diminuição do grau de polimerização da celulose, fatores que

melhoram os efeitos da hidrólise enzimática sobre a celulose por possibilitar que as enzimas atuem de modo mais efetivo devido à maior acessibilidade [18, 20, 69, 70].

No pré-tratamento organosolv a ação do solvente rompe as ligações de lignina e hemicelulose, transformando-as em fragmentos de pequena massa molar. Tais fragmentos podem ser separados com elevada pureza e apresentam potencial para muitas aplicações industriais. A lignina obtida com alta qualidade possui muitos anéis aromáticos fenólicos podendo ser aplicada na produção de adesivos, graxa, resinas para revestimento, estireno, entre outros, além de poder ser usada para gerar calor e eletricidade por meio da incineração, suprimindo as necessidades energéticas da própria planta industrial [20, 71]. A hemicelulose fracionada pode ser convertida em bioetanol ou em outros produtos de valor agregado como o furfural e o xilitol [72].

O mecanismo do pré-tratamento organosolv envolve a quebra de ligações éter entre lignina e hemicelulose, hidrólise das ligações internas da lignina, hidrólise de ligações glicosídicas na hemicelulose e em menor proporção na celulose, o que depende das condições do processo [20, 69, 72]. E também a depender da severidade do pré-tratamento os oligossacarídeos e monossacarídeos podem se desidratar gerando furfural e hidroximetilfurfural, que podem se degradar, ainda, a ácido levulínico e ácido fórmico [73]. A obtenção desses subprodutos não é desejada por interferirem nos passos de hidrólise e fermentação, mas, se forem adequadamente separados apresentam aplicações diversas [69, 71]. Contudo, as condições comumente usadas no pré-tratamento organosolv minimizam a formação desses [73].

A compreensão dos efeitos do solvente sobre a biomassa em um aspecto microscópico ainda é limitada. Entretanto, em um aspecto macroscópico a viscosidade e o tamanho da molécula se mostram importantes pela necessidade de penetração do solvente na biomassa, o que vem a facilitar a desconstrução [18]. Uma variedade de solventes orgânicos, algumas vezes na presença de um catalisador, vem sendo estudados no pré-tratamento organosolv. Porém, uma série de características devem ser levadas em consideração para que se tenha um processo seguro e viável, tanto ambientalmente, quanto economicamente. Aspectos importantes são o custo do solvente, a facilidade de recuperação,

relacionada com seu ponto de ebulição, miscibilidade e particionamento, além da toxicidade, da inflamabilidade e da pressão de vapor [18, 19].

Os álcoois de cadeia curta que apresentam baixo ponto de ebulição, como o etanol e o metanol, são os solventes mais empregados no pré-tratamento organosolv. O baixo custo relativo, o fato de alguns poderem ser obtidos de fontes renováveis e também serem facilmente recuperados e reutilizados, tornam a aplicação dos mesmos sustentável. Contudo, os riscos relacionados à volatilidade e inflamabilidade de tais solventes, que são operados a alta pressão em razão do baixo ponto de ebulição, restringe o desenvolvimento do processo. Diante disso, a utilização de um solvente orgânico com ponto de ebulição elevado que pode ser operado à pressão atmosférica com baixo investimento em equipamentos, mostrando-se seguro e apresentando, além disso, bons aspectos econômicos e ambientais, facilitará o aperfeiçoamento e aplicação do pré-tratamento organosolv [18-20, 22, 74].

1.4.1.1 Glicerol

O glicerol, um tri-álcool (1,2,3-propanotriol), também chamado de glicerina quando comercializado em solução aquosa [75], é um solvente orgânico viscoso, não tóxico, que apresenta alto ponto de ebulição (290 °C), sendo o principal subproduto gerado na produção do biodiesel, representando cerca de 10% da produção total [18, 24, 70]. A expansão da produção do biodiesel nos últimos anos no Brasil, Europa e Estados Unidos, aumentou grandemente a obtenção desse subproduto, o que acarretou numa redução de seu valor de mercado, podendo, além disso, afetar a sustentabilidade das indústrias de biodiesel, uma vez que, a quantidade excessiva de glicerol bruto advindo das mesmas pode se tornar um problema econômico e ambiental grave. Diante disso, é preciso buscar aplicações viáveis para esse subproduto, possibilitando a contínua ascensão da produção do biodiesel [11, 19, 22, 23, 74, 76].

Apesar do glicerol de elevada pureza (> 99,0 %) ter uma vasta utilização no setor alimentício, de cosméticos e de fármacos, purificar o glicerol bruto proveniente da produção do biodiesel é dispendioso e apresenta desafios técnicos [19, 25, 77]. Portanto, uma alternativa promissora é encontrar uma aplicação direta, ou que exija um tratamento menos sofisticado. O glicerol pode

ser aplicado na produção de 1,3-propanodiol, etanol, 2,3-butanodiol e ácido acético [25]. Outras aplicações, interessantes e recentes, para o glicerol consistem em seu uso como um solvente verde em reações orgânicas [48] e no pré-tratamento de biomassa lignocelulósica, melhorando os resultados da hidrólise enzimática na produção do bioetanol [11, 22, 25, 26].

O pré-tratamento organosolv com o uso do glicerol bruto, ou pouco processado, da indústria do biodiesel se mostra atraente devido: ao baixo custo do solvente, por ser um subproduto residual que sofreu desvalorização no mercado; ao fato do pré-tratamento poder ser conduzido à pressão atmosférica, pois o glicerol possui alto ponto de ebulição, o que reduz gastos energéticos e com equipamentos sofisticados; e a sua estrutura altamente polar que aprimora a deslignificação, penetrando facilmente na biomassa [68, 23, 76]. Assim, o uso do glicerol bruto no pré-tratamento de lignocelulose tem potencial para ocasionar sucesso comercial ao bioetanol celulósico e aprimorar a valorização da indústria do biodiesel [11].

A importância de se buscar uma aplicação viável para o glicerol bruto fica ainda mais evidente no cenário brasileiro quando se observa o crescente incentivo do governo para a incorporação do biodiesel em nossa matriz energética. Realidade que teve início em 2008 com a obrigatoriedade de se adicionar o biodiesel ao diesel proveniente do petróleo. No ano de 2014 a adição de 7% de biodiesel ao diesel fóssil passou a ser obrigatória em todo território nacional, sendo promulgada em 2016 a lei 13.263, que estabeleceu um contínuo aumento na quantidade de biodiesel adicionada ao diesel [48]. Contudo, estudos envolvendo a aplicação do glicerol bruto no pré-tratamento organosolv da biomassa lignocelulósica ainda são escassos na literatura [11], o mais comum é a utilização do glicerol adquirido comercialmente [23, 24, 26, 68, 70, 77, 78]. Tais fatos fazem a utilização do glicerol bruto um campo de investigação em expansão, com a necessidade de aprimoramento de muitos aspectos do processo.

1.5 Técnicas de Determinação de Açúcares Redutores

Os açúcares redutores são substâncias pertencentes ao grupo dos carboidratos, biomoléculas mais abundantes do planeta que apresentam grande importância devido as suas funções energética e estrutural, sendo comumente chamados de açúcar devido ao sabor adocicado apresentado por muitos. Os carboidratos são formados por moléculas de poliidroxialdeído (aldose) e/ou poliidroxicetona (cetose) em diferentes quantidades e arranjos, sendo divididos em três classes principais: monossacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos [79, 80].

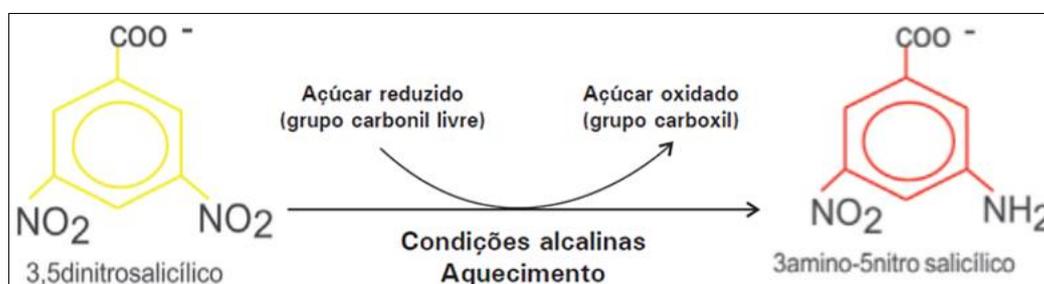
Todos os monossacarídeos são classificados como açúcar redutor, uma vez que, como são formados por apenas uma molécula de aldose ou cetose, o grupo carbonila ($C=O$) está disponível para ser oxidado, sendo, por isso, chamados de açúcares redutores, por promoverem a redução de outras espécies com as quais entram em contato. Há, no entanto, carboidratos em que os grupos carbonila não podem sofrer oxidação porque estão envolvidos em ligações glicosídicas, sendo chamados de açúcares não redutores, como o caso da sacarose, um dissacarídeo formado por uma molécula de glicose e uma de frutose [79-82].

Determinar tanto quantitativamente quanto qualitativamente os açúcares redutores provenientes da biomassa lignocelulósica processada é de fundamental importância para o entendimento do que ocorreu no processo. Entre os métodos usados para determinação pode-se citar: Somogyi-Nelson; ácido 3,5-dinitrosalicílico (ambos espectrofotométricos); e Lane-Eynon (titulométrico). O princípio utilizado nesses métodos para quantificar os açúcares redutores totais é a oxidação/redução. São métodos não seletivos, os quais não diferenciam os tipos de açúcar. O método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) é bastante usado. Os métodos cromatográficos são também utilizados na determinação não só de açúcares redutores, mas de açúcares em geral, sendo seletivos e capazes de determiná-los de modo qualitativo e quantitativo [81-86].

1.5.1 Método do Ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS)

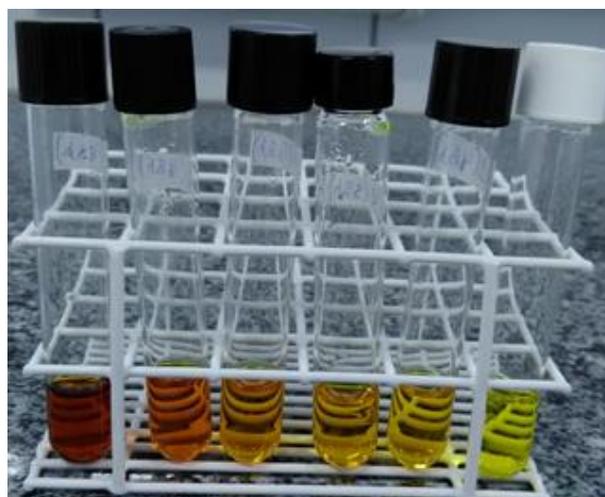
O método DNS tem como fundamento uma reação de oxidação/redução entre os açúcares redutores e o ácido 3,5-dinitrosalicílico, que ocorre sob aquecimento em meio alcalino, sendo o DNS (cor amarela) reduzido a 3-amino-5-nitrosalicílico (cor avermelhada) e o grupo carbonila (C=O) dos açúcares oxidado a carboxila (COOH), como mostra a Figura 12. Como o ácido 3-amino-5-nitrosalicílico formado na reação absorve radiação luminosa na região do visível (540 nm) é possível relacionar, usando uma curva padrão, a medida colorimétrica (absorbância) com a quantidade de açúcares redutores totais, de modo que quanto mais vermelha for a solução resultante maior a quantidade de açúcares redutores (Figura 13) [83, 84, 87, 88].

Figura 12: Ilustração da reação que ocorre no método DNS.



Fonte: adaptada das referências 88 e 89.

Figura 13: Ilustração da mudança de cor ocorrida com o método DNS à medida que a quantidade de açúcar aumenta.



← Quantidade de açúcar crescente

Fonte: produção própria.

Esse método foi primeiramente desenvolvido por Sumner, em 1921, para avaliar a presença de açúcares redutores em urina, sendo aperfeiçoado pelo mesmo pesquisador em 1924 e em 1925, onde foram acrescentados os reagentes fenol e bissulfito de sódio [90-92]. Em 1955 o método DNS foi usado por Bernfeld com algumas alterações, a principal foi a retirada do fenol e do bissulfito de sódio [93]. Em 1959, Miller apresentou um estudo sobre a determinação de açúcares redutores por esse método, propondo otimizações no de Sumner (1925), mantendo os reagentes fenol e bissulfito de sódio [94].

A partir desses trabalhos pioneiros o método DNS passou a ser usado intensamente, sendo a metodologia de Miller (1959) a mais citada [11, 12, 45, 95]. Adaptações surgiram ao longo do tempo, principalmente com relação à quantidade usada do reagente (solução DNS), em virtude dos gastos e grande geração de resíduos tóxicos. Assim, as principais modificações feitas são no sentido de minimizar a produção de resíduos, sendo a eliminação do uso de fenol e bissulfito de sódio outro fator preponderante [81, 83, 87, 88].

1.5.2 Métodos Cromatográficos

Os métodos cromatográficos são uma excelente opção para avaliar a composição em açúcares de produtos e processos, devido à boa sensibilidade, precisão e seletividade. A literatura apresenta muitos métodos cromatográficos para a determinação de variados tipos de carboidratos, principalmente por meio da cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE ou HPLC [96-104].

Boa parte dos métodos usam como fase estacionária colunas de sílica com grupos funcionais amino e como fase móvel acetonitrila/água, sendo a detecção feita por índice de refração (IR) e evaporação com espalhamento de luz (ELSD), havendo também o uso do espectrômetro de massas (MS) e do detector de aerossol carregado (CAD) [85, 95, 100, 105-111]. Não se utiliza detectores como o ultravioleta/visível (UV/Vis) e o de fluorescência, porque os açúcares não respondem significativamente nessas regiões, a não ser que passem por processos de derivação, porém a determinação direta é menos trabalhosa, sujeita a menores fontes de erro e sem custo adicional [107, 112, 113].

Quando se trata de processos envolvendo biomassa lignocelulósica, em que os açúcares redutores a serem determinados (xilose, arabinose, glicose, manose e galactose) são, em alguns casos, isômeros, a separação por meio de colunas comumente empregadas para a determinação de outros grupos de carboidratos é pouco relatada. Como exemplo tem-se o trabalho de Ricochon et al., 2011, que apresentou resolução inadequada para alguns picos [114]. Um trabalho que conseguiu uma boa separação destes açúcares com uma coluna funcionalizada com grupos amida foi o de Yan et al., 2016 [115]. Observa-se que no caso particular dos açúcares redutores derivados da lignocelulose o tipo da fase estacionária, amplamente utilizada, baseia-se em mecanismos de troca-iônica, e as fases móveis mais empregadas são água ultrapura ou solução aquosa de ácido sulfúrico 5 mmol.L⁻¹ [5, 8, 10, 14, 116-118].

1.6 Planejamento Experimental

O planejamento de experimentos consiste em uma valiosa ferramenta que facilita a otimização de produtos e processos, fornecendo informações confiáveis quando fundamentado na teoria estatística [119]. “A atividade estatística mais importante não é a análise de dados, e sim o planejamento dos experimentos em que esses dados devem ser obtidos” [120, p.17], uma vez que, quando os experimentos são realizados de forma inapropriada nem mesmo a técnica estatística mais sofisticada conseguirá extrair conclusões relevantes [119, 120].

Geralmente, quando se deseja desenvolver ou melhorar produtos e processos é preciso avaliar um número considerável de variáveis, de modo a conhecer a influência que exercem sobre os resultados. Comumente, os experimentos são realizados alterando uma variável por vez, permanecendo as demais constantes. Essa prática, contudo, mostra-se insuficiente na aquisição de um conhecimento aprofundado sobre os efeitos das diversas variáveis, uma vez que, não leva em consideração a interação entre as mesmas, nem sempre se atingindo a condição ideal [119-122].

Diante disso, uma maneira eficaz de estudar a influência das variáveis sobre um dado sistema é por meio do planejamento estatístico dos experimentos que possibilita variar todas ao mesmo tempo [120]. “A razão para isso é que as

variáveis podem se influenciar mutuamente, e o valor ideal para uma delas pode depender do valor da outra” (120, p.14), comportamento que é chamado de interação. Além disso, por meio de um planejamento arquitetado nos princípios estatísticos é possível obter não somente a condição ótima, mas, também, a faixa ótima em que o sistema poderá ser ajustado sem grande impacto ao resultado desejado [119].

Desta forma, um planejamento experimental possibilita quantificar o efeito que cada variável causa ao sistema, chamado de efeito principal, bem como, os efeitos causados pelas interações, verificando se são sinérgicos ou antagônicos. Com isso, a utilização de um planejamento experimental melhora a qualidade da informação obtida, possibilitando, muitas vezes, reduzir o número de experimentos e/ou repetições, mantendo a capacidade de calcular e avaliar o erro experimental [119, 123-125].

O tipo de planejamento mais difundido é o fatorial [126-132], onde k fatores podem estar envolvidos e são avaliados em diferentes níveis (valores ou versões) previamente determinados pelo pesquisador. Os fatores são as variáveis selecionadas para o estudo, sendo chamadas de variáveis independentes ou preditoras, as quais podem ser qualitativas (ex.: tipo de catalisador) ou quantitativas (ex.: quantidade de catalisador). A resposta obtida é chamada de variável dependente [119, 120, 133].

Um planejamento ou delineamento experimental fatorial é representado por N^k , onde k é o número de fatores em estudo e N corresponde ao número de níveis em que os fatores serão avaliados. Para que o efeito de um fator possa ser identificado é preciso fazê-lo variar, o que implica na realização de experimentos em pelo menos dois níveis. Um experimento com k fatores sendo estudados em dois níveis necessitará da realização de $2 \times 2 \times 2 \dots = 2^k$ ensaios diferentes. Planejamentos com dois níveis são os mais simples e viáveis, pois como o número de ensaios cresce exponencialmente, torna-se praticamente inviável a realização de delineamentos completos para 6 ou mais fatores com 2 níveis e para 4 ou mais fatores com 3 níveis [119, 120, 122, 133].

Em delineamentos com dois níveis é comum identificar (codificar) o nível inferior com um sinal negativo (-1) e o superior com um sinal positivo (+1), como

mostra a Tabela 1. Essa atribuição também é feita aos níveis dos fatores qualitativos, que pode ser feita de forma arbitrária pelo experimentador, uma vez que não afetará as conclusões. Todas as combinações possíveis entre os níveis e fatores podem ser facilmente identificadas com a construção de uma matriz de planejamento, onde os ensaios são listados na chamada ordem padrão (Tabela 2). Nela, todas as colunas iniciam com nível (-) e os sinais vão se alternando ao longo das colunas. A primeira coluna sempre um a um, $-++...$, na segunda alteram-se dois a dois, $--++...$, no caso de três fatores, na terceira coluna os quatro primeiros sinais são negativos e os quatro últimos são positivos. Para quatro fatores a quarta coluna possui oito sinais negativos e em seguida oito sinais positivos, totalizando $16 \text{ ensaios} = 2^4$ [113, 120, 133].

Tabela 1: Níveis superior e inferior de um planejamento fatorial com dois fatores.

Fatores	Níveis	
	-1	+1
A	10	50
B	30	80

Tabela 2: Matriz de planejamento para um fatorial 2^2 .

Ensaio	A	B
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1

Para que se possa estimar o erro experimental e, assim, poder fazer inferências sobre a resposta por meio da estatística é preciso que os ensaios sejam realizados em duplicata, uma vez que, quando os experimentos não são replicados consegue-se apenas fazer uma descrição dos resultados. Além disso, é fundamental para uma avaliação correta da variabilidade total do processo que as repetições sejam autênticas, ou seja, realizar todas as etapas do procedimento pela segunda vez. Outro ponto importante é sempre ter o cuidado de realizar os experimentos em ordem aleatória, evitando a ocorrência de erros atípicos que causaram distorções estatísticas [119, 120, 133].

Contudo, quando se tem um número considerável de ensaios torna-se complicado realizar a duplicata de todos. Uma estratégia é a adição de pontos

centrais, que corresponde a um valor central entre os níveis inferior e superior de um fator, e são representados por 0. Geralmente, adiciona-se à matriz de planejamento três ou quatro réplicas nas condições centrais, o que possibilita, mesmo que de forma aproximada, a realização de inferências estatísticas [119].

No caso de planejamentos fatoriais completos onde todas as combinações possíveis entre níveis e fatores são realizadas, o número de ensaios cresce bastante quando se precisa avaliar muitas variáveis, podendo inviabilizar o estudo. Uma solução é fazer o estudo inicial das variáveis por meio de um fatorial fracionado, onde, no caso de uma meia fração, metade dos ensaios de um fatorial completo são realizados ($1/2 2^k = 2^{-1} 2^k = 2^{k-1}$). Estratégia muito útil em uma investigação preliminar das variáveis, onde há pouco conhecimento sobre o comportamento das mesmas. A partir dos resultados avalia-se a necessidade da realização de outros delineamentos com menos variáveis, ou se estes já são promissores [119, 120, 133].

Após o planejamento e realização dos experimentos parte-se para o cálculo dos efeitos, os quais, podem ser facilmente calculados por meio de softwares estatísticos, como o *Statistica*. O efeito principal de um fator é entendido como a variação causada na resposta quando o seu nível é alterado, independentemente dos demais fatores, ou seja, é a diferença entre a resposta média no nível superior e a resposta média no nível inferior ($\bar{y}_+ - \bar{y}_-$). O efeito negativo indica que a passagem do nível inferior para o superior causou uma diminuição na resposta [119, 120, 133].

Depois de calcular o efeito principal de cada fator é preciso verificar a ocorrência de interação, isto é, se o efeito de uma variável depende do nível de outra. O efeito de interação é entendido como a variação causada na resposta quando se faz variar os níveis de um dos fatores em cada nível do outro. Havendo interação os efeitos dos fatores devem ser interpretados em conjunto. Entretanto, é preciso avaliar por meio de testes estatísticos se a interação, bem como, os efeitos principais, são significativos a um nível de significância pré-estabelecido [119, 120].

Com o aumento do número de fatores a quantidade de efeitos de interação cresce consideravelmente, porém, de maneira geral, a importância de

uma interação diminui com o aumento do número de fatores envolvidos [120]. Assim, “os efeitos principais tendem a ser maiores que as interações de dois fatores, que por sua vez são mais importantes que as interações de três fatores, e assim por diante” [120, p.101].

O fato de os efeitos de interação de ordem mais alta serem, em geral, desprovidos de significância reforça a importância do uso de fatoriais fracionados para o estudo de muitas variáveis, pois as diversas interações envolvidas são, quase sempre, desprezíveis, não sendo necessário realizar um planejamento completo para determiná-las. Além disso, quando o número de variáveis cresce é bem provável que uma ou mais não sejam significativas para a resposta. Para se construir uma matriz de planejamento no caso de um fatorial fracionário, por exemplo 2^{5-1} , constrói-se uma matriz referente a um planejamento 2^4 completo para os fatores 1, 2, 3 e 4, sendo que para o fator 5 constrói-se uma coluna cujos sinais correspondem ao produto das colunas 1, 2, 3 e 4 [119, 120].

A redução do número de ensaios em um fatorial fracionário traz como consequência o confundimento (associação) entre alguns efeitos. No caso do fatorial 2^{5-1} , entre os confundimentos existentes, pode-se citar o efeito principal do fator 5 que se confunde com o efeito de interação entre os fatores 1, 2, 3 e 4, pois seus contrastes são idênticos, ou seja, são determinados pelos mesmos sinais. Assim, quando se calcula o valor desses efeitos os resultados são idênticos, o que ocorre é uma estimativa da soma dos dois efeitos. Porém, como já discutido, os efeitos de ordem mais alta tendem a ser desprezíveis, desse modo, conclui-se que o efeito I_{1234} tende a zero e o valor calculado corresponde ao efeito I_5 [119, 120, 133].

A confiabilidade nesse tipo de estimativa cresce com a resolução do fatorial fracionário. Resolução de um fatorial corresponde a quantidade de fatores presentes em sua relação geradora, em um planejamento 2^{5-1} a coluna relacionada ao quinto fator é construída a partir da relação $5=1234$, onde $I=12345$, apresentando resolução V. Um fatorial fracionário de resolução III apresenta pouca utilidade, uma vez que, seus efeitos principais estão associados com as interações de primeira ordem (interação de dois fatores) e essas últimas estão associadas entre si. Em um fatorial de resolução IV os efeitos principais não se confundem com as interações de primeira ordem,

estando as últimas associadas. Enquanto o fatorial de resolução V é o que possibilita a melhor interpretação dos resultados, pois os efeitos principais estão associados apenas com interações de quatro fatores que são consideradas desprezíveis, e as interações de dois fatores se confundem somente com as de três que apresenta pouca significância [119, 120].

Como já comentado, o uso de planejamentos experimentais tem como vantagem não somente o cálculo dos efeitos principal e de interação, mas também a obtenção de inferências estatísticas sobre as respostas quando se realiza pelo menos três repetições no ponto central, sendo possível elaborar modelos para a obtenção de superfície de respostas, com os quais pode-se fazer previsões dos resultados. Para a construção de modelos é comum considerar, inicialmente, que as variáveis em estudo se ajustam a um modelo linear que descreve o relacionamento funcional entre a variável dependente y e as variáveis independentes X , $y = f(X)$, e depois verifica-se se o ajuste linear é de fato adequado [119, 120].

Quando se trata de uma lei matemática, uma função linear caracterizada pela equação da reta $y = \beta_0 + \beta_1x$ não apresenta erros, de modo que todos os pares de pontos $(x_i; y_i)$ estão exatamente sobre a reta que descreve a relação funcional entre x e y . Os dois parâmetros dessa reta são: β_0 , a constante, região onde a reta corta o eixo y ; e β_1 , a inclinação. Já na estatística tem-se vários pontos dispersos e precisa-se encontrar a melhor função, a princípio linear, para descreve-los, ou seja, é necessário o ajuste de uma reta que passe o mais próximo possível de todos os pontos. Assim, a melhor reta será a que apresentar os menores erros, uma vez que, qualquer reta escolhida deixará resíduos em relação a pelo menos alguns pontos. A dimensão dos erros está relacionada ao grau de relacionamento linear dado pelo coeficiente de correlação linear (r) entre as variáveis x e y . Desse modo, os modelos estatísticos, obrigatoriamente, devem acrescentar a ideia de erro de ajustamento, o que resulta no modelo: $y = \beta_0 + \beta_1x + e_i$ [119, 120].

Para a construção de um modelo os parâmetros da equação da reta precisam ser estimados, o que é feito por meio do método dos mínimos quadrados, esse determina a reta que apresenta a menor soma de quadrados dos erros. Os parâmetros podem ser obtidos com os valores originais ou

codificados da variável x , contudo, a codificação simplifica os cálculos. Para um planejamento experimental com duas variáveis pode-se tentar ajustar o seguinte modelo linear: $y_i = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{12} x_1 x_2 + e_i$, onde x_1 e x_2 são as variáveis e β_0 , β_1 , β_2 e β_{12} são os parâmetros do modelo. Sendo, y_i a resposta observada experimentalmente e \hat{y}_i a resposta prevista pela reta de regressão, tem-se: $e_i = y_i - \hat{y}_i$, de modo que o modelo ajustado fica: $\hat{y}_i = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{12} x_1 x_2$ [119, 120].

Através do modelo ajustado pode-se estimar valores para a resposta (y) atribuindo as variáveis (x) valores pertencentes ao intervalo utilizado no experimento. Verifica-se se o ajuste linear é adequado através de uma análise de variância (ANOVA) obtida por meio de somas de quadrados de acordo com o Teorema de Pitágoras, para isso parte-se da seguinte soma: $\sum y_i^2 = \sum \hat{y}_i^2 + \sum \hat{e}_i^2$, essa pode ser entendida como: $SQ_{Total} = SQ_{Parâmetros} + SQ_{Resíduos}$. Sendo SQ_{Total} a soma de quadrados devida à variação total, $SQ_{Parâmetros}$ (SQ_{Par}) a soma de quadrados devida aos parâmetros considerados no modelo (β_0, β_1, \dots), e $SQ_{Resíduos}$ a soma de quadrados devida aos erros de ajustamento [119].

Considerando-se um modelo simples do tipo $\hat{y}_i = \beta_0 + \beta_1 x_i$ e substituindo esse na soma anterior tem-se: $y_i = \beta_0 + \beta_1 x_i + e_i$, elevando-se ao quadrado chega-se à conclusão que: $SQ_{Total} = SQ_{Constante} + SQ_{Regressão Linear} + SQ_{Resíduo}$. Simplificadamente, escreve-se: $SQT = C + SQ_{RL} + SQ_{Res}$, comumente utiliza-se a SQ_{Total} que foi corrigida pela $SQ_{Constante}$ ao passar essa para o lado esquerdo da igualdade. Assim, $SQT_c = SQ_{RL} + SQ_{Res}$. As somas de quadrados para fins práticos podem ser calculadas como a seguir [119, 120]:

$$SQT_c = \sum (y_{ij} - \bar{y})^2$$

$$SQ_{RL} = \sum (\hat{y}_{ij} - \bar{y})^2$$

$$SQ_{Res} = \sum (y_{ij} - \hat{y})^2 \quad \text{ou} \quad SQ_{Res} = SQT_c - SQ_{RL}$$

Para a aplicação de testes de hipótese é necessário usar o quadrado médio (QM), esse corresponde a soma de quadrados dividida por seus

respectivos graus de liberdade, que indicam quantos valores independentes envolvendo as n observações são necessários para determinar a mesma. Em geral, o número de graus de liberdade da SQRes é o número de observações (experimentos) menos o número de parâmetros estimados, $v_r = (n - p)$, para a SQRL corresponde ao número de parâmetros menos um, $v_R = (p - 1)$, sendo que para a SQTc tem-se: $v_T = v_R + v_r$ [119, 120].

As somas de quadrados são compatíveis com a distribuição F de Snedecor com os graus de liberdade referente as mesmas. Pode-se então elaborar um teste de hipótese F para verificar, por exemplo, a ausência de regressão linear no modelo ajustado, caso não haja regressão a reta é paralela ao eixo x, ou seja, $\beta_1 = 0$ e o valor de y independe do valor de x. Um teste de hipótese estatístico é uma regra de decisão que permite estabelecer conclusões sobre os parâmetros estudados, onde duas hipóteses são sempre consideradas, a hipótese nula (H_0) e a hipótese alternativa (H_a). H_0 é a hipótese que está sendo testada, nesse caso, ausência de regressão linear: $H_0: \beta_1 = 0$. H_a é a hipótese que será aceita se H_0 for rejeitada no teste: $H_a: \beta_1 \neq 0$ [119].

Para se realizar um teste de hipóteses além de se estabelecer, *a priori*, as hipóteses H_0 e H_a , deve-se também determinar o nível de significância do teste (α), que corresponde a probabilidade de rejeitar H_0 sendo ela verdadeira, ou seja, a probabilidade de cometer um erro. O valor de α é escolhido pelo pesquisador, sendo bem aceito o nível de significância $\alpha = 0,05$ (5%). Uma forma de decidir sobre as hipóteses é por meio da probabilidade de significância do teste, p-valor, de modo que, rejeita-se a H_0 se o p-valor é menor ou igual a α [119].

No caso do teste F para avaliar a ausência de regressão linear no modelo, precisa-se obter o $F_{\text{calculado}}$ e comparar com o F_{Tabelado} . Sendo que, se o $F_{\text{calc}} \geq F_{\text{Tab}}$ rejeita-se a hipótese nula (H_0), decisão que é usada em outros tipos de teste, como o teste t de Student. E, de forma equivalente, rejeita-se H_0 se o p-valor $\leq \alpha$. O F_{calc} é obtido por meio do quociente: $F_{\text{cal}} = \text{QMRL}/\text{QMRes}$. E o F_{Tab} , que define as regiões críticas do teste, é o valor tabelado correspondente aos graus de liberdade das somas de quadrados que definiram os quadrados médios, e também está relacionada ao nível de significância do teste, procura-se na tabela de distribuição F o valor correspondente a cada situação. Caso o teste indique rejeição de H_0 conclui-se que existe regressão linear [119].

Outra ferramenta importante para se estabelecer conclusões sobre o ajuste linear é o valor de R^2 , coeficiente de determinação ou explicação, esse mede a qualidade do ajuste da reta de regressão aos dados. Apesar do coeficiente de correlação (r) ser importante, o R^2 complementa o entendimento sobre as respostas, o mesmo é definido como: $R^2 = SQRL/SQTc$. Assim, o R^2 mede a proporção da variação descrita pela equação de regressão em relação à variação total das respostas, a parte que não é determinada por esse está relacionada aos resíduos ($SQTc = SQRL + SQRes$), quanto maior for a parte explicada pela regressão, melhor será o ajuste do modelo. O maior valor que R^2 pode assumir é um, e isso só ocorrerá se não houver nenhum resíduo [119, 120].

Para garantir que o ajuste dos dados ao modelo linear é válido deve-se fazer um exame dos resíduos. Esses devem ser independentes (distribuição aleatória) e normalmente distribuídos, ou seja, devem apresentar distribuição simétrica com desvios positivos sendo tão frequentes quanto os negativos, de tal maneira que a média seja zero. Essas observações podem ser feitas plotando-se um gráfico dos ensaios versus resíduos, bem como um gráfico normal dos resíduos. Caso se conclua que o modelo linear não é adequado tenta-se ajustar um modelo quadrático, para isso é preciso realizar mais alguns ensaios em pontos axiais [119, 120].

Após confirmar que o modelo ajustado é adequado para descrever os dados pode-se obter sua descrição gráfica conhecida como superfície de respostas e, também, construir intervalos de confiança regidos por distribuições simétricas como a distribuição t de Student. Para testar hipóteses compara-se o $t_{calculado}$ com o $t_{tabelado}$, com os quais se constrói o diagrama de Pareto que facilita a visualização dos efeitos que são significativos [119, 120].

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Otimização do pré-tratamento organosolv utilizando glicerol de modo a melhorar a sacarificação enzimática de biomassas para viabilizar a produção de etanol celulósico.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a influência de algumas variáveis sobre o pré-tratamento da biomassa aguapé por meio do planejamento experimental fatorial;
- Investigar a ação dos catalisadores: CoFe_2O_4 , FeSO_4 e FeCl_3 ;
- Realizar a etapa de hidrólise para verificar a digestibilidade enzimática das biomassas;
- Determinar o teor de açúcares redutores totais no hidrolisado por meio do método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS);
- Avaliar qualitativa e quantitativamente os açúcares redutores presentes no hidrolisado por meio da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC);
- Caracterizar a biomassa antes e após o pré-tratamento por meio da técnica de espectroscopia na região do infravermelho, a fim de avaliar as mudanças ocorridas na estrutura.
- Melhorar por meio do pré-tratamento a sacarificação enzimática das biomassas aguapé, bagaço de cana, palha de milho e casca de coco;
- Determinar a composição das biomassas antes e após pré-tratamento;
- Verificar se há presença de inibidores de fermentação no licor do pré-tratamento e no hidrolisado utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC);
- Viabilizar a recuperação da lignina contida na fração líquida do pré-tratamento;
- Realizar ensaios de pré-tratamento organosolv com o glicerol bruto sobre a biomassa aguapé, para fins comparativos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta e Preparo das Biomassas

A biomassa lignocelulósica aguapé (*Eichhornia crassipes*) foi coletada no Açude Macela localizado na cidade de Itabaiana-SE (Figura 14) em novembro de 2017. A quantidade necessária foi obtida na margem do açude. A coleta foi feita suspendendo-se a planta até se desprender por completo, sendo colocada em sacos plástico para o transporte. Para facilitar o processo de secagem a raiz foi separada, e o caule e as folhas foram cortados em pedaços com dimensão entre 15 e 20 cm. A secagem foi realizada ao ar livre expondo a planta durante sete dias a irradiação solar.

Figura 14: Biomassa aguapé coletada no Açude Macela em Itabaiana-SE.



Fonte: Produção própria

O bagaço de cana-de-açúcar, a palha de milho e a casca de coco verde foram adquiridas em uma feira livre na cidade de Aracaju-SE. Foram cortadas e submetidas a secagem por exposição a irradiação solar. A Figura 15 mostra as biomassas após a secagem.

As quatro biomassas foram processadas de modo a se obter três tamanhos de partícula (Figura 16): menor que 0,85 mm; 0,85-2,0 mm; maior que 2,0 mm (2,0-4,0). No caso do aguapé todas as partes da planta foram processadas juntas, e no caso da casca de coco utilizou-se o epicarpo junto com o mesocarpo.

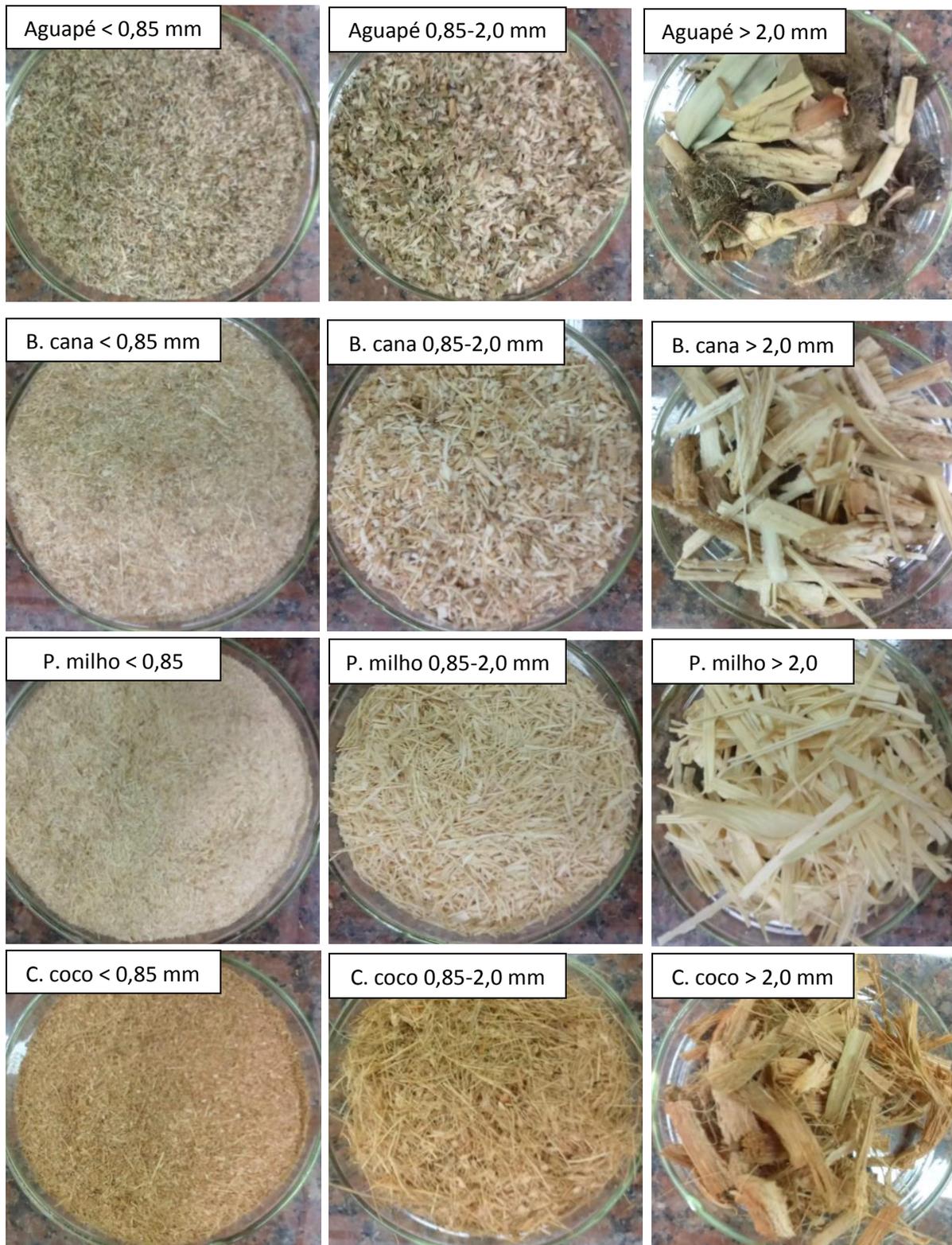
Para a obtenção dos tamanhos de partícula $< 0,85$ mm e $0,85-2,0$ mm, as biomassas foram trituradas em um liquidificador, sendo, em seguida, selecionadas em uma peneira com abertura de $2,0$ mm x $1,0$ mm, o que passou foi novamente selecionado em uma peneira de 20 mesh ($0,84$ mm). A fração retida nessa última corresponde ao tamanho de partícula $0,85 - 2,0$ mm e o que passou corresponde ao tamanho $< 0,85$ mm. Para se obter o tamanho de partícula $> 2,0$ mm ($2,0-4,0$) a biomassa foi cortada manualmente com uma tesoura, usando uma régua para verificar o tamanho.

Figura 15: Biomassas avaliadas nesse estudo após serem secas por exposição a irradiação solar.



Fonte: Produção própria

Figura 16: Biomassas avaliadas nesse estudo após obtenção dos diferentes tamanhos de partícula.



Fonte: Produção própria.

3.2 Pré-Tratamento Organosolv com Glicerol

3.2.1 Planejamento Fatorial 2^{5-1}

Inicialmente, o pré-tratamento organosolv com glicerol foi realizado para a biomassa aguapé. Optou-se por fazer um planejamento experimental. Foram avaliadas cinco variáveis (fatores): tempo, temperatura, razão sólido/líquido, porcentagem de água e catalisador. Cada fator foi estudado em dois níveis.

Os fatores foram avaliados em um delineamento fatorial fracionado 2^{5-1} com dezenove experimentos (16 combinações + 3 repetições no ponto central). A Tabela 3 mostra os valores definidos para os níveis inferior (-1), superior (+1), bem como para o ponto central (0) e a Tabela 4 mostra a combinação de fatores e níveis utilizada em cada ensaio (matriz de planejamento).

A redução mássica proporcionada pelo pré-tratamento e a porcentagem de açúcares liberados na hidrólise enzimática (seção 3.4) foram as respostas avaliadas. A análise estatística foi realizada com o auxílio do software STATISTICA versão 7.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, EUA).

Tabela 3: Valores definidos para os níveis inferior (-1), superior (+1) e ponto central (0) do planejamento experimental fatorial 2^{5-1} .

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
<i>Tempo (min)</i>	10	65	120
<i>Temperatura (°C)</i>	100	160	220
<i>Sólido/Líquido, m/m (%)</i>	1	3,5	6
<i>Água (%)</i>	0	20	40
<i>Catalisador (%)</i>	0	5	10

Tabela 4: Combinação de fatores e níveis para cada ensaio do planejamento experimental fatorial fracionado 2^{5-1} (matriz de planejamento).

Ensaio	Variáveis (valores codificados entre parênteses)				
	Tempo (min) (1)	Temperatura (°C) (2)	Sólido/líquido (%) (3)	Água (%) (4)	Catalisador (%) (5 = 1234)
1	10 (-1)	100 (-1)	1 (-1)	0 (-1)	10 (+1)
2	120 (+1)	100 (-1)	1 (-1)	0 (-1)	0 (-1)
3	10 (-1)	220 (+1)	1 (-1)	0 (-1)	0 (-1)
4	120 (+1)	220 (+1)	1 (-1)	0 (-1)	10 (+1)
5	10 (-1)	100 (-1)	6 (+1)	0 (-1)	0 (-1)
6	120 (+1)	100 (-1)	6 (+1)	0 (-1)	10 (+1)
7	10 (-1)	220 (+1)	6 (+1)	0 (-1)	10 (+1)
8	120 (+1)	220 (+1)	6 (+1)	0 (-1)	0 (-1)
9	10 (-1)	100 (-1)	1 (-1)	40 (+1)	0 (-1)
10	120 (+1)	100 (-1)	1 (-1)	40 (+1)	10 (+1)
11	10 (-1)	220 (+1)	1 (-1)	40 (+1)	10 (+1)
12	120 (+1)	220 (+1)	1 (-1)	40 (+1)	0 (-1)
13	10 (-1)	100 (-1)	6 (+1)	40 (+1)	10 (+1)
14	120 (+1)	100 (-1)	6 (+1)	40 (+1)	0 (-1)
15	10 (-1)	220 (+1)	6 (+1)	40 (+1)	0 (-1)
16	120 (+1)	220 (+1)	6 (+1)	40 (+1)	10 (+1)
17	65 (0)	160 (0)	3.5 (0)	20 (0)	5 (0)
18	65 (0)	160 (0)	3.5 (0)	20 (0)	5 (0)
19	65 (0)	160 (0)	3.5 (0)	20 (0)	5 (0)

Os experimentos foram conduzidos em uma capela de exaustão. O meio reacional foi colocado em balão de fundo redondo acoplado a um sistema de refluxo e aquecido em um de banho de óleo utilizando uma placa de aquecimento com agitação magnética, conforme Figura 17. Todos os ensaios de pré-tratamento foram realizados com 1,5 g da biomassa aguapé *in natura*, seca e triturada para o tamanho de partícula de 0,85-2,0 mm (fração sólida). Assim, para

obtenção das diferentes razões sólido/líquido (m/m) variou-se a quantidade da fração líquida.

Figura 17: Sistema utilizado na realização dos experimentos de pré-tratamento organosolv com glicerol.



Fonte: Produção própria.

Utilizou-se como solvente orgânico (fração líquida) o glicerol comercial (Dinâmica, pureza 99,5%, Brasil) e para o banho de óleo foi utilizado o óleo de soja. Contudo, também se avaliou a influência da adição de água (água destilada) na fração líquida. A porcentagem de água foi calculada em relação ao total da fração líquida necessário a cada experimento. Por exemplo, no experimento com 0% de água a fração líquida foi composta unicamente pelo glicerol, bem como, quando se usou 40% de água os 60% restantes corresponderam a quantidade de glicerol, totalizando 100% da quantidade necessária da fração líquida.

O catalisador avaliado foi a ferrita de cobalto (CoFe_2O_4), obtida por pesquisadores do grupo, através de uma rota de síntese sol-gel modificada usando matéria orgânica natural-NOM [134]. A porcentagem em massa utilizada de catalisador foi calculada em relação a massa da fração sólida.

Os experimentos foram realizados da seguinte forma:

- Transferiu-se 1,5 g da biomassa para um balão de fundo redondo;

- Em seguida adicionou-se a quantidade apropriada da fração líquida de modo a se obter a razão sólido/líquido desejada, e acrescentou-se, quando era o caso, o catalisador;
- Conectou-se o balão ao sistema de refluxo e emergi-o no banho de óleo previamente aquecido a temperatura desejada em uma placa aquecedora com dispositivo de agitação magnética;
- Para a correta transferência de calor, tanto o banho de óleo como o meio reacional foram agitados, por meio de uma barra magnética no banho e outra no balão, a uma distância que possibilitava a agitação de ambas;
- A velocidade de agitação foi mantida a 300 rpm;
- Após o meio reacional contido dentro do balão atingir estabilidade térmica com o banho de óleo na temperatura desejada o sistema foi mantido nessas condições pelo tempo determinado;
- Completando-se o tempo requerido desligou-se a agitação, retirou-se o balão do banho de óleo e para facilitar o resfriamento o mesmo foi colocado em um banho de água a temperatura ambiente;
- Quando a temperatura do conteúdo presente no balão atingiu cerca de 80 °C foi realizada a filtração em tecido, sendo necessário utilizar 50 mL de água (água da torneira) para auxiliar na transferência de toda a biomassa do balão;
- Verificou-se o pH da fração líquida (licor) e, quando era o caso, recuperou-se parte do catalisador disperso nela pela aproximação de um ímã;
- A fração líquida foi armazenada em frasco plástico e mantida em congelador até ser necessária;
- O catalisador foi lavado três vezes com 10 mL de água destilada, seco e armazenado;
- A fração sólida (biomassa pré-tratada) foi lavada com 300 mL de água (água da torneira);
- Após a lavagem a fração sólida foi seca a 35 °C em estufa com circulação de ar;
- A fração sólida seca teve sua massa medida e foi conservada em recipiente plástico fechado a temperatura ambiente.

3.2.1.1 Estudo com a Adição de Sais de Ferro

Para a realização desse estudo o pré-tratamento da biomassa aguapé foi realizado seguindo as mesmas etapas descritas no sub-tópico anterior. Os sais de ferro testados foram o cloreto de ferro III hexahidratado P.A., $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, (Dinâmica, 97-102%, Brasil) e o sulfato de ferro II heptahidratado P.A., $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Neon, 99,0%, Brasil), sendo avaliadas as seguintes concentrações: 0,05; 0,075; 0,1 e 0,125 mol.L⁻¹. A Tabela 5 mostra as condições em que esse estudo foi conduzido.

Tabela 5: Condições do pré-tratamento organosolv com glicerol realizado com a adição de sais de ferro.

<i>Massa da fração sólida</i>	1,5 g (aguapé <i>in natura</i>)
<i>Razão sólido/líquido, m/m</i>	6% (20,0 mL de glicerol)
<i>Porcentagem de água</i>	0% (sem a adição de água)
<i>Tempo</i>	10 min (após estabilização térmica)
<i>Temperatura</i>	220 °C
<i>Aditivos</i>	0,05 a 0,125 mol.L ⁻¹ de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ou $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

3.2.2 Planejamento Fatorial 2³

Um planejamento experimental fatorial 2³ foi utilizado para otimizar o pré-tratamento organosolv com glicerol das biomassas aguapé, bagaço de cana, palha de milho e casca de coco. As variáveis consideradas foram o tamanho de partícula, a concentração de FeCl_3 e a temperatura.

A Tabela 6 mostra os valores definidos para os níveis inferior (-1), superior (+1), bem como para o ponto central (0) e a Tabela 7 mostra a combinação de fatores e níveis utilizada em cada ensaio (matriz de planejamento). As respostas avaliadas foram o rendimento sólido após o pré-tratamento e a porcentagem de açúcares liberados na hidrólise enzimática (Seção 3.4). A análise estatística foi realizada usando o software STATISTICA versão 7.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, EUA).

Tabela 6: Valores definidos para os níveis inferior (-1), superior (+1) e ponto central (0) do planejamento experimental fatorial 2^3 .

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
Tamanho de partícula (mm)	< 0,85	0,85-2,0	> 2,0 (2,0-4,0)
Concentração de $FeCl_3$ (mol.L ⁻¹)	0,025	0,1	0,175
Temperatura (°C)	160	190	220

Tabela 7: Combinação de fatores e níveis para cada ensaio do planejamento experimental fatorial fracionado 2^3 (matriz de planejamento).

Ensaio	Variáveis (valores codificados entre parênteses)		
	T. partícula (mm)	Conc. $FeCl_3$ (mol.L ⁻¹)	Temperatura (°C)
	(1)	(2)	(3)
1	< 0,85 (-1)	0,025 (-1)	160 (-1)
2	> 2,0 (+1)	0,025 (-1)	160 (-1)
3	< 0,85 (-1)	0,175 (+1)	160 (-1)
4	> 2,0 (+1)	0,175 (+1)	160 (-1)
5	< 0,85 (-1)	0,025 (-1)	220 (+1)
6	> 2,0 (+1)	0,025 (-1)	220 (+1)
7	< 0,85 (-1)	0,175 (+1)	220 (+1)
8	> 2,0 (+1)	0,175 (+1)	220 (+1)
9	0,85-2,0 (0)	0,1 (0)	190 (0)
10	0,85-2,0 (0)	0,1 (0)	190 (0)
11	0,85-2,0 (0)	0,1 (0)	190 (0)

Todos os ensaios de pré-tratamento foram realizados usando 1,5 g da biomassa *in natura* seca e triturada. Considerando a otimização do planejamento 2^{5-1} (seção 3.2.1), o tempo de reação foi de 10 min, após estabilização térmica, e a razão sólido/líquido (m/m) foi de 6% (1,5 g de biomassa/20,0 mL de glicerol). Foi utilizado o glicerol comercial (Dinâmica, 99,5%, Brasil), e o cloreto de ferro III

hexahidratado P.A., $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, (97-102%, Dinâmica, Brazil). Sendo que para a realização das reações de pré-tratamento seguiu-se o mesmo roteiro descrito na seção 3.2.1.

Ao se determinar a condição considerada ótima, avaliou-se: realizar a reação de pré-tratamento sem catalisador (FeCl_3); reduzir pela metade a quantidade de catalisador (FeCl_3); substituir o FeCl_3 por HCl; submeter diretamente a biomassa sem lavagem e úmida ao processo de hidrólise enzimática.

3.2.2.1 Aplicação do Glicerol Bruto

Foram realizadas reações com o glicerol bruto para a biomassa aguapé seguindo a condição considerada ótima de acordo com o planejamento fatorial 2^3 . O glicerol bruto, da produção de biodiesel de algodão, foi cedido pelo Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), Pernambuco. Este foi aplicado da forma como recebido (pH = 8,6), sem passar por nenhum tipo de tratamento, e também após ser submetido a tratamentos simples:

- Evaporação: o glicerol bruto, cerca de 75 mL, foi colocado em um béquer de abertura larga que foi imergido em banho de óleo a 120 ± 5 °C por 3h.
- Precipitação: O pH do glicerol bruto foi reduzido para 3,0 com a adição de ácido fosfórico 85%, sendo o glicerol agitado continuamente durante a adição do ácido. Após redução do pH o mesmo foi posto em uma coluna de separação por 24 h, permitindo separar o glicerol (fase inferior) dos ácidos graxos insolúveis que foram precipitados (fase superior).
- Precipitação e Evaporação: realizou-se o procedimento de precipitação seguido do de evaporação, conforme descrito acima.

As reações foram inicialmente realizadas por meio do sistema de refluxo, com: o glicerol como recebido; o glicerol evaporado; e o glicerol precipitado e evaporado. Depois realizou-se as reações com o reator aberto (não se acoplou o balão com o meio reacional ao sistema de refluxo) para: o glicerol como recebido; e o glicerol precipitado. Avaliou-se também submeter a biomassa pré-

tratada com o glicerol bruto, precipitado, com o reator aberto diretamente ao processo de hidrólise enzimática sem passar pelas etapas de lavagem e secagem.

3.3 Recuperação da Lignina

A lignina removida para o licor (fração líquida do pré-tratamento) foi recuperada por centrifugação (10 min a 3.500 rpm), em centrífuga Centrifuge 5810 R (Eppendorf), seguida de lavagem e secagem em estufa a 40 °C. A lavagem foi realizada na centrífuga em duas etapas para garantir a remoção do excesso de glicerol. O volume total de água utilizado correspondeu a 40% do volume do licor que foi submetido a centrifugação. Em cada etapa de lavagem, adicionou-se metade da água requerida ao tubo falcon com o sólido (lignina), agitou-se vigorosamente para homogeneização e centrifugou-se por 10 min.

3.4 Hidrólise Enzimática

A biomassa pré-tratada foi submetida a um processo de hidrólise enzimática usando a enzima comercial Cellic CTec3, da Novozymes Latin America Ltda (Paraná, Brasil), na proporção 10 – 20 FPU (Filter Paper Unit.g⁻¹resíduo), que corresponde a atividade da enzima determinada de acordo com Ghose [135].

O procedimento consistiu em adicionar a um erlenmeyer:

- 0,125 g da biomassa pré-tratada;
- 15 mL de uma solução de tampão citrato 50 mmol.L⁻¹ e pH 4,85;
- 5 µL da enzima Cellic CTec3.

Após a adição desses componentes o erlenmeyer foi levado a uma incubadora refrigerada com circulação de ar e agitação orbital a temperatura de 48,5°C e rotação de 100 rpm durante 48 horas. Uma alíquota foi retirada do meio reacional antes da incubação, e em intervalos de tempo pré-determinados durante este período. As alíquotas foram filtradas em filtros de nylon 0,22 µm. A porcentagem de açúcares redutores (AR) liberados na hidrólise enzimática foi calculada por meio da Equação 1:

$$AR (\%) = 100 \frac{C_{AR} (g.L^{-1})}{C_{biomassa} (g.L^{-1})} \quad (1)$$

Onde:

$C_{AR} (g.L^{-1})$ = concentração de açúcares redutores totais liberados na hidrólise;

$C_{biomassa} (g.L^{-1})$ = razão entre a quantidade em gramas da biomassa pré-tratada e volume do tampão utilizado na hidrólise enzimática.

3.5 Métodos de Análise

3.5.1 Determinação do Teor de Umidade e Cinzas

As metodologias utilizadas nesse trabalho para a determinação da umidade e das cinzas presentes nas biomassas foram adaptadas dos procedimentos analíticos usados pelo Laboratório Nacional de Energia Renovável (National Renewable Energy Laboratory - NREL), respectivamente: NREL/TP-510-42621 [136] e NREL/TP-510-42622 [137].

3.5.2 Determinação dos Açúcares Redutores Totais pelo Método do Ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS)

A metodologia descrita a seguir é adaptada da de Bernfeld [93]:

- Preparo da solução DNS: 1,0 g do ácido 3,5-dinitrosalicílico foi adicionado em 50,0 mL de água destilada e 20,0 mL de hidróxido de sódio 2,0 mol.L⁻¹. Sendo que, para facilitar a dissolução a solução foi aquecida até no máximo 40 °C. Quando o DNS se dissolveu por completo, adicionou-se 30,0 g de sal de Rochelle (tartarato duplo de sódio e potássio - C₄H₄KNaO₆.4H₂O). Após a adição o volume foi completado para 100,0 mL com água destilada. A solução foi armazenada em frasco escuro na geladeira.
- Procedimento de Análise (reação DNS): 125,0 µL das amostras foram transferidas para tubos de ensaio com tampa e 250,0 µL de água destilada

foram adicionados. Então, 125,0 μL da solução DNS foram adicionados a cada tubo, os quais foram agitados e levados, o mais rápido possível, para um banho de água fervente por 5 min, possibilitando a ocorrência da reação entre os açúcares redutores e o DNS (a adição da solução DNS foi feita em pequenos blocos, 10-15 amostras, para evitar degradação dos açúcares antes dos tubos serem levados ao aquecimento). Após o referido tempo a reação foi interrompida colocando-se os tubos em banho de água gelada. 2,0 mL de água destilada foram adicionados a cada tubo para diluir a solução resultante. Por fim, a leitura da absorbância a 540 nm foi realizada em espectrofotômetro (LGI-VS-721N, feixe simples).

O branco foi preparado substituindo-se a amostra por água destilada, sendo submetido ao mesmo procedimento de análise descrito para as amostras. A determinação da concentração dos açúcares redutores totais foi feita em relação a glicose. Para isso, uma curva padrão linear foi construída, em que soluções de glicose com concentração conhecida ($0,2-1,0 \text{ g.L}^{-1}$) foram submetidas a reação DNS e tiveram a absorbância medida.

Por meio da equação da reta obtida foi possível calcular a concentração de açúcares redutores totais presente nas amostras, tendo o cuidado de a absorbância lida estar dentro da faixa da curva de calibração, caso contrário a amostra foi diluída e submetida novamente a reação DNS. A concentração dos açúcares redutores totais foi calculada pela Equação 2.

$$AR(\text{g.L}^{-1}) = \text{fator da curva padrão} \cdot \text{diluição} \cdot \text{Absorbância} \quad (2)$$

Onde:

fator da curva padrão = coeficiente angular da reta

3.5.3 Determinação da Composição das Biomassas e Determinação dos Açúcares Redutores por HPLC

Os teores de lignina, hemicelulose e celulose das biomassas *in natura* e pré-tratadas foram determinados de acordo com os procedimentos do NREL (NREL/TP-510-42618) [138], com adaptação apenas na metodologia analítica

utilizada para quantificação dos açúcares. O conteúdo total de hexoses foi quantificado como celulose, enquanto o conteúdo total de pentoses foi quantificado como hemicelulose, aplicando as correções anidras apropriadas (0,88 e 0,90 para açúcares C-5 e C-6, respectivamente).

O conteúdo total de pentoses e hexoses foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) usando o sistema cromatográfico *Prominence* da Shimadzu (Quioto, Japão) equipado com o detector evaporativo com espalhamento de luz, ELSD-LTII (Shimadzu), e coluna Luna NH₂ 3 u 100 Å (150 x 2,0 mm). A fase móvel foi constituída por água ultrapura (A) e acetonitrila grau HPLC (B) em modo de eluição gradiente (95% B: 0,00-0,01 min; 80% B: 0,01-15 min; 95% B: 15-20 min) a 0,8 mL.min⁻¹ e 38 °C. As condições do ELSD foram: gain 12; 35 °C; 350 – 360 kPa (N₂). Os padrões de carboidratos (pureza ≥ 99,0%) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Brasil).

As recuperações dos componentes (celulose, hemicelulose e lignina), grau de remoção, digestibilidade da celulose e rendimento de glicose foram calculadas usando as Equações 3 - 7:

$$\text{Componente recuperado (\%)} = \frac{\text{componente na biomassa pré-tratada (\%)} \times \text{rendimento sólido (\%)}}{\text{componente na biomassa in natura (\%)}} \quad (3)$$

$$\text{Rendimento sólido (\%)} = \frac{\text{massa da biomassa após pré-tratamento}}{\text{massa da biomassa in natura antes do pré-tratamento}} \times 100 \quad (4)$$

$$\text{Grau de remoção (\%)} = 100 - \text{componente recuperado (\%)} \quad (5)$$

$$\text{Digestibilidade da celulose (\%)} = \frac{\text{glicose produzida via hidrólise enzimática (g)} \times 0,9}{\text{celulose na biomassa pré-tratada (g)}} \times 100 \quad (6)$$

$$\text{Rendimento em glicose (\%)} = \frac{\text{glicose produzida via hidrólise enzimática (g)} \times 0,9}{\text{celulose na biomassa in natura (g)}} \times 100 \quad (7)$$

3.5.4 Determinação de HMF, Furfural e Ácido Acético

HMF, furfural e ácido acético foram determinados por HPLC, utilizando o instrumento *Prominence* (Shimadzu, Kyoto, Japão) com o detector DAD e uma coluna Shim-Pack VP-ODS (4,6 x 250 mm), mantida a 35 ° C. Modo de eluição isocrático, com a fase móvel ACN:H₂O (20:80, V:V) acidificada a pH 3,0 com ácido fosfórico. Fluxo total de 0,8 mL.min⁻¹, tempo de corrida de 10 min e volume de injeção de 10 µL. O ácido acético foi quantificado a 210 nm, o HMF e o furfural a 280 nm.

Padrões de HMF e furfural (pureza ≥ 99,0%) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Brasil), bem como o ácido acético de grau HPLC. Curvas de calibração linear foram construídas nas faixas de: 0,1-10 mg.L⁻¹ (R² = 0,9978) e 10-250 mg.L⁻¹ (R² = 0,9995) para o HMF; 0,1-10 mg.L⁻¹ (R² = 0,9975) e 10-250 mg.L⁻¹ (R² = 0,9993) para o furfural; 0,1-7,0 g.L⁻¹ (R² = 0,9996) para o ácido acético.

3.5.5 Obtenção dos Espectros na Região do Infravermelho

Os espectros na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foram obtidos usando um instrumento Shimadzu IRPrestige-21, na faixa de 4000-400 cm⁻¹, com um total de 32 varreduras e resolução de 8 cm⁻¹. As amostras foram preparadas por dispersões em brometo de potássio.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Planejamento Fatorial 2⁵⁻¹

Após ser lavada e seca, a biomassa pré-tratada teve a sua massa medida a fim de compará-la com a massa inicial (antes do pré-tratamento). A redução mássica para os dezenove ensaios de pré-tratamento pode ser vista na Tabela 8, por meio da qual se observa que quatro ensaios proporcionaram redução significativa da massa inicial, ensaios 3, 4, 7 e 8, os demais proporcionaram redução pouco expressiva. Esses quatro ensaios também foram os únicos que forneceram liberação significativa de açúcares no processo de hidrólise enzimática (Figura 18). O rendimento em açúcares para a biomassa *in natura* e para os outros experimentos foi inferior a 20%.

A redução da massa inicial é um indicativo de que ocorreu fracionamento da biomassa, ou seja, remoção de alguns de seus componentes estruturais, reduzindo a recalcitrância. O resultado desejado na etapa de pré-tratamento organosolv é uma alta remoção da hemicelulose e lignina, preservando-se praticamente toda celulose na fração sólida. Assim, ficou evidente que a redução mássica dos quatro experimentos citados está relacionada à remoção de hemicelulose e lignina, o que aumentou a acessibilidade das enzimas a celulose e, conseqüentemente, aumentou a eficiência do processo de hidrólise enzimática.

Outro ponto a ser destacado no caso dos ensaios 3, 4, 7 e 8 é o fato de a biomassa pré-tratada ter ficado com um aspecto muito diferente da biomassa *in natura*, e durante a hidrólise essas se desintegraram quase por completo. A Figura 19 ilustra o estado da biomassa pré-tratada nas condições do experimento 8 nos pontos 0h, 12h e 48h de hidrólise, bem como o ponto 48h para a biomassa do experimento 17 que praticamente não teve o aspecto alterado, tanto no pré-tratamento quanto na hidrólise.

Tabela 8: Matriz de planejamento fatorial 2^{5-1} do pré-tratamento organosolv com glicerol aplicado ao aguapé, com as respostas: redução mássica (%) e açúcares liberados (%) em 24 h de hidrólise enzimática.

Ensaio	Variáveis (valores codificados entre parênteses)					Respostas	
	Tempo (min) (1)	Temperatura (°C) (2)	Sólido/Líquido (%) (3)	Água (%) (4)	Catalisador (%) (5 = 1234)	RM (%)	AL (%)
1	10 (-1)	100 (-1)	1 (-1)	0 (-1)	10 (+1)	16,0	3,6
2	120 (+1)	100 (-1)	1 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	16,0	1,8
3	10 (-1)	220 (+1)	1 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	43,7	35,2
4	120 (+1)	220 (+1)	1 (-1)	0 (-1)	10 (+1)	59,3	41,1
5	10 (-1)	100 (-1)	6 (+1)	0 (-1)	0 (-1)	22,0	3,6
6	120 (+1)	100 (-1)	6 (+1)	0 (-1)	10 (+1)	15,4	3,8
7	10 (-1)	220 (+1)	6 (+1)	0 (-1)	10 (+1)	41,6	38,0
8	120 (+1)	220 (+1)	6 (+1)	0 (-1)	0 (-1)	52,8	40,5
9	10 (-1)	100 (-1)	1 (-1)	40 (+1)	0 (-1)	22,0	5,2
10	120 (+1)	100 (-1)	1 (-1)	40 (+1)	10 (+1)	25,3	5,9
11	10 (-1)	220 (+1)	1 (-1)	40 (+1)	10 (+1)	8,7	4,5
12	120 (+1)	220 (+1)	1 (-1)	40 (+1)	0 (-1)	22,7	4,8
13	10 (-1)	100 (-1)	6 (+1)	40 (+1)	10 (+1)	18,0	1,2
14	120 (+1)	100 (-1)	6 (+1)	40 (+1)	0 (-1)	15,3	3,3
15	10 (-1)	220 (+1)	6 (+1)	40 (+1)	0 (-1)	20,7	6,0
16	120 (+1)	220 (+1)	6 (+1)	40 (+1)	10 (+1)	19,3	7,5
17	65 (0)	160 (0)	3,5 (0)	20 (0)	5 (0)	14,0	6,7
18	65 (0)	160 (0)	3,5 (0)	20 (0)	5 (0)	20,0	7,4
19	65 (0)	160 (0)	3,5 (0)	20 (0)	5 (0)	17,3	9,1

RM = redução mássica AL = açúcares liberados

Figura 18: Percentual de açúcares liberados na hidrólise em função do tempo para a biomassa aguapé pré-tratada de acordo com os dezoito ensaios de pré-tratamento e para a biomassa *in natura*.

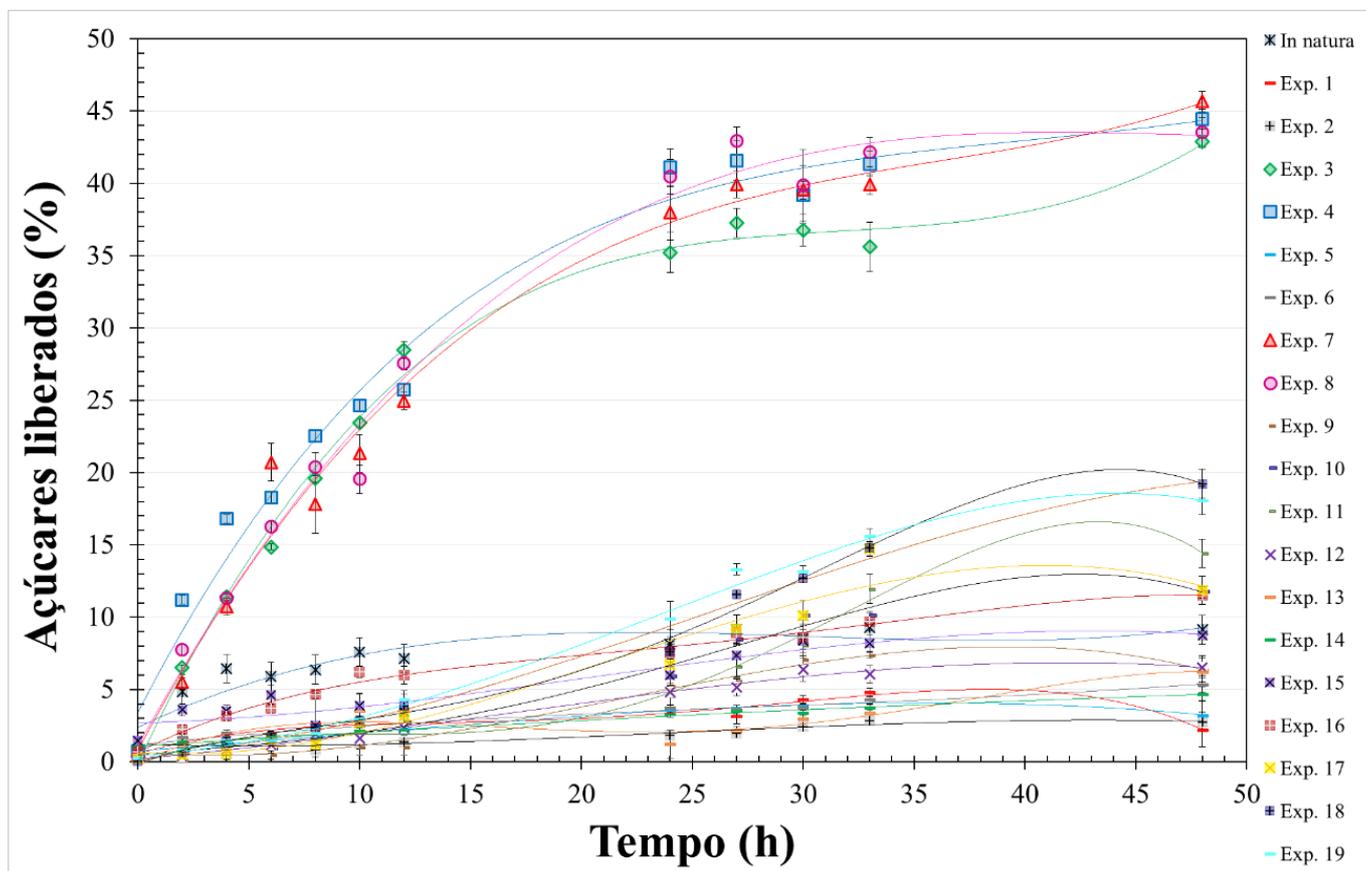
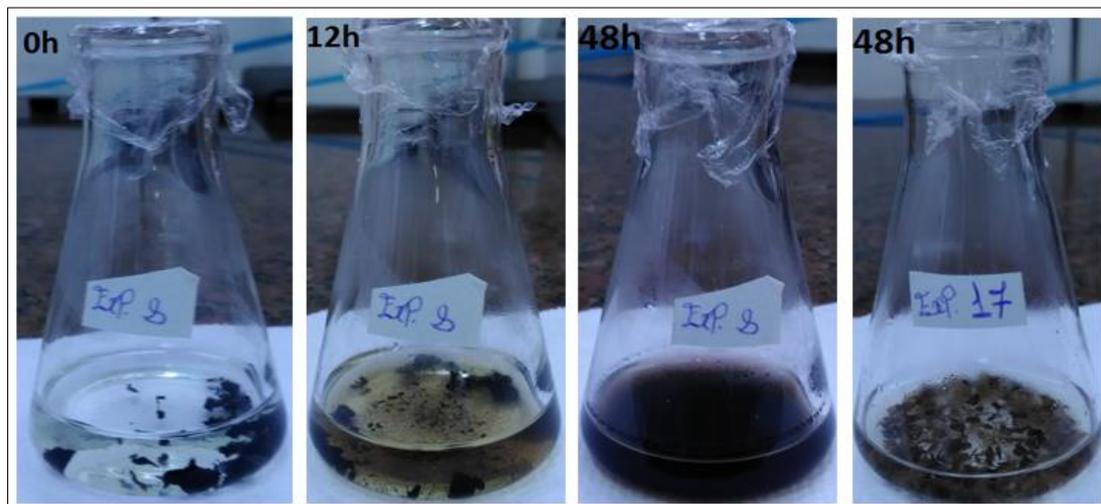
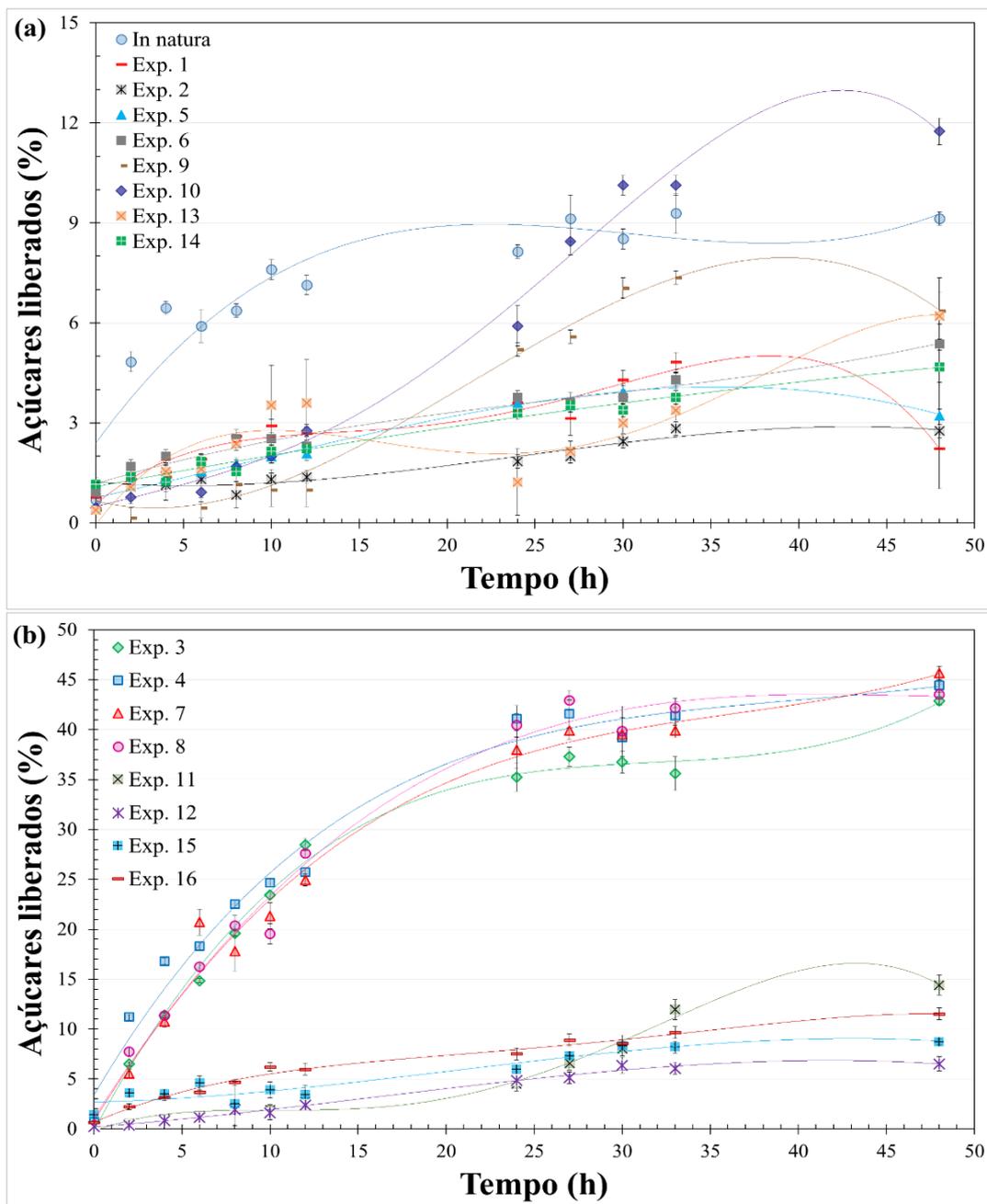


Figura 19: Ilustração do aspecto da biomassa pré-tratada nas condições do experimento 8 em 0 h, 12 h e 48 h de hidrólise, e em 48 h para a biomassa do experimento 17.



Foi notória a influência direta da variável temperatura nos resultados. Todas as biomassas pré-tratadas a 100 °C (Figura 20a) apresentaram eficiência muito baixa na hidrólise. Os ensaios de pré-tratamento que conduziram as melhores eficiências na hidrólise foram realizados a 220 °C (Figura 20b). E os ensaios que correspondem ao ponto central, realizados a 160 °C, apresentaram eficiência pouco superior aos dos conduzidos a 100 °C.

Figura 20: Porcentagem de açúcares liberados na hidrólise em função do tempo para os experimentos em que a biomassa aguapé foi pré-tratada a: (a) 100 °C e para a biomassa *in natura*; b) 220 °C.



Observa-se ainda, a partir da Figura 20b, que a eficiência proporcionada pelas biomassas pré-tratadas a 220 °C foi dividida em dois grupos bem distintos. Um apresentando eficiência muito baixa, em torno de 10%, e outro com eficiência intermediária, de aproximadamente 40%. Percebeu-se que a variável porcentagem de água estava sendo decisiva nesse resultado. Dentre esses ensaios de pré-tratamento, todos que proporcionaram baixo rendimento em açúcar na hidrólise foram realizados com a adição de 40% de água, e os que apresentaram melhor eficiência foram realizados sem adição de água (0%), com a fração líquida constituída apenas por glicerol.

4.1.1 *Análise Estatística*

A análise estatística dos efeitos se fez importante para o entendimento mais aprofundado acerca da influência de cada variável. Para a realização da mesma foram escolhidos os resultados obtidos em 24 h de hidrólise enzimática, tempo em que, de modo geral, a liberação de açúcar parece atingir o máximo (Figura 18). A liberação de açúcares em 24 h de hidrólise enzimática variou de 1% a 41%, de acordo com as condições do pré-tratamento (Tabela 8).

A Tabela 9 apresenta a estimativa dos efeitos sobre a porcentagem de açúcares liberados, bem como os coeficientes de regressão do modelo. Nela só há a presença da interação entre as variáveis temperatura e porcentagem de água (2x4), porque as demais interações foram retiradas do modelo e inseridas ao resíduo, uma vez que não foram significativas para a resposta, o p-valor foi alto variando de 0,6086 – 0,9543. Retirá-las foi uma decisão benéfica para o modelo, uma vez que aumentou o nível de significância dos efeitos que já eram significativos, sem ocasionar redução expressiva no valor de R^2 , que passou de 98,1% com todas as interações para 97,2% com a exclusão das não significativas.

O nível de significância igual a 5% ($p\text{-valor} \leq 0,05$) é o mais utilizado na decisão sobre a importância dos efeitos para as respostas, mas no caso de um fatorial fracionado aconselha-se que esse seja fixado a 10% ($p\text{-valor} \leq 0,1$), a fim de evitar a exclusão de fatores importantes. Como se observa na Tabela 9, as variáveis tempo (1), sólido/líquido (3) e catalisador (5) não foram significativas

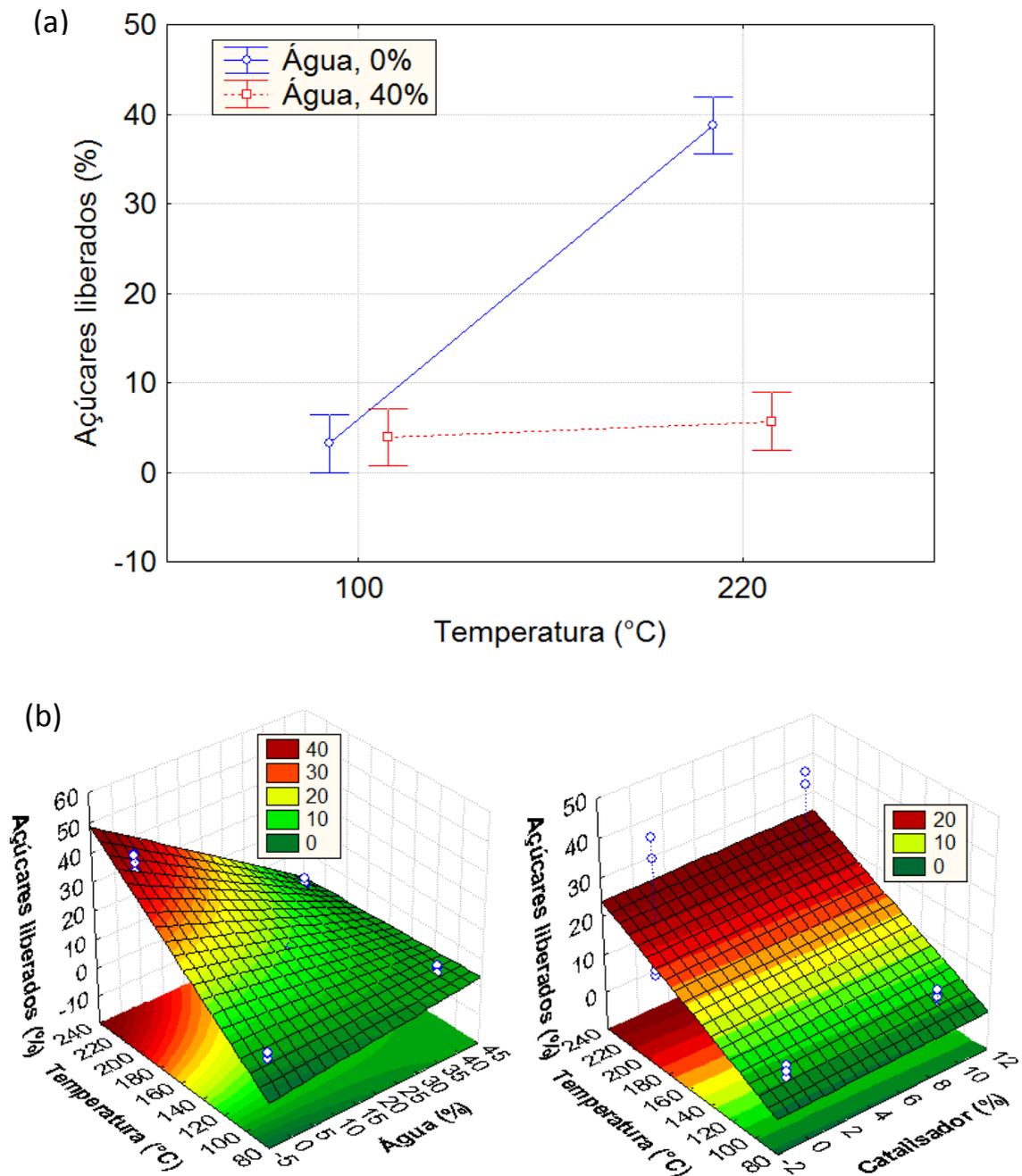
para a resposta, mesmo a 10% de significância, indicando que manter essas em qualquer dos níveis estudados não afetará o resultado.

Tabela 9: Estimativa dos efeitos sobre a porcentagem de açúcares liberados e coeficientes de regressão do modelo.

	Efeito	Erro Padrão	t(12)	p-valor	Conf. Lim. -95%	Conf. Lim. +95%	Coefficiente Regressão
Média Geral	12,0632	0,6725	17,9374	0,0000	10,5979	13,5284	-28,5197
(1) Tempo (min)	1,4250	1,4657	0,9722	0,3501	-1,7685	4,6185	0,0130
(2) Temperatura (°C)	18,6500	1,4657	12,7242	0,0000	15,4565	21,8435	0,2958
(3) Sólido/Líquido (%)	0,2250	1,4657	0,1535	0,8805	-2,9685	3,4185	0,0450
(4) Água (%)	-16,1500	1,4657	-11,0185	0,0000	-19,3435	-12,9565	0,7196
(5) Catalisador (%)	0,6500	1,4657	0,4435	0,6653	-2,5435	3,8435	0,0650
2 x 4	-16,8500	1,4657	-11,4961	0,0000	-20,0435	-13,6565	-0,0070

Ainda na Tabela 9, verifica-se que o efeito da temperatura (2), da porcentagem de água (4) e da interação entre elas (2x4) foram altamente significativos para a resposta. Este resultado já era esperado, uma vez que a influência de tais variáveis foi perceptível nos resultados da hidrólise enzimática. Com a análise estatística confirma-se que a temperatura tem um efeito positivo e a água um efeito negativo sobre as respostas. A Figura 21a ilustra a interação entre essas variáveis, onde na presença de água a temperatura praticamente não afeta a resposta, mas sem a sua adição ao meio reacional o aumento da temperatura conduz a uma elevação expressiva no rendimento.

Figura 21: Interpretação dos efeitos de algumas variáveis por meio da análise estatística: (a) ilustração da interação temperatura (2) x água (4); (b) superfícies de resposta mostrando o efeito da água e do catalisador em relação à temperatura.



Por meio da análise de variância (ANOVA) observou-se que o teste F foi altamente significativo a 5% de significância, $F_{\text{cal}} > F_{\text{tab}}$ ($F_{\text{cal}} = 69,46 > F_{6; 12; 0,05} = 3,00$), indicando que existe regressão linear. Desse modo, a hipótese nula (H_0) deve ser rejeitada, pois a regressão é diferente de zero, e o modelo linear é considerado adequado para descrever os dados experimentais. O alto coeficiente de determinação é mais um indicativo do bom ajustamento do modelo aos dados, explicando 97,2% da variação total.

Desta maneira, usando os coeficientes de regressão do modelo, contidos na Tabela 9, pode-se escrever o modelo linear e obter sua descrição gráfica, que é chamada de superfície de resposta. A Figura 21b apresenta superfícies de resposta que reforçam as observações já feitas. O modelo ajustado aos dados experimentais pode ser visto na Equação 8, por meio desse o resultado previsto para o ensaio de pré-tratamento 7 é 37,6%, e o observado experimentalmente foi 38,0%, confirmando que há uma ótima concordância.

$$\text{Açúcares liberados (\%)} = -28,5197 + 0,0130x_1 + 0,2958x_2 + 0,0450x_3 + 0,7196x_4 + 0,0650x_5 - 0,0070x_2x_4 \quad (8)$$

Dentre os quatro ensaios de pré-tratamento que conduziram aos melhores resultados na hidrólise enzimática (3, 4, 7 e 8), os ensaios 3 e 7 apresentam uma característica de extrema importância que se refere à redução expressiva no tempo do pré-tratamento. Neles, a reação foi conduzida por apenas 10 min, sem perdas significativas ao rendimento, resultado muito positivo por reduzir enormemente os gastos energéticos e de tempo. A diferença entre eles se encontra na razão sólido/líquido e porcentagem de catalisador, variáveis que, assim como o tempo, não foram significativas para a resposta.

Desse modo, adotou-se o experimento 7 como referência para testes posteriores, mantendo-se todas as condições já adotadas para o mesmo, com exceção da utilização do catalisador, que foi retirado, ou seja, mantido no seu nível inferior de 0%. O valor para essa situação foi previsto pelo modelo ajustado e corresponde a 36,9%, redução de apenas 1% em relação ao resultado experimental com a presença de 10% da ferrita de cobalto.

Julgou-se não ser necessária a realização de um novo delineamento experimental, uma vez que a importância de cada variável ficou explícita. Assim, a condição de pré-tratamento: *10 min, 220 °C, sólido/líquido a 6%, água a 0% e catalisador a 0%* foi considerada a melhor condição para o estudo proposto. Quando avaliada experimentalmente, em triplicata, essa condição proporcionou o resultado previsto pelo modelo, 37,3% de liberação de açúcares em 24 h de hidrólise enzimática, confirmando que a ferrita de cobalto não tem atividade em reações de pré-tratamento organosolv com glicerol.

Ficou evidente que realizar um planejamento experimental foi favorável, por possibilitar, facilmente, a visualização da condição ótima, mesmo com a utilização de um fatorial fracionado, o que foi possível devido ao mesmo apresentar boa resolução, permitindo o cálculo dos efeitos principais e interações de primeira ordem, uma vez que, respectivamente, são confundidos apenas com interações de quatro e três fatores que são quase sempre desprezíveis.

O rendimento atingido com a otimização é razoável, mas obtido com economia de tempo e reagente. Um tempo de reação alto não se faz necessário e a razão sólido/líquido pode ser mantida no nível mais alto, sem consumo excessivo de solvente. O trabalho de Guragain et al [11], que estudou o pré-tratamento organosolv com glicerol sobre a aguapé, realizou um planejamento 2^2 estudando o tempo de 1 - 4 h e a temperatura de 180 - 230 °C, concluindo que 1 h a 230 °C foi a melhor condição, ou seja, o menor tempo e a maior temperatura avaliada, semelhante a esse trabalho.

Trabalhos pioneiros sobre o pré-tratamento organosolv com glicerol [22, 29] indicaram ser necessário um tempo de pré-tratamento longo, 9 e 3 h, respectivamente, para as biomassas de madeira e palha de trigo. Porém, estudo mais recente [139] sobre a madeira dura obteve bons resultados em tempo de reação curto, 12 min, a temperatura semelhante. Liu et al. [140] ao estudarem o pré-tratamento de madeira macia com glicerol aquoso (10:1) em micro-ondas com a adição de ácidos observaram que altas temperaturas com tempos de reação curtos deram maiores rendimentos em açúcar (50,6%; 210 °C; 3 min) do que temperaturas mais amenas com maiores tempos de reação (20,2%; 180 °C; 30 min).

Nesse trabalho ficou evidente que a temperatura é a variável mais importante em um processo de pré-tratamento organosolv com glicerol. Bons rendimentos em açúcar, na etapa de hidrólise enzimática, só serão atingidos se essa for mantida acima de 200 °C, independente dos demais fatores. O trabalho de Lynam e Coronella [117] indicou que temperaturas baixas não são favoráveis quando se usa o glicerol. Nesse estudo, 100 °C foi fixado como nível inferior a fim de investigar se o sinergismo com as outras variáveis proporcionaria um bom resultado. Porém, como se observa na Tabela 8, o rendimento do ensaio 5 foi muito baixo (3,6%) por ter sido realizado a 100 °C, mesmo com todas as demais variáveis nos níveis determinados como ótimos. Pelo modelo ajustado pode-se prever que a porcentagem de açúcares liberados sofre redução considerável quando o pré-tratamento é realizado a 190 °C mantendo-se todas as demais variáveis na condição ótima, passando a ser 28,1%.

Vários trabalhos [29, 30, 139, 141] demonstraram que a deslignificação e a perda de componentes de hemicelulose crescem com o aumento da temperatura, com pequena redução na porcentagem de celulose nas condições mais severas (geralmente acima de 220 °C e longo tempo de reação). Isso ocorre porque, como relatado na literatura, a decomposição térmica da hemicelulose ocorre a partir de 180 a 220 °C e as ligações aril éter em lignina são suscetíveis à quebra em temperatura acima de 180 °C [139].

O glicerol nessa faixa de temperatura penetra na biomassa dilatando a parede celular. Por serem altamente polar, as moléculas de glicerol são atraídas para a estrutura da biomassa e mantidas por forças de ligação de hidrogênio, facilitando a remoção de lignina e cadeias laterais de hemicelulose [30, 142]. Zhang et al. [139], ao estudarem o fracionamento de madeira pelo processamento térmico com glicerol, observaram que a área superficial duplicou quando a biomassa foi processada a 220 °C por 8 min, fato que pode facilitar a ação das enzimas na posterior hidrólise enzimática.

O trabalho de Zhang et al. [139] também discute que com o solvente glicerol, nas condições de temperaturas que levam a decomposição térmica da hemicelulose e fragmentação da lignina, ocorre mínima formação de produtos de degradação. Afirmaram ainda que o glicerol previne a desidratação, evitando a clivagem de ligações glicosídicas, podendo servir como fonte de abstração de

hidrogênio, o que possibilita a recuperação de componentes em forma menos modificada.

A água é usada no pré-tratamento de biomassas a temperaturas altas, processo hidrotérmico, solubilizando, por auto-hidrólise, parte da hemicelulose e lignina [143]. Entretanto, no presente trabalho ficou evidente que usar água em conjunto com o glicerol reduz a eficiência do processo. Trabalhos que estudaram pré-tratamento organosolv com glicerol aquoso em diferentes proporções [24, 29] obtiveram melhores resultados com o menor teor de água, corroborando com esse estudo. Nota-se, pelo modelo ajustado, que a presença de água no glicerol reduz a eficiência em qualquer proporção, mas pequena quantidade de água, no limite de 5%, não tem efeito negativo tão expressivo.

Não se encontrou na literatura trabalhos que fizeram um estudo amplo, como o feito nesse, sobre a presença de água no glicerol, nem tão pouco discussão acerca dos efeitos negativos que a presença de água causa na liberação de açúcares. Possivelmente, as interações de hidrogênio que ocorrem entre o glicerol e a água impedem ou dificultam, a depender da proporção, a interação do glicerol com os constituintes da biomassa. E, como o processo é realizado à pressão atmosférica a água não exerce um efeito, uma vez que evapora a 100 °C. A evaporação da água impediu que o sistema atingisse 220 °C, mesmo sendo aquecido a essa temperatura antes da imersão do reator. Observou-se que com 40% de água a temperatura do sistema reacional estabilizou a 160 °C com sólido/líquido a 1%, e a 185 °C com sólido/líquido a 6%.

O trabalho de Hilares et al. [144] avaliou o pré-tratamento organosolv com glicerol sobre o bagaço de cana, com relação as variáveis em comum, mesmo que estudadas em faixas diferentes, os resultados apresentaram a mesma tendência que os deste, ou seja, melhor rendimento na hidrólise foi obtido na maior temperatura, maior teor de glicerol, menor tempo e menor carga sólida, que não foi significativa para a resposta e pode ser mantida no nível superior. Assim, os resultados do trabalho citado em conjunto com os desse estudo corroboram para uma otimização do processo de pré-tratamento organosolv com glicerol para diferentes biomassas.

4.1.1.1 Estudo na Condição Ótima com a Adição de Sais de Ferro

A adição de FeCl_3 ao processo de pré-tratamento organosolv com glicerol, na condição ótima segundo o planejamento experimental, mostrou-se promissora. Na faixa estudada, a concentração de $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ foi a mais favorável, a qual proporcionou um melhoramento no resultado da hidrólise enzimática em torno de 14%, onde o rendimento em açúcares redutores totais obtido pelo método DNS foi $51 \pm 3\%$, com experimentos realizados em triplicata. A concentração de $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ não proporcionou um aumento expressivo no rendimento, a de $0,075 \text{ mol.L}^{-1}$ elevou o rendimento em 8%, e a de $0,125 \text{ mol.L}^{-1}$ não proporcionou melhoria no rendimento em relação a de $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$.

Com isso, a quantidade ideal determinada do aditivo FeCl_3 foi $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, por proporcionar redução na recalcitrância com quantidade moderada do aditivo. Essa concentração de FeCl_3 também foi a ideal em outros estudos, como: pré-tratamento ethanosolv da palha de cevada [145], e pré-tratamento da palha de milho com água quente [36].

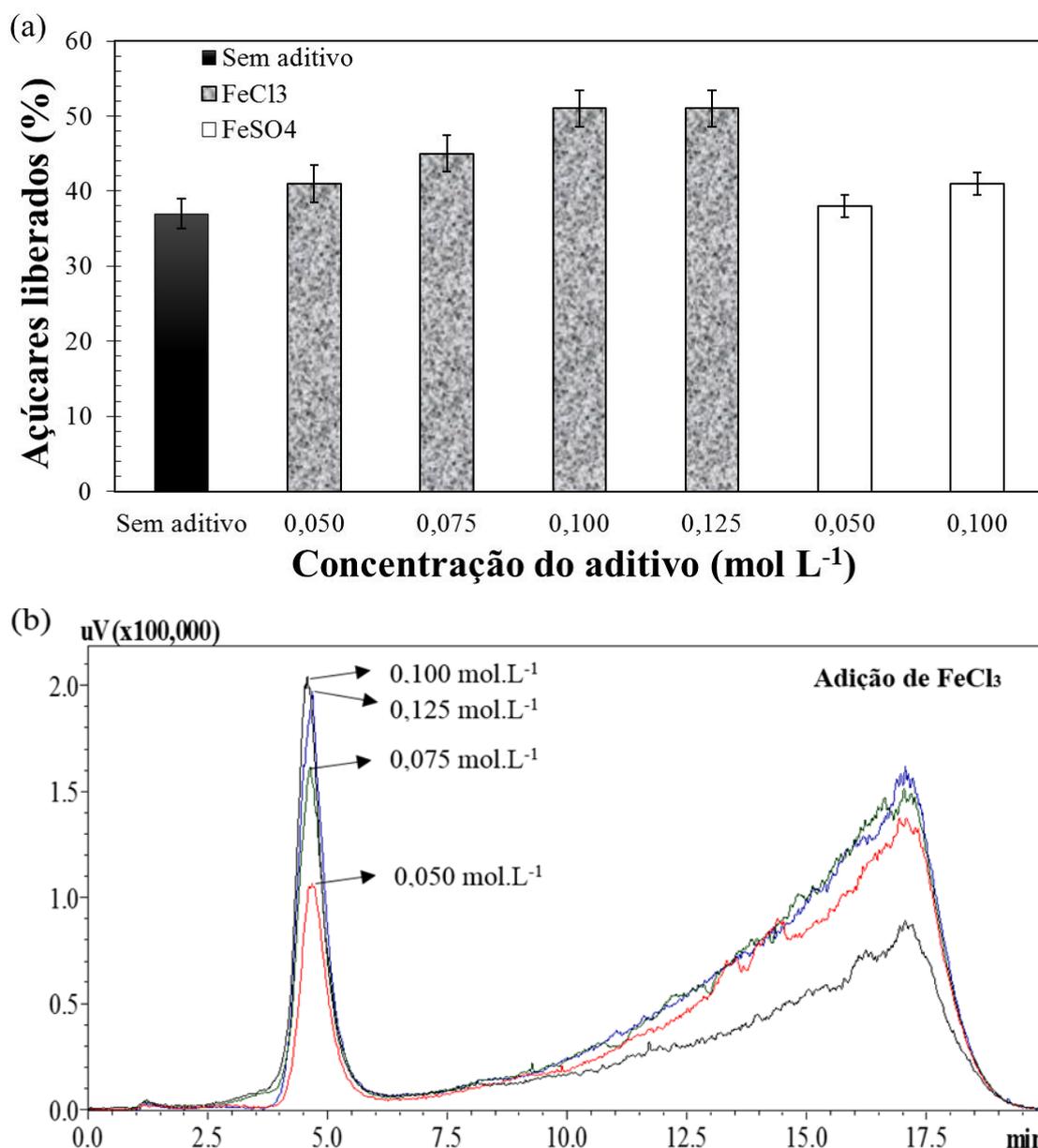
Romero et al. [37], ao realizar o pré-tratamento da palha de colza com soluções aquosas de FeCl_3 , obtiveram rendimento em açúcar na hidrólise enzimática de 53%, muito semelhante ao obtido nesse trabalho ($51 \pm 3\%$, com $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de FeCl_3). Eles obtiveram tal resultado a uma temperatura menor ($138 \text{ }^\circ\text{C}$), entretanto foi necessário o dobro da concentração de FeCl_3 ($0,25 \text{ mol.L}^{-1}$) durante 20 min de reação.

Diferentemente da adição de FeCl_3 , a adição de FeSO_4 , estudada nas concentrações $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ e $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, proporcionou uma melhoria pouco expressiva na liberação de açúcares. Esse resultado também está de acordo com dados reportados na literatura [36, 145].

A Figura 22a apresenta os resultados obtidos com os sais de ferro comparando-os com a condição otimizada do planejamento experimental sem aditivos. E a Figura 22b apresenta os cromatogramas sobrepostos obtidos para as diferentes concentrações de cloreto férrico, que confirmam os dados obtidos por meio do método DNS e revelam que os açúcares liberados são unicamente hexoses, não sendo observados a presença de picos no tempo de retenção 2,5 min, que no método utilizado são provenientes da presença de pentoses. Com

isso, conclui-se que o conteúdo total de hexoses é proveniente da celulose e constitui-se unicamente por glicose.

Figura 22: Valores percentuais de açúcares liberados em 24 h de hidrólise enzimática para a condição ótima: (a) obtidos pelo método DNS para o aguapé pré-tratado com e sem aditivos; (b) obtido por HPLC para o aguapé pré-tratado com a adição de cloreto férrico em diferentes concentrações.



Os resultados atingidos com a adição de sais de ferro ao pré-tratamento organosolv com glicerol revelaram que sais metálicos também apresentam potencial efeito catalítico no solvente glicerol. Assim, o uso desses sais em

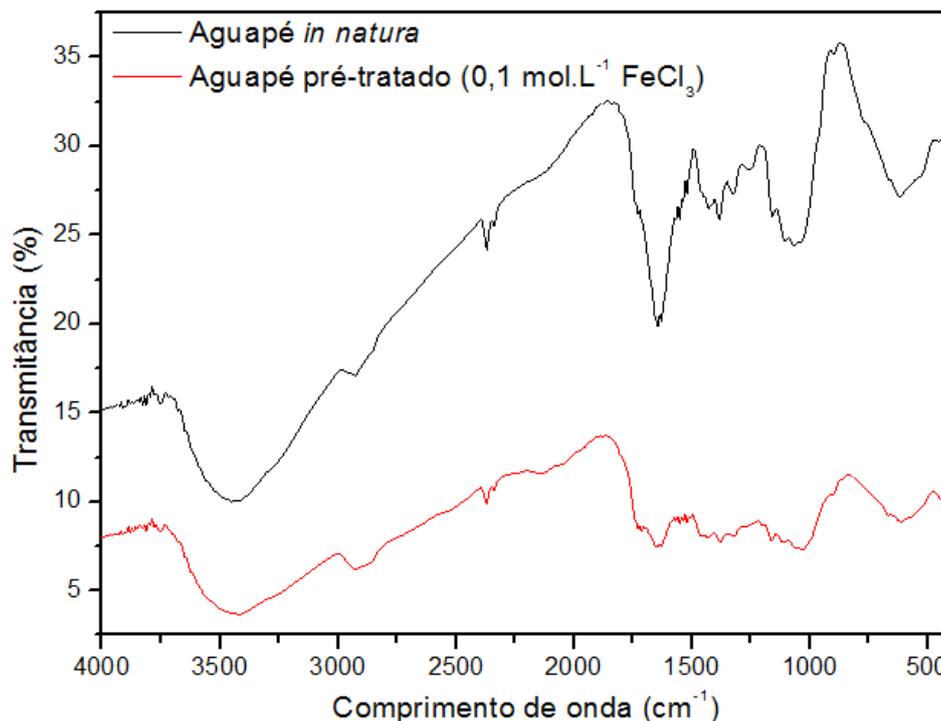
conjunto com o glicerol torna o processo mais viável por reduzir o consumo de água e aproveitar um resíduo da indústria do biodiesel.

A comparação da composição da biomassa aguapé *in natura* (lignina: $12,0 \pm 1,5\%$; hemicelulose: $13,8 \pm 0,5\%$; e celulose $25,5 \pm 0,9\%$) com a da biomassa aguapé pré-tratada com FeCl_3 $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (lignina: $20,3 \pm 0,5\%$; hemicelulose: $3,7\% \pm 0,2$; celulose: $53,7 \pm 2,0\%$) confirmou que ocorreu o fracionamento da biomassa (recuperação sólida de $22,9\%$). A remoção da fração hemicelulósica para o licor foi o principal fator responsável pela redução da recalcitrância. Foi evidente que o pré-tratamento organosolv com glicerol na presença de FeCl_3 proporcionou alta remoção de hemicelulose ($93,9\%$) e considerável deslignificação ($61,3\%$). Assim, a celulose preservada na fração sólida apresentou alta digestibilidade enzimática ($85\text{-}100\%$).

Espectros de FTIR obtidos para a biomassa *in natura* e pré-tratada com $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de FeCl_3 (Figura 23) evidenciam as modificações estruturais ocasionadas pelo pré-tratamento. Alterações significativas foram observadas na região de 1800 a 800 cm^{-1} , que corresponde as principais vibrações químicas de materiais lignocelulósicos. Bandas na região de $1500 - 1240 \text{ cm}^{-1}$, atribuídas a lignina, apresentaram redução no espectro da biomassa pré-tratada, indicando menor conteúdo de lignina. Além de redução significativa da banda a 1730 cm^{-1} relacionada a interações entre hemicelulose e lignina. Observa-se também redução a 1045 e 897 cm^{-1} que indicam, respectivamente, perda de hemicelulose e enfraquecimento das ligações glicosídicas em hemicelulose e celulose [3, 24, 45].

A alta digestibilidade da celulose, 85% com 24 h de hidrólise e 100% após 48 h , viabiliza a geração de energia a partir do aguapé. A recuperação da celulose na biomassa pré-tratada foi de 48% , e a conversão de 85% dessa resultou em um rendimento de $4,2 \text{ g.L}^{-1}$ de glicose no hidrolisado, que corresponde a 508 mg de glicose/g de aguapé pré-tratada, e a 12 g de glicose/100 g de aguapé *in natura*. Após 48 h o rendimento atingiu 600 mg de glicose/g de aguapé pré-tratada.

Figura 23: Espectros de FTIR da biomassa aguapé *in natura* e pré-tratada (0,1 mol.L⁻¹ FeCl₃).



Diante da composição em celulose e hemicelulose da biomassa em estudo, a máxima produção de açúcar é 44 g/100 g de aguapé *in natura*. A elevada taxa de crescimento do aguapé e seu baixo custo indicam que a quantidade de glicose produzida no hidrolisado é viável, uma vez que permite a conversão de uma erva daninha em um produto que poderá ser diretamente transformado em energia (etanol) por um micro-organismo.

A comparação desses resultados com alguns descritos na literatura, confirma que são promissores. Zhang et al. [45], ao estudarem métodos de pré-tratamento microbiano, obtiveram um rendimento máximo de 430,66 mg de açúcares redutores/g de aguapé pré-tratada. Esse resultado corresponde a uma mistura de pentoses e hexoses no hidrolisado, sendo que a melhor produção de glicose foi 182,35 mg.g⁻¹. Assim, o resultado do presente estudo é melhor e mais seletivo, uma vez que produz apenas glicose no hidrolisado.

Das et al. [3] (pré-tratamento alcalino) e Xu et al. [9] (pré-tratamento com microemulsões de líquido iônico) obtiveram, respectivamente, 561,8 e 563,7 mg de açúcares redutores totais no hidrolisado/g de aguapé pré-tratada. Resultados

semelhantes ao desse estudo, mas sem seletividade para a produção de glicose, usando técnicas de pré-tratamento menos viáveis.

4.2. Atuação do Ferro nas Reações de Pré-Tratamento

Apesar do mecanismo de atuação dos sais metálicos em pré-tratamento de biomassas ainda não ter sido completamente elucidado, a literatura indica que os íons metálicos dissolvidos atuam como ácidos de Lewis atraindo pares de elétrons. Assim, enfraquecem ligações do tipo C-O-C e CH₂OH nos constituintes poliméricos da biomassa, o que facilita a quebra, reduzindo a recalcitrância da biomassa pela fragmentação da hemicelulose e lignina [35, 146]. Alguns estudos mostram, inclusive, que esses ácidos de Lewis apresentam efeito mais pronunciado que soluções de ácido clorídrico e sulfúrico nas mesmas condições, e no mesmo valor de pH [36, 32].

O presente trabalho possibilitou uma melhor compreensão acerca da atuação do ferro nas reações de pré-tratamento ao estudar fontes distintas desse metal: a ferrita de cobalto (CoFe₂O₄), o cloreto de ferro III (FeCl₃) e o sulfato de ferro II (FeSO₄). A CoFe₂O₄, sólido cristalino com estrutura do tipo espinélio invertido, constituída tanto por óxido de ferro II (FeO) quanto por óxido de ferro III (Fe₂O₃), não apresentou atividade nas reações de pré-tratamento. O FeSO₄ teve efeito pouco expressivo e o FeCl₃ apresentou efeito considerável. Tal comportamento reforça que os sais de ferro, e os sais metálicos em geral, atuam como ácidos de Lewis em pré-tratamento de biomassas.

Na ferrita os átomos de ferro no estado de oxidação +2 e +3 (Fe²⁺ e Fe³⁺) estão conectados, em uma estrutura tridimensional, a átomos de oxigênio (O²⁻) em posições fixas, formando sítios tetraédricos e octaédricos. Desse modo, não podem interagir como ácidos de Lewis com a biomassa, uma vez que seus sítios de coordenação já estão preenchidos com pares de elétrons dos átomos de oxigênio da rede, formando uma estrutura eletricamente neutra. Caso a ferrita, mesmo com essas características estruturais, exibisse atividade, a atuação como ácido de Lewis não seria o mecanismo predominante.

Ao contrário da ferrita, o sal FeCl₃ dissolve-se no glicerol originando os íons Fe³⁺ e Cl⁻. O ferro iônico na forma trivalente pode atuar facilmente como

ácido de Lewis enfraquecendo e causando ruptura das ligações glicosídicas. O FeSO_4 também se dissolve, originando os íons Fe^{2+} e SO_4^{2-} . O ferro divalente atua como ácido de Lewis, porém o efeito menos pronunciado com a sua utilização está relacionado ao tamanho do íon.

O íon Fe^{3+} é menor conseqüentemente há distâncias menores entre o metal e o ligante, propiciando interações mais fortes entre o metal e os sítios doadores de elétrons na biomassa, ocasionando um maior número de rupturas das ligações C-O-C, C-O, entre outras. No caso do Fe^{2+} , como as interações são mais fracas devido ao maior tamanho do íon, ocorre um número significativamente menor de rupturas das ligações entre os constituintes da biomassa.

Essa explicação relaciona-se com a dureza e o caráter ácido do cátion, sugerida pelos trabalhos de Constant et al. [35] e Kamireddy et al. [146]. O Fe^{3+} é mais duro, justamente por ser um íon menor, menos polarizável, além disso é um ácido de Lewis mais forte (pK_a do Fe^{3+} : 2,46; pK_a do Fe^{2+} : 9,49). Há também uma contribuição da carga, íon trivalente interage mais efetivamente que íon divalente, o que sugere uma explicação para o resultado inferior obtido com os ácidos de Bronsted-Lowry.

Contudo, os trabalhos de Liu et al. [36] e Kim et al. [145] demonstram que mesmo o $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, sulfato de ferro III, proporciona resultado inferior ao FeCl_3 , apesar de ambos os átomos de ferro estarem no estado de oxidação +3. Liu et al. [36] apenas concluíram que o efeito do íon Cl^- é maior que o do íon SO_4^{2-} . Na verdade, esses dois íons negativos são bases fracas, porém o SO_4^{2-} é uma base menos fraca que o Cl^- , ou seja, tem mais dificuldade de estabilizar a carga negativa, assim o $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ dissocia-se em extensão um pouco menor que o FeCl_3 . Como com esse último há mais íons Fe^{3+} dissolvidos o resultado é melhor.

As observações feitas para a atuação do ferro podem ser expandidas a outros sistemas metálicos. Porém, o FeCl_3 é o sal metálico que vem se mostrando mais promissor [36, 145]. O AlCl_3 é, dentre os sais já testados, o que apresenta efeito mais semelhante ao do FeCl_3 . Entretanto, como indicam os trabalhos de Degenstein et al. [33] e Kamireddy et al. [146] a maior dureza do

AlCl_3 conduz a degradações indesejadas, formação de furfural e hidroximetilfurfural, de forma bem mais pronunciada do que com o FeCl_3 .

4.3 Planejamento Fatorial 2³

A composição das biomassas *in natura*, mostrada na Tabela 10, indica que todas são apropriadas para a produção do etanol de segunda geração, uma vez que apresentam elevado teor de carboidratos. Com destaque para o bagaço de cana e a palha de milho que possuem os maiores teores de celulose e hemicelulose. A casca de coco se destaca pela elevada quantidade de lignina, que está associada à sua rigidez característica. O aguapé apresentou um elevado teor de cinzas provavelmente relacionado com a habilidade que esta planta aquática tem de remover impurezas dos corpos d'água, inclusive metais pesados.

Tabela 10: Composição das quatro biomassas *in natura* avaliadas nesse trabalho.

Biomassa	Composição (%)					
	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Cinzas	Umidade	Extrativos
Aguapé	25,5 ± 0,9	13,8 ± 0,5	12,0 ± 1,5	17,4 ± 0,12	8,3 ± 0,2	14,8
B. cana	32,8 ± 0,5	25,2 ± 1,5	18,9 ± 2,4	1,4 ± 0,01	6,6 ± 0,1	11,9
P. milho	35,1 ± 0,8	29,5 ± 1,9	7,0 ± 0,2	2,3 ± 0,07	7,1 ± 0,2	11,2
C. coco	26,3 ± 0,3	14,1 ± 1,0	27,2 ± 0,4	5,0 ± 0,01	6,4 ± 0,1	17,3

Apesar de cada uma das biomassas possuir uma composição característica, quando se considera apenas o teor de celulose, componente de maior interesse para a produção de bioetanol, as diferenças não são muito altas. A composição pode sofrer alteração com a região e a época de coleta. Avaliando-se trabalhos disponíveis na literatura observou-se que as biomassas desse estudo apresentaram composição comparável [9, 47, 57, 146].

O rendimento sólido da biomassa pré-tratada, apresentado na Tabela 11, é o primeiro indicativo do modo de atuação do pré-tratamento sobre a estrutura da biomassa *in natura*. Um rendimento sólido alto indica pouca alteração

estrutural (pequena remoção de lignina e hemicelulose) e, conseqüentemente, pequena redução da recalcitrância. Enquanto, um rendimento sólido baixo pode indicar degradação excessiva, com remoção indesejada da celulose. Em ambos os casos o resultado é um baixo rendimento em açúcares no hidrolisado, sendo preciso encontrar uma situação de equilíbrio.

Observando-se a Tabela 11, percebe-se que o rendimento sólido, para todas as biomassas, variou bastante com a condição do pré-tratamento. O experimento 2 proporcionou a menor perda de massa, enquanto o experimento 7 ocasionou a maior redução mássica. Resultado decorrente da combinação oposta de variáveis. O ensaio 2 foi realizado com as condições mais brandas de temperatura e concentração de FeCl_3 , além do maior tamanho de partícula. Por sua vez, o ensaio 7 foi realizado nas condições mais severas de temperatura e quantidade de catalisador, junto com o menor tamanho de partícula, que por apresentar maior área superficial tende a ter sua estrutura afetada mais facilmente.

Tabela 11. Matriz de planejamento do fatorial 2³ com as respostas: rendimento sólido (%); e açúcares totais liberados (%) em 24 h de hidrólise enzimática.

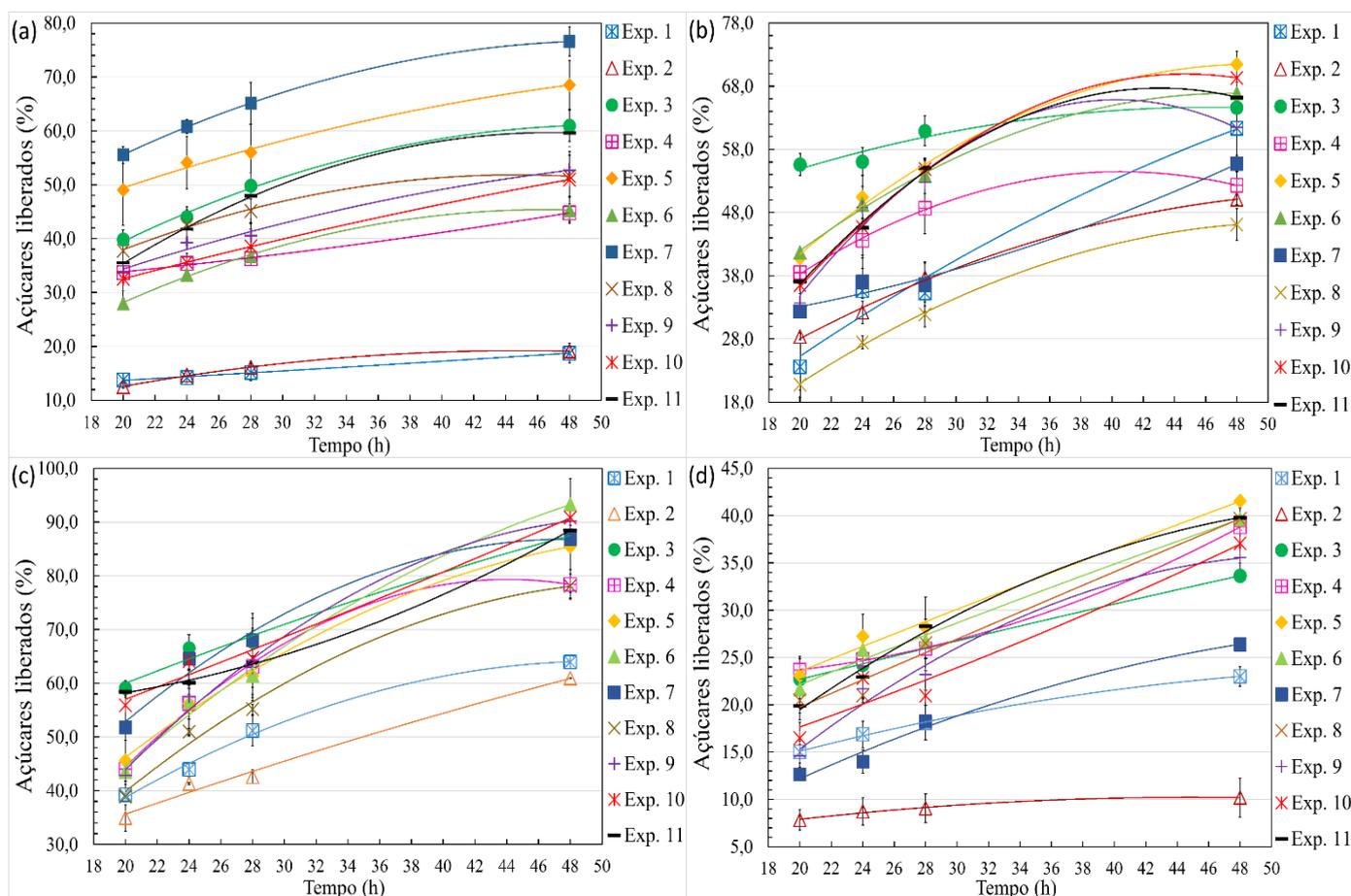
Ensaio	Variáveis			Respostas							
	(valores codificados entre parênteses)			Rendimento sólido				Açúcares liberados (24 h)			
	T. partícula (mm) (1)	Conc. FeCl ₃ (mol.L ⁻¹) (2)	Temperatura (°C) (3)	Rendimento sólido (%)				Açúcares liberados (24 h) (%)			
			Aguapé	B. cana	P. milho	C. coco	Aguapé	B. cana	P. milho	C. coco	
1	< 0,85 (-1)	0,025 (-1)	160 (-1)	62,5	49,1	44,6	52,6	14,2	35,6	43,9	16,9
2	> 2,0 (+1)	0,025 (-1)	160 (-1)	87,3	85,4	46,6	86,9	14,7	32,2	40,9	8,7
3	< 0,85 (-1)	0,175 (+1)	160 (-1)	28,3	36,0	23,6	27,2	44,0	56,0	66,6	24,3
4	> 2,0 (+1)	0,175 (+1)	160 (-1)	66,5	50,0	33,4	48,5	35,4	43,6	55,7	24,8
5	< 0,85 (-1)	0,025 (-1)	220 (+1)	37,0	35,0	27,6	34,0	54,1	50,5	56,3	27,2
6	> 2,0 (+1)	0,025 (-1)	220 (+1)	44,6	37,6	33,1	57,0	33,3	49,3	56,3	25,8
7	< 0,85 (-1)	0,175 (+1)	220 (+1)	15,5	11,7	14,9	13,4	60,8	37,0	64,5	14,0
8	> 2,0 (+1)	0,175 (+1)	220 (+1)	16,0	19,1	15,9	16,0	42,7	27,5	51,0	21,0
9	0,85-2,0 (0)	0,1 (0)	190 (0)	38,8	39,1	28,6	33,7	39,3	48,8	57,4	21,7
10	0,85-2,0 (0)	0,1 (0)	190 (0)	37,4	35,4	27,5	27,3	35,5	45,7	63,6	22,8
11	0,85-2,0 (0)	0,1 (0)	190 (0)	39,0	37,1	29,9	32,2	41,7	45,6	59,6	22,9

Quando se observa a porcentagem de açúcares liberados (Tabela 11), o experimento 7 proporcionou um maior rendimento quando comparado ao experimento 2, mas a diferença só foi expressiva para o aguapé. Outras condições de pré-tratamento proporcionaram liberação de açúcares equivalente ou melhor que a do ensaio 7.

A Figura 24 (a-d) apresenta a influência que a condição de pré-tratamento exerce sobre a liberação de açúcares no processo de sacarificação enzimática, desde 20 h até 48 h. Evidencia-se que apenas no caso do aguapé (Figura 24a) as condições do experimento 7 foram as que conduziram a melhor liberação de açúcares, que tendeu a igualasse a do experimento 5, considerando o desvio

padrão. Assim, provavelmente, o baixo rendimento sólido foi acompanhado de perda excessiva de celulose.

Figura 24: Porcentagem de açúcares liberados em função do tempo de hidrólise enzimática para as quatro biomassas avaliadas: (a) aguapé; (b) bagaço de cana; (c) palha de milho; (d) casca de coco.



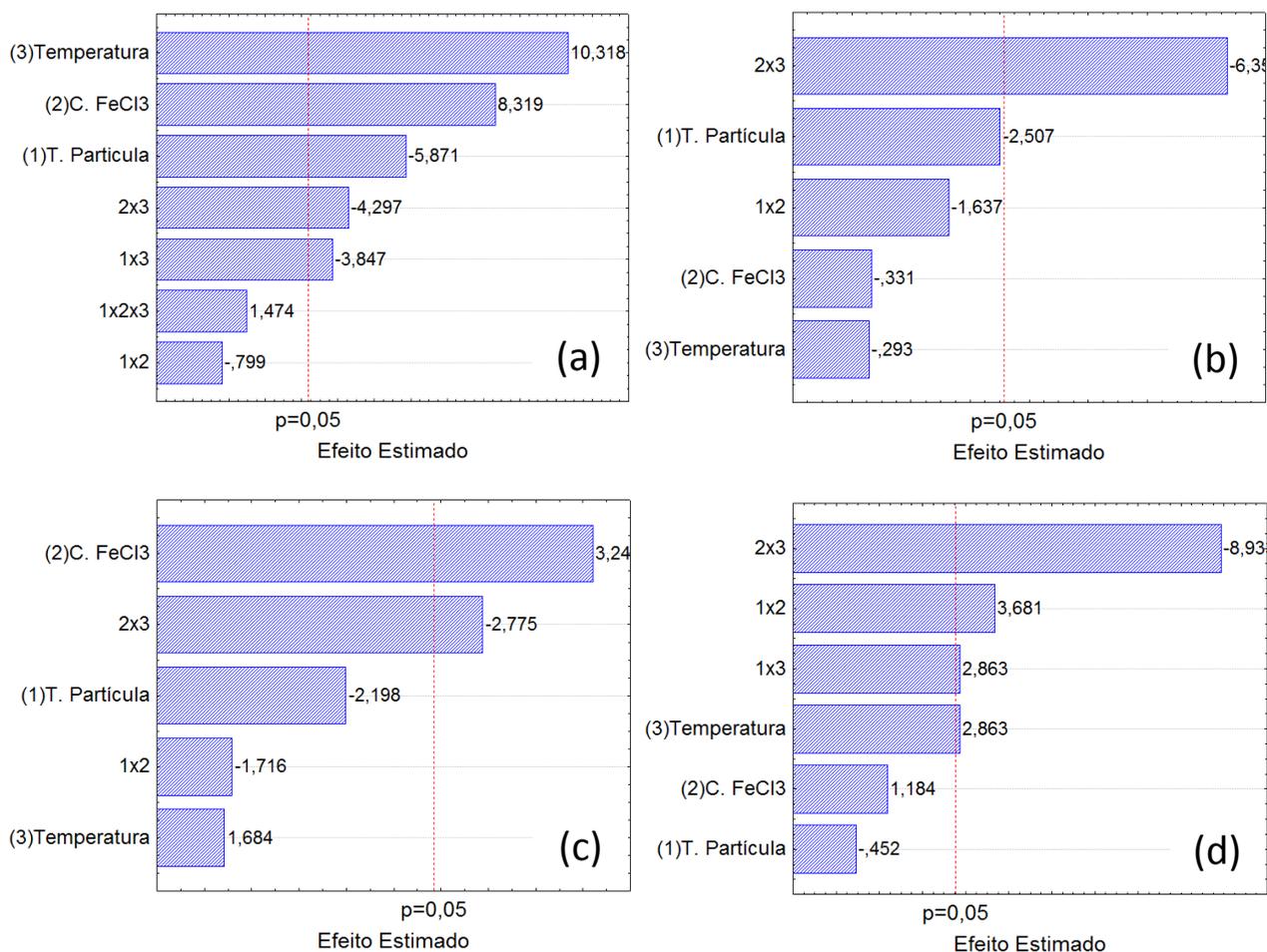
Ficou evidente, na Figura 24 (a-d) que o ensaio 2 foi um dos menos eficiente, neste caso devido a pequena alteração estrutural. A ineficiência do mesmo foi equivalente a do experimento 1 para o aguapé (Figura 24a), se confundiu com as dos experimentos 1, 7 e 8 para o bagaço de cana (Figura 24b), e foi a maior no caso da palha de milho (Figura 24c) e da casca de coco (Figura 24d).

4.3.1. Análise Estatística

A análise estatística dos efeitos foi utilizada para obter uma melhor compreensão da influência de cada variável. Para a realização da mesma utilizou-se o rendimento em açúcares totais obtido no tempo médio de sacarificação enzimática, ou seja, 24 h (Tabela 11).

A estimativa do efeito de cada variável sobre a liberação de açúcares pode ser vista na Figura 25, no formato de um diagrama de pareto que facilita a visualização dos efeitos que são significativos. Nesse diagrama, valores de $t_{\text{calculado}}$ fornecem as alturas das barras, e o valor de t_{tabelado} , relacionado aos graus de liberdade do resíduo, fornece o limite a partir do qual os efeitos são significativos para a resposta, considerando-se aqui o nível de significância de 5% ($p\text{-valor} \leq 0,05$).

Figura 25: Diagrama de Pareto mostrando quais efeitos foram significativos considerando o nível de significância de 5% (0,05): (a) agupapé; (b) bagaço de cana; (c) palha de milho; (d) casca de coco.



Para o aguapé (Figura 25a) foram significativos os efeitos principal da temperatura (3), da concentração de FeCl_3 (2) e do tamanho de partícula (1), nessa ordem de significância. Assim como, as interações de dois fatores: concentração de FeCl_3 x temperatura (2x3) e tamanho de partícula x temperatura (1x3). Apenas a interação tamanho de partícula x concentração de FeCl_3 (1x2) e a interação entre as três variáveis não foram significativas para a resposta.

A temperatura, nesse novo planejamento, continuou exercendo forte influência no pré-tratamento do aguapé. Permaneceu sendo a variável de maior efeito positivo sobre a liberação de açúcares. Indicando, mais uma vez, que a alteração estrutural do aguapé é facilitada em temperaturas elevadas (220 °C). A concentração de FeCl_3 também exibiu efeito positivo sobre a porcentagem de açúcares liberados, ou seja, melhores rendimentos foram favorecidos na concentração mais alta (0,175 mol.L⁻¹). Por sua vez, o tamanho de partícula exerceu um considerável efeito negativo, mostrando que o aumento da área superficial, conseguido pela redução do tamanho de partícula, favoreceu a reação de pré-tratamento.

O ensaio 7, que para o aguapé proporcionou a maior liberação de açúcares (Figura 24a), foi realizado com essas três variáveis mantidas nos níveis ótimos, segundo a análise estatística (220 °C; 0,175 mol.L⁻¹; < 0,85 mm). Entretanto, os efeitos de interação entre temperatura e concentração de FeCl_3 , que foi negativo, bem como temperatura e tamanho de partícula, revelaram ser possível obter bons resultados fazendo-se outras combinações.

Avaliando-se a Figura 24a, nota-se que o experimento 5, realizado com a concentração de FeCl_3 reduzida ao nível baixo (0,025 mol.L⁻¹), atingiu um rendimento não muito inferior ao do 7, por manter a temperatura no nível alto (220 °C) e o tamanho de partícula no nível baixo (< 0,85 mm). O experimento 3 também proporcionou liberação aceitável, mesmo sendo realizado a 160 °C, temperatura desfavorável para o aguapé. O que só foi possível porque a concentração de FeCl_3 foi mantida no nível alto, além do menor tamanho de partícula.

Para o bagaço de cana, o diagrama de pareto (Figura 25b) mostra que só foi significativo para a resposta o efeito de interação entre concentração de FeCl_3

e temperatura (2x3). O efeito do tamanho de partícula tendeu a ser significativo, ficou bem próximo ao limite. Já o efeito principal da temperatura e da concentração de FeCl_3 , em contraste com o aguapé, foram os menos significativos. Ambos foram negativos, indicando que a passagem do nível inferior para o superior causou uma diminuição na resposta. Mas, como há interação significativa, os efeitos devem ser interpretados em conjunto.

Nota-se, na Figura 24b, que os experimentos que conduziram a maior liberação de açúcares na hidrólise enzimática foram os realizados mantendo-se uma situação de equilíbrio entre essas variáveis. Manter tanto a temperatura quanto a concentração de FeCl_3 no nível baixo ou alto, reduz o rendimento (Exp. 8; 2). Assim, no caso do bagaço de cana, é preciso controlar a severidade do pré-tratamento. Ao se aumentar o nível da temperatura deve-se manter o nível da concentração de FeCl_3 baixo e vice-versa (ensaios 5; 3). A condição do ponto central também foi favorável.

No caso da palha de milho, observa-se no diagrama de pareto (Figura 25c) que foram significativos o efeito principal da concentração de FeCl_3 e o efeito de interação entre essa mesma variável e a temperatura (2x3). Com o efeito positivo da concentração de FeCl_3 , os ensaios realizados com esse fator no nível superior exibiram liberação de açúcares semelhante e satisfatória (3; 4; 7; 8). Além disso, o efeito de interação significativo 2x3, possibilitou que os ensaios onde a concentração de FeCl_3 foi mantida no nível baixo exibissem bons resultados desde que a temperatura estivesse no nível alto (5; 6). A condição central, experimentos 9, 10 e 11, também forneceu um equilíbrio favorável (Figura 24c).

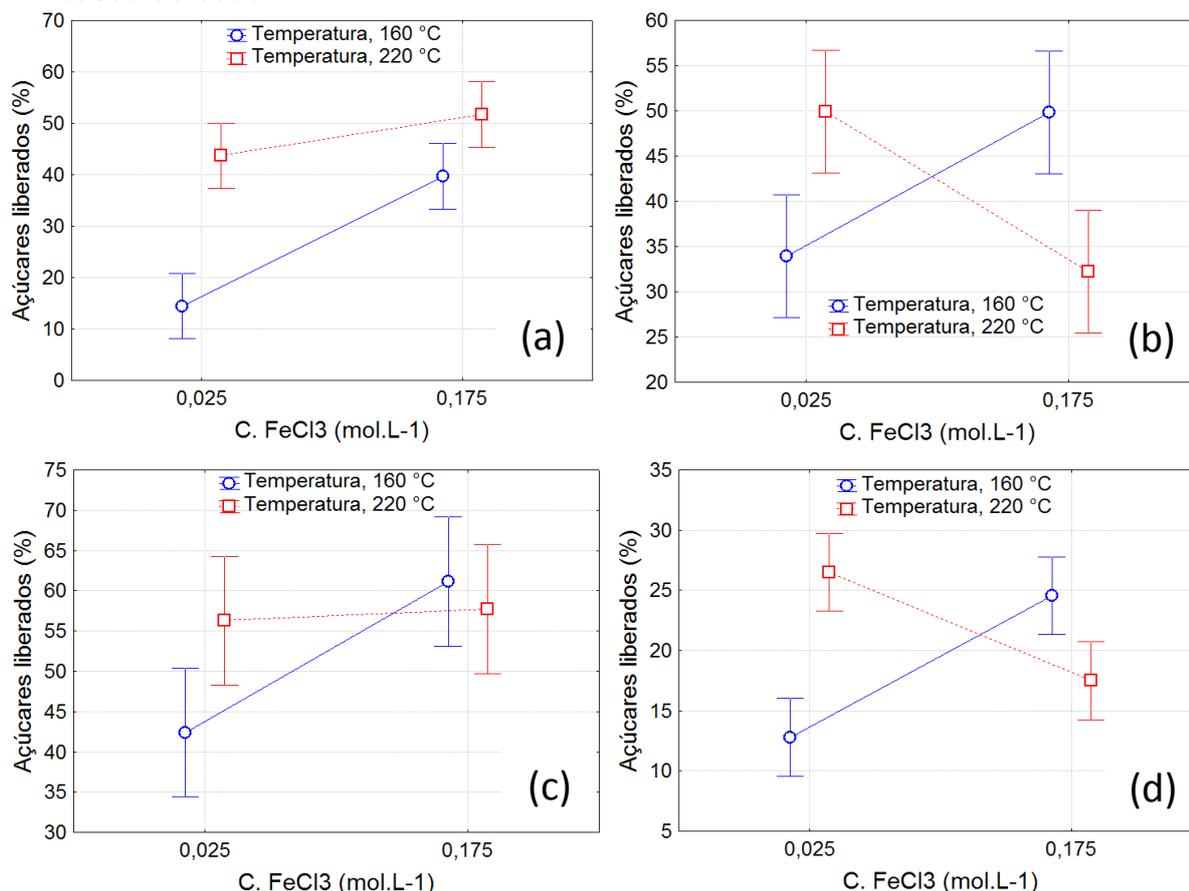
O diagrama de pareto da casca de coco (Figura 25d) mostra que o efeito mais significativo para a liberação de açúcares foi o da interação entre concentração de FeCl_3 x temperatura (2x3), seguido dos efeitos de interação entre tamanho de partícula x concentração de FeCl_3 (1x2) e tamanho de partícula x temperatura (1x3), além do efeito principal da temperatura que foi significativo e positivo. Assim, nota-se que para a casca de coco uma combinação apropriada entre as variáveis é fundamental para se atingir uma liberação de açúcares satisfatória no processo de sacarificação enzimática.

O efeito negativo da interação concentração de FeCl_3 x temperatura (2x3) indica que o aumento simultâneo no nível dessas duas variáveis irá elevar demasiadamente a severidade da reação, conduzindo a um baixo rendimento devido a degradação excessiva. Além disso, os efeitos positivos das interações 1x2 e 1x3 revelam que ao se aumentar a concentração de FeCl_3 (2) e a temperatura (3) é mais indicado que o tamanho de partícula (1) seja, também, mantido no nível superior ($> 2,0$ mm), de modo a evitar excesso de alteração estrutural.

Com isso, fica notório que o baixo rendimento do experimento 7 (Figura 24d) foi devido a uma combinação severa e desfavorável entre os três fatores, e que a maior liberação proporcionada pelo experimento 5, seguido do 6, 4, 3 e dos ensaios da condição central, foi decorrente de um balanceamento favorável entre os níveis das variáveis estudadas.

A análise dos efeitos revelou que a realização do planejamento experimental foi importante para se alcançar um melhor entendimento sobre a influência das variáveis nas reações de pré-tratamento, principalmente porque possibilitou identificar a existência de interação entre as mesmas, evidenciando que as variáveis se influenciam mutuamente, e assim, o nível ideal para uma depende do nível da outra. Para todas as biomassas a interação concentração de FeCl_3 (2) x temperatura (3) foi significativa para a resposta. A Figura 26 (a-d) ilustra essa interação para as quatro biomassas, facilitando a compreensão do seu efeito.

Figura 26: Ilustração da Interação significativa entre as variáveis concentração de FeCl_3 e temperatura: (a) aguapé; (b) bagaço de cana; (c) palha de milho; (d) casca de coco.



Para o aguapé, Figura 26a, quando a temperatura se encontra no nível baixo (160 °C) o aumento na concentração de FeCl_3 conduz a um aumento expressivo na quantidade de açúcares liberados. Contudo, quando a temperatura está no nível alto (220 °C) o efeito provocado pela maior concentração de FeCl_3 é bem sutil. Situação bem semelhante ocorre para a palha de milho (Figura 26c).

Nos casos do bagaço de cana (Figura 26b) e da casca de coco (Figura 26d) observa-se que quando o valor da temperatura de pré-tratamento é 160 °C a liberação de açúcares na hidrólise enzimática é favorecida com a concentração de FeCl_3 no nível mais elevado. Porém, quando a biomassa é pré-tratada a 220 °C a utilização da maior concentração do catalisador é desfavorável (degradação excessiva).

Nota-se que para as quatro biomassas é mais favorável manter a temperatura de pré-tratamento a 220 °C e reduzir bastante a quantidade de catalisador (redução de 86%), melhorando a viabilidade econômica (menor consumo de reagente) e também ambiental (efluente final menos contaminado). Mostrando que para a identificação da condição ideal é preciso uma avaliação detalhada de todo o processo.

No caso do aguapé, fica evidente na Figura 24a que o experimento 7 foi o que proporcionou a melhor liberação de açúcares. Em contrapartida, foi realizado com o catalisador no nível alto, o que torna o ensaio 5 mais viável, pela grande redução na quantidade usada de catalisador, sem redução expressiva no rendimento.

A condição mais severa do experimento 7 ocasionou uma maior alteração estrutural, facilitando o acesso das enzimas, melhorando, com isso, a conversão da celulose em glicose. Entretanto, essa melhor digestibilidade enzimática foi acompanhada de baixo rendimento sólido (Tabela 11), provavelmente, associada a degradação excessiva da celulose. Diante disso, ao se considerar o rendimento de todo o processo, ou seja, a liberação de açúcares a partir de toda a massa pré-tratada, o experimento 5 possuirá maior liberação, considerando seu maior rendimento sólido. Assim, a condição de pré-tratamento do experimento 5 foi considerada a ideal para o aguapé.

Ao se comparar a nova otimização do pré-tratamento do aguapé, por meio do planejamento 2^3 (220 °C; 0,025 mol.L⁻¹; > 0,85 mm), com a otimização anterior, percebe-se que ocorreu um melhoramento do processo. Uma vez que se alcançou, aproximadamente, o mesmo rendimento em açúcares em 24 h de hidrólise enzimática (54% ± 5, atual; 51% ± 3, anterior) utilizando concentração de FeCl₃ 75% menor. Sendo importante frisar que o único fator responsável por esse menor consumo de catalisador foi a redução do tamanho de partícula. Assim, para o aguapé o aumento da área superficial da biomassa, pela redução da partícula, facilitou a alteração estrutural permitindo reduzir a quantidade de catalisador.

Para o bagaço de cana a condição de pré-tratamento do ensaio 5 também foi considerada a ideal. Quando se observa a Figura 24b percebe-se que em 24

h de hidrólise o ensaio 3 se destaca, contudo, no final da hidrólise o experimento 5 apresentou melhor liberação. Além disso, o experimento 3 é realizado com nível alto de catalisador.

O experimento 6 e os do ponto central (9, 10 e 11), também, apresentaram liberação de açúcares bem semelhante a do experimento 5. No caso da condição central, mostra-se mais viável elevar em 30 °C a temperatura, de modo a se obter uma redução de 75% no teor de FeCl_3 (situação do ensaio 5). Quando se trata do experimento 6 a única diferença é o tamanho de partícula. Como o rendimento sólido é semelhante, percebe-se, então, ser possível obter resultado equivalente em uma ampla faixa de tamanho de partícula, uma vez que esse fator, apesar de ter apresentado efeito negativo para o bagaço de cana, não chegou a ser significativo para a resposta.

No caso da palha de milho, o ensaio 5 foi, mais uma vez, tido como a condição otimizada, considerando a viabilidade do processo no que diz respeito a redução na quantidade usada de catalisador, apresentando liberação semelhante a de outros experimentos menos viáveis (Figura 24c). O experimento 6 também se mostra adequado, apresentou liberação de açúcares equivalente a do ensaio 5 e um rendimento sólido 5% maior, indicando, assim como para o bagaço de cana, a possibilidade de se utilizar uma faixa ampla de tamanho de partícula, por ter sido um fator não significativo para a resposta.

Observando-se a Figura 24d, percebe-se que o ensaio 5 foi o que proporcionou a melhor liberação de açúcares para a casca de coco, esse ensaio foi também considerado a condição ótima de pré-tratamento para essa biomassa. Não apenas pelo melhor rendimento em açúcares, mas pelos motivos já discutidos com relação a viabilidade do processo.

É importante ressaltar que, apesar do ensaio 5 ter sido adotado como a condição ótima, o experimento 6 também se destaca, apresentando liberação de açúcares bem semelhante ao do 5, porém com um rendimento sólido consideravelmente maior. Com isso, ao se considerar o rendimento a partir de toda a massa pré-tratada, o experimento 6 poderá fornecer melhor resultado que o 5. Como já comentado, a única diferença entre esses experimentos é o tamanho de partícula, essa variável não foi significativa para a casca de coco,

mas apresentou interação positiva com a temperatura, indicando que deve ser mantida no nível superior quando a temperatura estiver no nível superior (situação do Exp. 6).

Assim, apesar da casca de coco *in natura* apresentar dureza maior que as outras biomassas avaliadas, seu tamanho de partícula não precisa ser demasiadamente reduzido quando se considera a proposta de pré-tratamento desse estudo. O que, especialmente para a casca de coco, é benéfico, devido à dificuldade de transformar essa biomassa em partículas pequenas e uniformes.

A análise dos efeitos (Figura 25) revelou que as características estruturais inerentes a cada biomassa influenciam bastante no modo como as variáveis atuam e na importância que exercem nas reações de pré-tratamento. Mas, foi possível encontrar uma condição que se mostrou mais favorável para todas, a combinação do ensaio 5, considerada a condição otimizada para todas as biomassas.

A única variável, que na condição ótima, precisa ser avaliada mais especificamente é o tamanho de partícula. A mesma só foi significativa para o aguapé, devendo ser mantida no nível inferior, para que um bom rendimento seja atingido. Enquanto para as outras biomassas essa variável não foi significativa e pode ser utilizada desde o nível inferior até o superior. Sendo que um maior tamanho de partícula poderá, até mesmo, ocasionar um melhor resultado considerando o rendimento total do processo de hidrólise enzimática.

Apesar do tamanho de partícula ser uma variável muito pouco explorada em trabalhos da literatura [76], percebe-se, por meio das conclusões obtidas nesse estudo, que o mesmo não deve ser negligenciado, uma vez que poderá influenciar o resultado. Notou-se que não há uma relação com o teor de lignina, componente que confere resistência a biomassa, pois a casca de coco, que apresenta a maior quantidade de lignina, não necessita ter seu tamanho reduzido demasiadamente. Enquanto o aguapé, que possui teor de lignina bem menor, necessita de uma considerável redução da partícula.

Como os efeitos exercidos pelas variáveis foram diferentes de biomassa para biomassa, o modelo ajustado também foi diferente. Para o aguapé o modelo foi ajustado considerando todos os efeitos, inclusive as duas interações não

significativas. Uma vez que a análise de variância, Tabela 12, mostrou-se bem significativa para a existência de regressão linear mesmo mantendo-se esses efeitos. O $F_{\text{calculado}}$ foi bem maior que o F_{tabelado} , além disso, o R^2 foi alto, de modo que a regressão linear explicou 98,8% da variação total.

Para o pré-tratamento do bagaço de cana, onde só foi significativo o efeito de interação 2x3, percebeu-se que a retirada das duas interações menos significativas, ou seja, de maior p-valor (1x3 e 1x2x3), reduzia o erro por aumentar os graus de liberdade do resíduo de 3 para 5, sem afetar, de modo relevante, a soma de quadrados da regressão linear. Com isso, conseguiu-se um modelo com análise de variância bem mais favorável para a existência de regressão linear, ao custo de apenas uma pequena redução no valor de R^2 , que passou de 91,3% com tudo no modelo, para 90,8% sem as duas interações (Tabela 12).

O modelo da palha de milho também foi construído retirando-se os dois efeitos de interação com p-valor mais alto (1x3 e 1x2x3), inserindo-os ao resíduo. Com isso, a interação 2x3 passou a ser significativa. Essa ação praticamente não alterou o valor de R^2 , que passou de 85,8% com todos os efeitos, para 85,2% com a exclusão dos citados. O $F_{\text{calculado}}$ foi maior que o tabelado, indicando o ajuste dos dados ao modelo linear (Tabela 12).

No caso da casca de coco, o modelo foi construído retirando-se a interação de três fatores do modelo (1x2x3), que apresentou o p-valor mais elevado entre os efeitos. A retirada desse efeito foi benéfica para o modelo, pois permitiu que o efeito principal da temperatura e a interação 1x3 passassem a ser significativos, sem causar alteração no valor de R^2 , que permaneceu 96,5%. Além disso, a análise de variância mostrou-se bem significativa para a existência de regressão linear (Tabela 12).

Tabela 12: Análise de variância (ANOVA), aplicada a todas as biomassas, para verificar o ajuste dos dados ao modelo linear.

Biomassa	Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F _{calculado}	Hipóteses
Aguapé	Regressão (RL)	1.972,44	7	281,78	35,18	H ₀ : RL = 0
	Resíduo (Res)	24,03	3	8,01		H _a : RL ≠ 0
	Total	1.996,47	10		F _{7; 3; 0,05} = 4,35	R ² = 98,8%
B. cana	Regressão (RL)	690,73	5	138,15	9,90	H ₀ : RL = 0
	Resíduo (Res)	69,78	5	13,96		H _a : RL ≠ 0
	Total	760,51	10		F _{5; 5; 0,05} = 5,05	R ² = 90,8%
P. milho	Regressão (RL)	559,88	5	111,98	5,77	H ₀ : RL = 0
	Resíduo (Res)	97,10	5	19,42		H _a : RL ≠ 0
	Total	656,98	10		F _{5; 5; 0,05} = 5,05	R ² = 85,2%
C. coco	Regressão (RL)	300,39	6	50,06	18,54	H ₀ : RL = 0
	Resíduo (Res)	10,79	4	2,70		H _a : RL ≠ 0
	Total	311,18	10		F _{6; 4; 0,05} = 4,53	R ² = 96,5%

Os modelos linear ajustados aos dados experimentais, para as quatro biomassas, são apresentados nas Equações 9-12:

$$y_{aguapé} (\%) = -119,855 + 25,624 \cdot x_1 + 663,422 \cdot x_2 + 0,807 \cdot x_3 - 108,178 \cdot x_1 \cdot x_2 - 0,155 \cdot x_1 \cdot x_3 - 2,829 \cdot x_2 \cdot x_3 + 0,524 \cdot x_1 \cdot x_2 \cdot x_3 \quad (9)$$

$$y_{b.cana} (\%) = -24,2985 - 0,3433 \cdot x_1 + 742,8111 \cdot x_2 + 0,3599 \cdot x_3 - 23,0667 \cdot x_1 \cdot x_2 - 3,7278 \cdot x_2 \cdot x_3 \quad (10)$$

$$y_{p.milho}(\%) = -4,0971 + 0,1133 \cdot x_1 + 482,4889 \cdot x_2 - 0,2797 \cdot x_3 - 28,5333 \cdot x_1 \cdot x_2 - 1,9222 \cdot x_2 \cdot x_3 \quad (11)$$

$$y_{c.coco}(\%) = -15,2349 - 10,9133 \cdot x_1 + 407,3222 \cdot x_2 + 0,2084 \cdot x_3 + 22,8000 \cdot x_1 \cdot x_2 + 0,0443 \cdot x_1 \cdot x_3 - 2,3056 \cdot x_2 \cdot x_3 \quad (12)$$

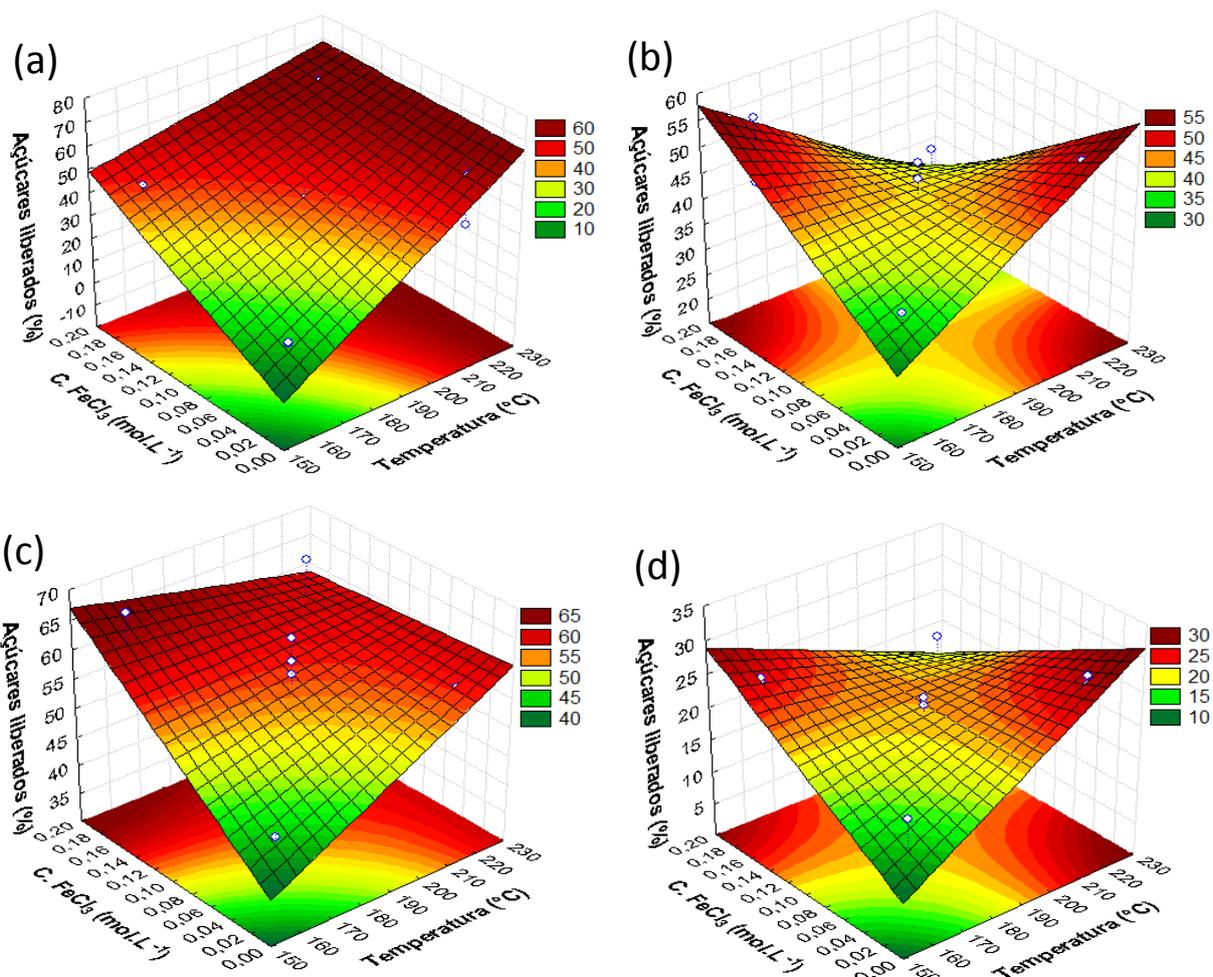
A Tabela 13 apresenta, para todas as biomassas, o resultado previsto pelo modelo e o resultado experimental para a condição otimizada (Exp. 5). Nota-se um excelente ajuste do modelo teórico aos dados experimentais, principalmente para o aguapé e a casca de coco, que apresentaram análise de variância mais significativa para a existência de regressão linear, além de um alto valor de R^2 .

Tabela 13: Teor de açúcares liberados no hidrolisado após 24 h, para a condição ótima, obtido experimentalmente e previsto pelo modelo.

Açúcares liberados - 24 h (%)		
Biomassa pré-tratada	Resultado experimental (%)	Resultado previsto (%)
Exp. 5 Aguapé	54,1	54,5
Exp. 5 B. cana	50,5	52,5
Exp. 5 P. milho	56,3	58,6
Exp. 5 C. coco	27,2	27,8

Com a confirmação, pela análise de variância, que os dados se ajustam ao modelo, superfícies de resposta puderam ser obtidas. A Figura 27 mostra as superfícies de resposta para a interação entre a concentração de $FeCl_3$ e a temperatura (2×3), que ilustram graficamente as observações já feitas e indicam a faixa onde a resposta se mantém em um valor aceitável, mesmo com algumas alterações nos parâmetros.

Figura 27: Superfícies de resposta para a interação significativa entre a concentração de FeCl_3 (2) e a temperatura (3): (a) aguapé; (b) bagaço de cana; (c) palha de milho; (d) casca de coco.



Como a partir do modelo ajustado pode-se fazer previsões para a resposta, considerando-se a faixa estudada, avaliou-se o impacto que a temperatura exerce no pré-tratamento reduzindo o valor da mesma para 190 °C, mantendo-se os demais fatores na condição do experimento 5. Para o aguapé o rendimento caiu 20%, enquanto que para o bagaço de cana, a palha de milho e a casca de coco a redução foi de 8, 7 e 5%, respectivamente. Mais uma vez, fica evidente a importância de um bom controle da temperatura para o aguapé. Em contrapartida, para as outras biomassas uma certa redução na temperatura ideal causa menos impacto ao rendimento. Para a casca de coco, a diminuição da temperatura ocasiona maior prejuízo ao rendimento quando se tem o maior tamanho de partícula (ensaio 6).

4.3.2 Condição Ótima

A composição das biomassas pré-tratadas na condição ótima (Exp. 5), de acordo com o planejamento 2³, pode ser vista na Tabela 14. A partir dessa, calculou-se o percentual de celulose, hemicelulose e lignina recuperado na biomassa pré-tratada, bem como a porcentagem de remoção da hemicelulose e lignina, e a digestibilidade da celulose (Tabela 14).

Tabela 14: Composição das biomassas pré-tratadas na condição ótima, percentual de recuperação e remoção dos componentes, e digestibilidade da celulose.

Biomassa Pré- tratada	Composição (%)			Recuperação (%)			Remoção Hemicelulose (%)	Remoção Lignina (%)	Digestibilidade Celulose (%)
	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Celulose	Hemicelulose	Lignina			
Aguapé Exp. 5 2 ³	60,2 ± 0,9	3,1 ± 1,1	22,3 ± 0,3	87,3	8,3	68,8	91,7	31,2	76,2 (24 h) 93,3 (48 h)
B. cana Exp. 5 2 ³	61,5 ± 0,8	4,8 ± 0,7	4,6 ± 1,5	65,6	6,7	8,5	93,3	91,5	66,7 (24 h) 98,3 (48 h)
P. milho Exp. 5 2 ³	69,4 ± 0,7	5,7 ± 0,8	15,7 ± 1,6	54,6	5,3	61,5	94,7	38,5	75,5 (24 h) 99,6 (48 h)
C. coco Exp. 5 2 ³	39,5 ± 0,8	5,0 ± 1,4	25,7 ± 2,1	51,1	12,1	32,1	87,9	67,9	54,6 (24 h) 95,6 (48 h)

A biomassa pré-tratada que apresentou a maior recuperação da celulose foi o aguapé, recuperou 87,3%, resultado bem satisfatório, tendo-se em vista que a celulose é o componente de maior interesse para a produção do etanol de 2G. O bagaço de cana apresentou a segunda maior recuperação desse componente (65,6%), seguido da palha de milho (54,6%) e da casca de coco (51,1%), sendo que para as duas últimas a perda de celulose foi relativamente acentuada.

Observa-se (Tabela 14) que a condição ótima de pré-tratamento proporcionou alta remoção de hemicelulose nas quatro biomassas, aproximadamente 90%. O que indica redução na recalcitrância e mostra que o aproveitamento dos açúcares liberados no licor é viável, devido a remoção, quase total, da fração hemicelulósica, além da presença de glicose proveniente da fração de celulose que foi degradada. Alta remoção de hemicelulose com o

uso de FeCl_3 foi relatado em outros trabalhos [146, 147], indicando que o uso desse catalisador favorece a decomposição da mesma.

A remoção de lignina variou de biomassa para biomassa, contudo, o bagaço de cana e a casca de coco, que originalmente apresentam os maiores teores de lignina (Tabela 10), foram as biomassas que tiveram maior deslignificação. Avaliando-se os percentuais de digestibilidade da celulose, tanto em 24 h quanto em 48 h (Tabela 14), fica evidente que o pré-tratamento foi eficiente na redução da recalcitrância das biomassas, uma vez que com 24 h de sacarificação enzimática já se alcançou elevada conversão de celulose em glicose, atingindo-se, após 48 h, digestibilidade superior a 90%, sendo que no caso do bagaço de cana e da palha de milho essa foi de aproximadamente 100%.

É importante ressaltar que a análise por HPLC dos carboidratos presentes no hidrolisado da condição ótima revelou que só há presença de hexoses. Assim, diante da grande remoção de hemicelulose, observada na Tabela 14, conclui-se que o conteúdo de hexoses é proveniente da celulose e se constitui unicamente de glicose. Além disso, a concentração de açúcares totais obtida pelo método DNS, foi equivalente a concentração de hexoses obtida por HPLC, considerando o desvio padrão. A diferença entre os métodos variou de 0,3 – 0,6 g.L^{-1} . Assim, o método DNS mostra-se bem adequado para uma triagem inicial, possibilitando a seleção das amostras mais promissoras. A Figura 28 mostra o aspecto das biomassas após pré-tratamento na condição ótima.

Figura 28: Aspecto das biomassas após pré-tratamento na condição ótima.



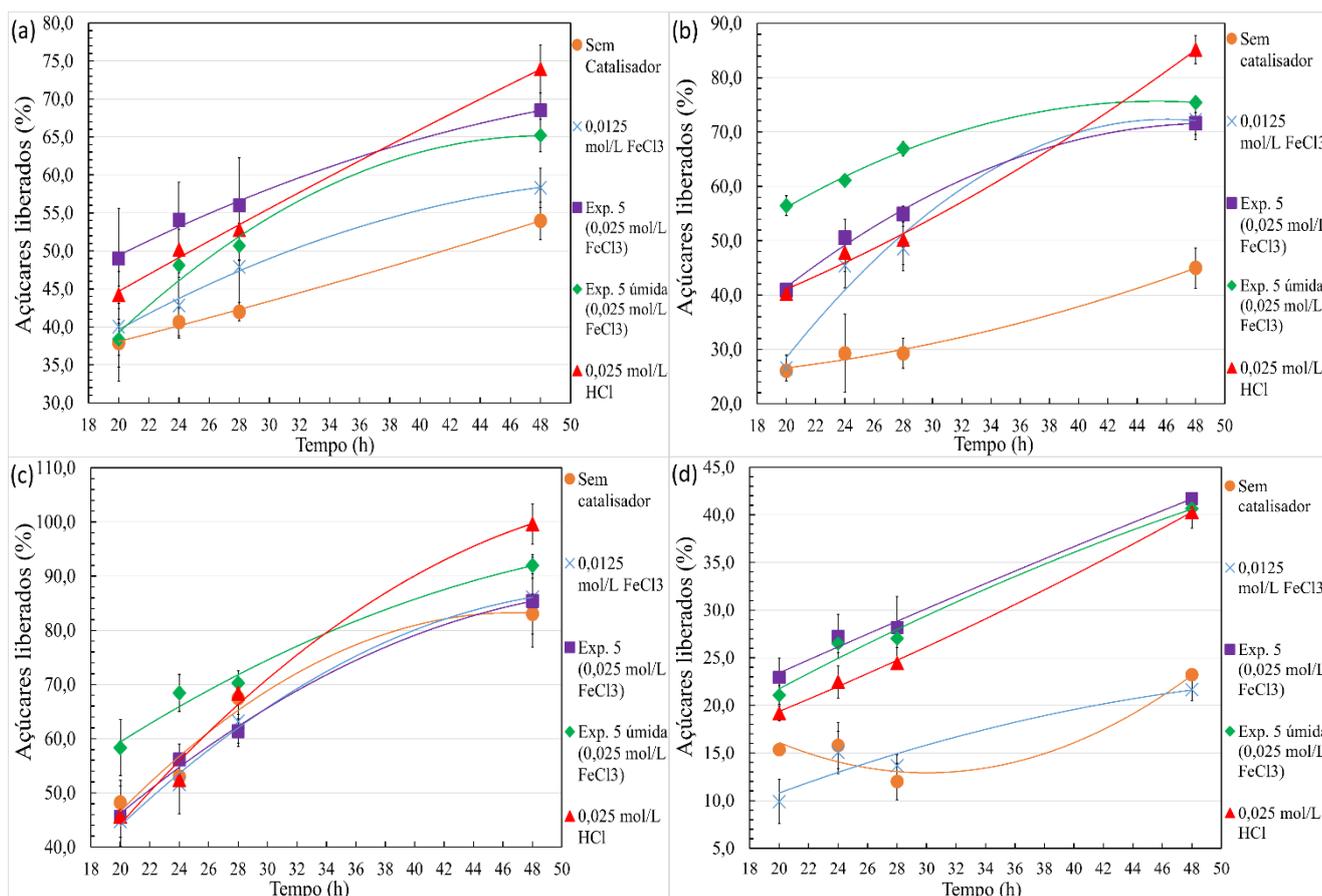
4.3.2.1 Testes na Condição Ótima

Alguns testes foram realizados na condição de pré-tratamento ótima visando validar sua eficiência e também encontrar uma situação mais favorável em substituição ao processo de lavagem após pré-tratamento. Realizou-se o pré-tratamento de todas as biomassas, de acordo com a condição otimizada, porém com as seguintes modificações: Sem adição de catalisador; reduzindo a quantidade de catalisador pela metade ($0,0125 \text{ mol.L}^{-1} \text{ FeCl}_3$); e substituindo o FeCl_3 por HCl . Além disso, submeteu-se as biomassas pré-tratadas, exatamente como a condição ótima, diretamente ao processo de sacarificação enzimática, sem passar pelos passos de lavagem e secagem. Nessa situação, em que a biomassa se encontrava úmida, o teste foi chamado de Exp. 5 úmida.

A liberação de açúcares obtida para esses testes foi comparada com a obtida por meio da condição otimizada pelo planejamento 2^3 (Exp. 5), como pode ser visto na Figura 29 (a-d). Para o aguapé, o bagaço de cana e a casca de coco (Figura 29a, b e d) foi notório que a presença do catalisador FeCl_3 , na reação de pré-tratamento, aumenta o rendimento em açúcares liberados no processo de

hidrólise enzimática. Entretanto, para a palha de milho (Figura 29c) a biomassa pré-tratada sem catalisador proporcionou rendimento em açúcares totais equivalente a condição ótima. Contudo, a análise desse hidrolisado por HPLC revelou a presença de pentoses, que correspondeu a 36% do total de açúcares.

Figura 29: Percentual de açúcares liberados, no processo de hidrólise enzimática, para biomassas pré-tratadas por meio de testes na condição ótima: (a) aguapé; (b) bagaço de cana; (c) palha de milho; (d) casca de coco.



Assim, conclui-se que mesmo para a palha de milho a adição do catalisador é vantajosa por permitir a obtenção de um hidrolisado seletivo para a presença de glicose, o que facilita o processo fermentativo. No caso do bagaço de cana, além da reação sem catalisador ser menos eficiente, também se observou a presença de pentoses no hidrolisado (39% do total de açúcares). Comprova-se, então, que o catalisador atua na fração hemicelulósica, facilitando sua remoção.

Com relação a redução da quantidade de FeCl_3 pela metade, observa-se, na Figura 29, que para o aguapé a liberação de açúcares permaneceu abaixo da condição ótima. Para o bagaço de cana e a palha de milho foi possível reduzir a quantidade de catalisador e obter o mesmo resultado proporcionado pela condição ótima, sendo que a análise dos hidrolisados por HPLC revelou a presença de uma quantidade muito pequena de pentoses, mas não foi possível quantificar com segurança. Para a casca de coco o uso de $0,0125 \text{ mol.L}^{-1}$ de FeCl_3 apresentou ineficiência equivalente a da reação sem catalisador.

Com relação a substituição do FeCl_3 por HCl, nota-se (Figura 29 a-d) que, em 48 h de sacarificação enzimática, o resultado foi equivalente ao do Exp. 5 para a casca de coco e, também, para o aguapé, considerando o desvio padrão. Para o bagaço de cana e a palha de milho se observa um pequeno aumento na porcentagem de açúcares liberados com a utilização do HCl. Porém, nessas duas biomassas a quantidade de FeCl_3 pode ser reduzida pela metade. Assim, comprova-se que o uso do FeCl_3 em substituição a catalisadores convencionais, como o HCl, é promissor.

A aplicação direta da biomassa úmida ao processo de sacarificação enzimática, após ter sido separada do licor, sem passar pelos processos de lavagem e secagem, proporcionou, para todas as biomassas, liberação de açúcares equivalente a da biomassa lavada e seca, após 48 h de hidrólise (considerando-se o desvio padrão), Figura 29.

Esse resultado é bastante promissor, mostra que para o processo de pré-tratamento organosolv com glicerol não há necessidade de lavar a biomassa após a reação de pré-tratamento, o que acarreta em grande economia de água, contribuindo, ainda mais, para a sustentabilidade econômica e ambiental. Além disso, a não necessidade de realizar a secagem também se traduz em economia de tempo, tendo em vista que após o pré-tratamento a biomassa pode ser encaminhada diretamente à hidrólise, e também energética, caso o processo de secagem fosse realizado em forno.

4.3.2.2. Determinação de HMF, furfural e ácido acético

A Tabela 15 mostra as concentrações de HMF, furfural e ácido acético que foram determinadas nos hidrolisados e licores da condição ótima e seus respectivos testes. A determinação desses subprodutos se faz importante para avaliar se o hidrolisado e licor de pré-tratamento tem potencial para produzir rendimento satisfatório em etanol quando submetido a processo fermentativo, considerando o efeito inibitório que esses compostos causam aos microorganismos responsáveis pela fermentação.

Os estudos de Bellido et al. [148] e Toquero; Bolado [149] avaliaram a influência inibitória do ácido acético sobre a levedura *Pichia Stipitis*, que se mostra promissora na fermentação de pentoses, mas também é capaz de fermentar hexoses. Concluíram que a produção de etanol reduz em média 20% com a presença de 0,5 g.L⁻¹ de ácido acético, chegando a inibição completa quando sua concentração é de 3,5 – 4,0 g.L⁻¹. Para o furfural a ação inibitória é relevante a partir de 2,0 g.L⁻¹, e para o HMF a partir de 0,5 g.L⁻¹. Sendo que no caso do último a inibição é menos pronunciada e a presença de concentrações da ordem de 0,1 g.L⁻¹ traz efeito positivo ao processo fermentativo [148].

Tabela 15: Determinação de HMF, furfural, e ácido acético no hidrolisado e licor para as amostras de referência das quatro biomassas.

Amostra	Hidrolisado (48 h)			Licor			
	HMF (g.L ⁻¹)	Furfural (g.L ⁻¹)	Ác. Acético (g.L ⁻¹)	HMF (g.L ⁻¹)	Furfural (g.L ⁻¹)	Ác. Acético (g.L ⁻¹)	
Aguapé	Sem catalisador	não detectado	não detectado	0,86 ± 0,19	0,0014 ± 0,0000	0,0076 ± 0,0001	3,15 ± 0,01
	0,0125 mol/L FeCl ₃)	-	-	-	0,0016 ± 0,0000	0,0079 ± 0,0012	3,55 ± 0,07
	Exp. 5 (0,025 mol/L FeCl ₃)	não detectado	não detectado	não detectado	0,0009 ± 0,0000	0,0135 ± 0,0008	3,00 ± 0,01
	0,025 mol/L HCl	não detectado	não detectado	1,34 ± 0,08	0,0018 ± 0,0002	0,0060 ± 0,0001	4,35 ± 0,15
B. cana	Sem catalisador	0,0008 ± 0,0001	0,0006 ± 0,0001	1,43 ± 0,01	0,0706 ± 0,0042	0,0180 ± 0,0053	1,36 ± 0,15
	0,0125 mol/L FeCl ₃)	-	-	-	não detectado	0,2401 ± 0,0026	1,44 ± 0,07
	Exp. 5 (0,025 mol/L FeCl ₃)	não detectado	0,0019 ± 0,0003	0,15 ± 0,01	não detectado	0,3131 ± 0,0080	2,26 ± 0,17
	0,025 mol/L HCl	não detectado	0,0004 ± 0,0001	0,64 ± 0,05	não detectado	0,1514 ± 0,0026	2,55 ± 0,03
P. milho	Sem catalisador	0,0005 ± 0,0002	0,0004 ± 0,0001	1,20 ± 0,21	0,0476 ± 0,0031	0,0110 ± 0,0001	3,32 ± 0,13
	0,0125 mol/L FeCl ₃)	-	-	-	0,0005 ± 0,0000	0,2787 ± 0,0030	2,16 ± 0,03
	Exp. 5 (0,025 mol/L FeCl ₃)	não detectado	0,0021 ± 0,0008	0,87 ± 0,25	não detectado	0,5123 ± 0,0002	2,73 ± 0,10
	0,025 mol/L HCl	não detectado	0,0004 ± 0,0002	0,83 ± 0,02	0,0005 ± 0,0000	0,1972 ± 0,0042	3,07 ± 0,01
C. coco	Sem catalisador	0,0007 ± 0,0000	0,0003 ± 0,0000	0,79 ± 0,15	0,0123 ± 0,0011	0,0033 ± 0,0001	2,66 ± 0,01
	0,0125 mol/L FeCl ₃)	-	-	-	0,0010 ± 0,0000	0,0578 ± 0,0002	1,38 ± 0,07
	Exp. 5 (0,025 mol/L FeCl ₃)	não detectado	0,0011 ± 0,0001	0,28 ± 0,02	0,0012 ± 0,0000	0,1161 ± 0,0035	1,86 ± 0,04
	0,025 mol/L HCl	não detectado	0,0003 ± 0,0000	1,33 ± 0,08	0,0023 ± 0,0000	0,0259 ± 0,0002	2,31 ± 0,02

Avaliando-se os resultados da Tabela 15, nota-se que os hidrolisados da condição ótima (Exp. 5) podem ser submetidos ao processo fermentativo sem passar por tratamento adicional, uma vez que nesses o ácido acético está presente em concentração abaixo de $0,5 \text{ g.L}^{-1}$, com exceção da palha de milho ($0,87 \text{ g.L}^{-1}$). Além disso, o HMF e o furfural, quando detectados, se encontram em níveis bem abaixo do necessário para ocasionar ação inibitória, o que também foi observado nos outros hidrolisados.

Notou-se que o pré-tratamento com HCl, comparado ao com FeCl_3 , produziu maior quantidade de ácido acético nos hidrolisados do aguapé, bagaço de cana e casca de coco, sendo equivalente no caso da palha de milho. Essas concentrações, vistas na Tabela 15, já são suficientes para ocasionar considerável efeito inibitório. Desse modo, conclui-se que realizar o pré-tratamento com FeCl_3 é mais vantajoso. Também é importante observar que as biomassas pré-tratadas sem catalisador conduzem a uma maior produção de ácido acético que as pré-tratadas com FeCl_3 .

Nos licores, o HMF e o furfural exibem concentração um pouco superior à dos hidrolisados, mas essas estão bem abaixo da necessária para ocasionar inibição. Contudo, quando se trata do ácido acético a concentração é alta, sendo suficiente para ocasionar forte inibição. Com isso, não é viável submeter os licores a um processo fermentativo sem a realização de um tratamento prévio que possibilite reduzir a ação negativa do ácido acético. Uma alternativa, quando se pensa em uma biorrefinaria, é recuperar esse subproduto por destilação e agregar valor ao mesmo.

De acordo com Kamireddy et al. [146] a formação de ácido acético é associada aos grupos funcionais éster e acetil que se ligam a monossacarídeos na hemicelulose. Como o pré-tratamento quebra essas ligações forma-se o ácido acético. Assim, a alta concentração desse subproduto nos licores está relacionada com a elevada remoção de hemicelulose proporcionada pelo pré-tratamento organosolv com glicerol.

Outros trabalhos, que fizeram uso de FeCl_3 e obtiveram grande remoção de hemicelulose, também detectaram o ácido acético em alta concentração no licor. O pré-tratamento da palha de milho com soluções aquosas de FeCl_3 , a 160

°C, nas concentrações de 0,075 e 0,125 mol.L⁻¹ formou, respectivamente, 2,91 e 3,30 g.L⁻¹ de ácido acético [146]. O pré-tratamento organosolv com etanol do bagaço de cana com 0,025 mol.L⁻¹ de FeCl₃ a 190 °C produziu 2,4 g.L⁻¹ desse subproduto no licor, concluindo-se que quanto mais elevada é a temperatura maior é a sua formação [147].

Porém, no presente trabalho a formação de HMF e furfural foi menor que nos estudos citados. O que pode estar relacionado ao uso do glicerol, uma vez que Zhang et al. [139] afirmaram que o glicerol previne a desidratação e clivagem das ligações glicosídicas. A formação reduzida desses compostos mostra-se vantajosa, tendo em vista que uma mistura de inibidores é ainda mais prejudicial ao processo fermentativo [148, 149].

4.3.2.3. Quantidade de Glicose Produzida via Hidrólise Enzimática

A Tabela 16 mostra, para as quatro biomassas avaliadas nesse estudo, a quantidade de glicose produzida no hidrolisado em miligrama por grama de biomassa pré-tratada e em grama por cem gramas de biomassa *in natura*, a máxima quantidade teórica de glicose que pode ser produzida considerando o teor de celulose na biomassa *in natura*, bem como comparação com trabalhos disponíveis na literatura.

Para o aguapé, o trabalho de Guragain et al [11], apesar de relativamente antigo, é a referência de maior poder comparativo com o presente estudo, tendo em vista que também avaliou o pré-tratamento organosolv com glicerol sobre o aguapé (1 h; 230 °C). Como se observa na Tabela 16, a quantidade de açúcares obtida por eles foi um pouco maior que a desse estudo, contudo não apresentaram a composição da biomassa nem antes nem após pré-tratamento para que se possa ter um melhor entendimento sobre o resultado, que pode estar relacionado a diferenças na composição da biomassa. Além disso, o resultado deles não foi seletivo para a produção de glicose, indicando a presença de quantidade considerável de hemicelulose na biomassa pré-tratada, e usaram uma carga enzimática extremamente alta.

Tabela 16: Quantidade de glicose produzida no hidrolisado após 48 h: mg glicose/g biomassa pré-tratada e g glicose/100 g biomassa *in natura*. Máxima quantidade teórica: g glicose/100 g de biomassa *in natura*. Rendimento obtido por trabalhos publicados na literatura.

Produção de glicose			
Biomassa pré-tratada	Hidrolisado (48 h)	Teórica	Outros trabalhos
Aguapé Exp. 5 2 ³	623 mg/g aguapé pré-T 23 g/100 g aguapé in N	28 g/100 g aguapé in N	<i>Guragain et al., 2011 [11]</i> 719 mg AR/g aguapé pré-T (487 mg são glicose)
B.cana Exp. 5 2 ³	671 mg/g b.cana pré-T 24 g/100 g b.cana in N	36 g/100 g b.cana in N	<i>Zhang et al., 2018 [47]</i> 26 g/100 g b.cana in N
P.milho Exp. 5 2 ³	767 mg/g p.milho pré-T 21 g/100 g p.milho in N Rendimento glicose = 54%*	39 g/100 g p.milho in N	<i>Wei et al., 2019 [51]</i> Rendimento glicose = 90%*
C.coco Exp. 5 2 ³	419 mg/g c.coco pré-T 14 g/100 g c.coco in N	29 g/100 g c.coco in N	<i>Nogueira et al., 2018 [55]</i> 430 mg AR/g c.coco pré-T (247 mg são glicose)
			<i>Gundupalli e Brattacharyya, 2019 [150]</i> 12 g/100 g c.coco in N

pré-T: biomassa pré-tratada; **in N:** biomassa *in natura*; **AR:** açúcares redutores; * Em relação a quantidade de celulose na biomassa *in natura*.

É importante destacar que ocorreu otimização da produção de glicose em relação ao primeiro estudo realizado para o aguapé (condição ótima do planejamento 2⁵⁻¹ com a adição de FeCl₃). O aumento da velocidade e efetividade da reação conseguido com a redução do tamanho de partícula, possibilitou reduzir grandemente a quantidade de FeCl₃ utilizada, o que

proporcionou a obtenção da biomassa pré-tratada com maior rendimento sólido (passou de 22,9 para 37,0%) devido a maior recuperação de celulose (passou de 48,2 para 87,3%), o que aumentou em 64% a quantidade de glicose produzida por 100 gramas de biomassa *in natura*, passando de 14 g/100 g para 23 g/100 g após 48 h de hidrólise enzimática. A lignina também foi removida em menor proporção, contribuindo para o maior rendimento sólido, contudo a digestibilidade da celulose permaneceu alta.

A quantidade de glicose produzida nesse trabalho para o bagaço de cana (Tabela 16) foi comparada a obtida por Zhang et al [47] que realizou o pré-tratamento com soluções aquosas de FeCl_3 (160 °C; 10 min; $0,025 \text{ mol.L}^{-1} \text{ FeCl}_3$) em reator específico. A quantidade de glicose produzida por eles, no hidrolisado, foi bem semelhante à desse estudo. Porém, o bagaço usado pelos mesmos apresenta cerca de 8% mais celulose.

No atual trabalho, ocorreu maior perda de celulose para o licor de pré-tratamento, que foi acompanhada de 91,5% de deslignificação, associada ao uso de glicerol em alta temperatura (220 °C). Essa grande remoção de lignina, junto com a remoção de 93,3% da hemicelulose, possibilitou que a celulose recuperada na biomassa pré-tratada apresentasse uma conversão a glicose de praticamente 100% em 48 h. No caso de Zhang et al [47] a recalcitrância foi reduzida em menor extensão, uma vez que praticamente não houve remoção de lignina. Assim, a celulose que foi recuperada, quantidade superior à desse trabalho (89%), não foi convertida por completo em glicose. Uma estratégia usada por eles foi a adição de surfactante (tween 80) ao processo de hidrólise enzimática, o que levou a uma produção de glicose maior que a apresentada na Tabela 7, porém encarece o processo.

Assim, esse estudo mostra-se mais favorável, uma vez que a celulose solubilizada no licor poderá, também, ser aproveitada, após remoção do ácido acético formado. Sendo que formação similar de inibidores ocorreu no trabalho deles. Além disso, os testes na condição ótima revelaram ser possível obter a mesma liberação de açúcares usando metade da quantidade de FeCl_3 , o que reduzirá o custo e, possivelmente, conduzirá a menor perda de celulose.

Para a palha de milho, Wei et al. [51] realizaram um pré-tratamento organosolv com DMSO (dimetilsulfóxido) catalisado por FeCl_3 (120 °C; 45 min; 0,05 mol.L⁻¹ FeCl_3). Alcançaram um alto rendimento de glicose no hidrolisado, que foi decorrente da alta recuperação de celulose na palha pré-tratada (91,9%), com alta remoção de hemicelulose (93,1%) e lignina (29,8%), de modo que praticamente toda celulose recuperada foi convertida em glicose.

No presente trabalho, o pré-tratamento organosolv com glicerol catalisado por FeCl_3 também proporcionou alta remoção de hemicelulose (94,7%) e considerável deslignificação (38,5%), o que levou a uma digestibilidade de celulose de praticamente 100%. Onde o menor rendimento de glicose no hidrolisado é decorrente da menor recuperação de celulose (54,6%).

Assim, esse estudo mostra-se competitivo com o de Wei et al [51], desde que os açúcares disponibilizados no licor de pré-tratamento sejam adequadamente fermentados (após remoção do ácido acético). A fração líquida de Wei et al também apresentou inibidores (nível considerável de furfural e ácido acético), o que indica a necessidade de remoção dos mesmos para aproveitamento dos açúcares. Além disso, eles utilizaram concentração de FeCl_3 duas vezes superior à desse estudo, e tempo de reação mais de quatro vezes superior.

O uso de glicerol em relação ao DMSO também se mostra vantajoso, uma vez que o glicerol vem sofrendo desvalorização no mercado devido a sua formação como subproduto da produção de biodiesel, além da possibilidade de aproveitamento do glicerol bruto. O DMSO, apesar de ter um ponto de ebulição consideravelmente elevado e um nível de toxicidade aceitável, é muito utilizado como solvente para diversas aplicações. Com isso, seu uso no pré-tratamento de biomassas poderá elevar o custo do mesmo, não compensando economicamente. Outra vantagem desse estudo é que testes revelaram ser possível reduzir ainda mais a quantidade usada de FeCl_3 , que poderá ser de 0,0125 mol.L⁻¹ para o pré-tratamento da palha de milho.

Tratando-se da casca de coco, a quantidade de glicose obtida no hidrolisado não se mostra desfavorável com relação a obtida por estudos

recentes. Indicando que a solubilização de boa parte da celulose no licor é facilmente conseguida em diferentes tipos de pré-tratamento.

Nogueira et al [55], ao utilizar um pré-tratamento alcalino diluído (NaOH 2% p/v) em autoclave a 121 °C por 10 min, obtiveram a produção de 430 mg de açúcares redutores no hidrolisado por grama de biomassa de coco pré-tratada. Sendo esse resultado não seletivo para a produção de glicose (247 mg.g⁻¹), o que está relacionado a baixa remoção de hemicelulose.

Gundupalli e Bhattacharyya [150], com a realização de um pré-tratamento com ácido sulfúrico em sistema pressurizado (8,2 mm; 200 °C; 0,21% p/p de ácido), obtiveram 12 gramas de glicose por 100 gramas de coco *in natura*, quantidade um pouco inferior à desse estudo, mesmo com a utilização de biomassa com maior teor de celulose. Sendo que o tamanho de partícula utilizado em ambos os trabalhos foi semelhante.

4.3.3. Recuperação da lignina

Por meio da realização de alguns testes, percebeu-se não ser necessário adicionar ácido ao licor para precipitar a lignina, como fazem alguns trabalhos [26], principalmente quando o licor é derivado de processo básico [151, 152]. Isso porque, no caso desse estudo, o licor é naturalmente ácido (Tabela 17), assim a lignina insolúvel em ácido já se encontra precipitada, sendo necessário apenas separá-la, o que foi feito por centrifugação. Notou-se que mesmo para os licores levemente ácidos (pH próximo a 7) não havia necessidade de adicionar ácido para reduzir o pH. Os testes revelaram que a acidificação dos licores ocasionava efeito contrário, menor quantidade de lignina era recuperada.

Tabela 17: Valores de pH para os licores dos ensaios do planejamento 2³ e quantidade de lignina insolúvel recuperada a partir do respectivo licor.

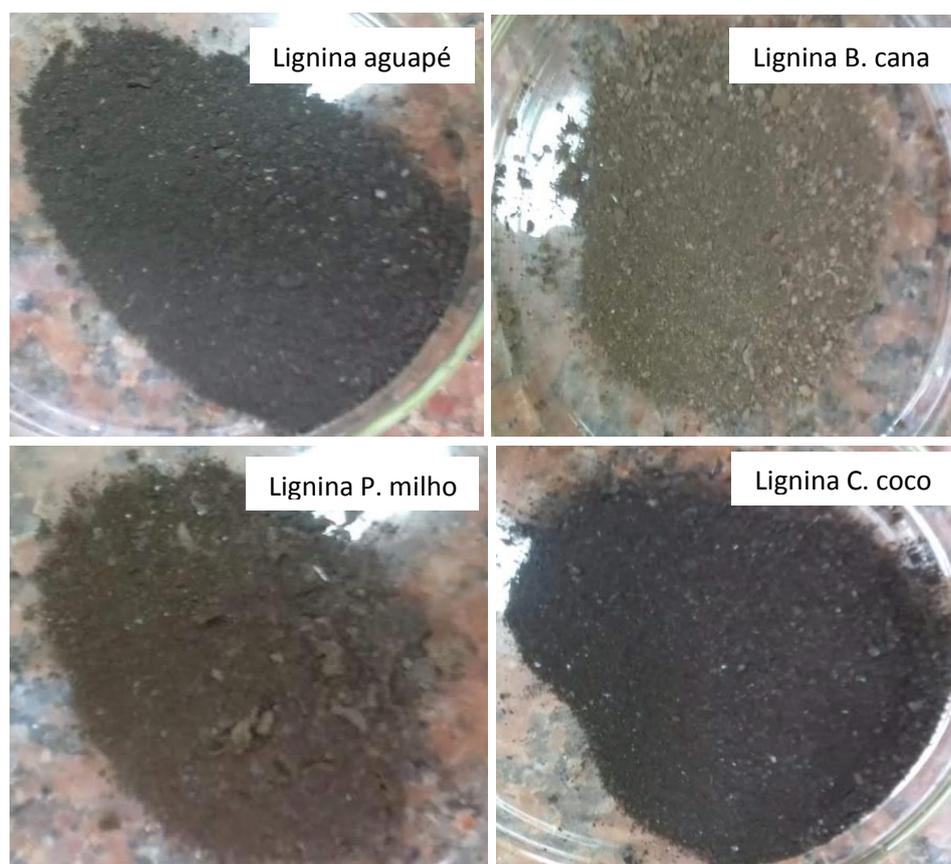
Ensaio	pH do licor				Lignina recuperada (g)			
	Aguapé	B. cana	P. milho	C. coco	Aguapé	B. cana	P. milho	C. coco
1	4,9	3,3	3,4	3,4	0,07	0,05	0,02	0,14
2	4,5	3,3	3,4	3,2	0,03	0,05	0,01	0,11
3	2,5	2,7	2,7	2,5	0,06	0,05	0,05	0,19
4	1,9	2,3	2,9	2,4	0,04	0,06	0,05	0,16
5	6,0	3,9	4,0	4,4	0,10	0,06	0,05	0,26
6	6,1	3,3	3,9	4,5	0,09	0,07	0,06	0,18
7	3,0	2,2	2,7	3,0	0,07	0,08	0,05	0,28
8	3,2	2,4	2,4	2,7	0,12	0,07	0,05	0,33
9	4,4	3,3	3,0	3,2	0,07	0,08	0,05	0,27
10	4,3	3,1	3,1	2,9	0,07	0,06	0,06	0,25
11	4,5	3,1	3,0	3,3	0,09	0,09	0,04	0,24

Esse resultado mostrou-se bem favorável, por simplificar o processo de recuperação da lignina e reduzir o custo adicional associado ao consumo de ácido, sendo mais um ponto favorável para o método organosolv com glicerol na presença de FeCl₃. Nesse estudo, também não se observou alteração na cor do licor com a separação da lignina, mesmo nos testes com a adição de ácido. Situação comumente relatada quando se precipita lignina de licor básico [152].

O processo de lavagem da lignina, após separação, foi arquitetado de modo a consumir a menor quantidade possível de água e, também, possibilitar conhecer a dimensão desse consumo. Uma vez que o consumo de água não deve ser negligenciado, pois o gasto em excesso poderá inviabilizar o processo. Como o presente trabalho faz uso do glicerol, substância viscosa, com ponto de

ebulição elevado, a quantidade de água necessária à lavagem foi equivalente a 40% do volume do licor. Percentual que se mostrou suficiente para a remoção do excesso de glicerol, possibilitando a secagem da lignina. A Figura 30 mostra o aspecto das ligninas recuperadas.

Figura 30: Aspecto das ligninas recuperadas das quatro biomassas avaliadas: aguapé, bagaço de cana, palha de milho, casca de coco.

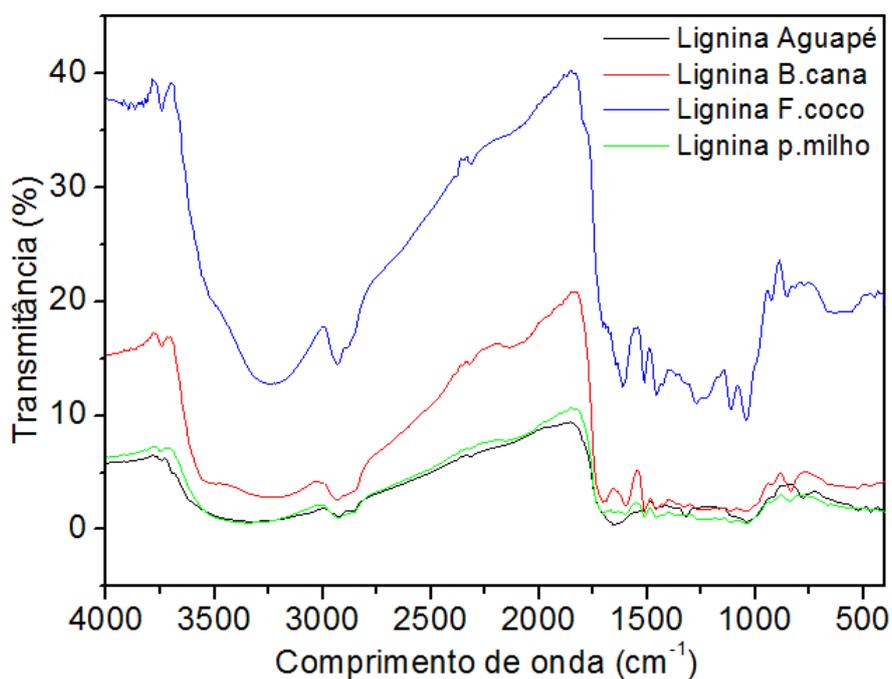


Na Tabela 17, observa-se que os licores provenientes da casca de coco foram os que apresentaram maior quantidade de lignina precipitada. O que está relacionado ao fato dessa biomassa possuir o maior teor de lignina dentre as estudadas. Além disso, 88% do conteúdo de lignina da casca de coco corresponde a lignina insolúvel em ácido. Na condição ótima (Exp. 5) 93,4% da lignina removida durante o pré-tratamento da casca de coco foi recuperada como um sólido. Quando se observa a quantidade de lignina recuperada por cada

experimento, percebe-se que os realizados com temperatura mais elevada liberam uma quantidade um pouco maior, esse é a principal interpretação geral.

Espectros de infravermelho foram obtidos para as ligninas recuperadas, Figura 31. Esses apresentam perfil semelhante a espectros obtidos por vários trabalhos, que inclusive, em alguns casos, fazem comparação com o padrão [26, 151, 152, 153]. Onde, a banda em $3600-3200\text{ cm}^{-1}$ está associada a grupos hidroxilas e compostos fenólicos. E, as bandas na região de 1500 cm^{-1} estão relacionadas a vibrações de anéis aromáticos presentes na lignina.

Figura 31: Espectros de infravermelho obtidos para as ligninas recuperadas dos licores de pré-tratamento das quatro biomassas estudadas.



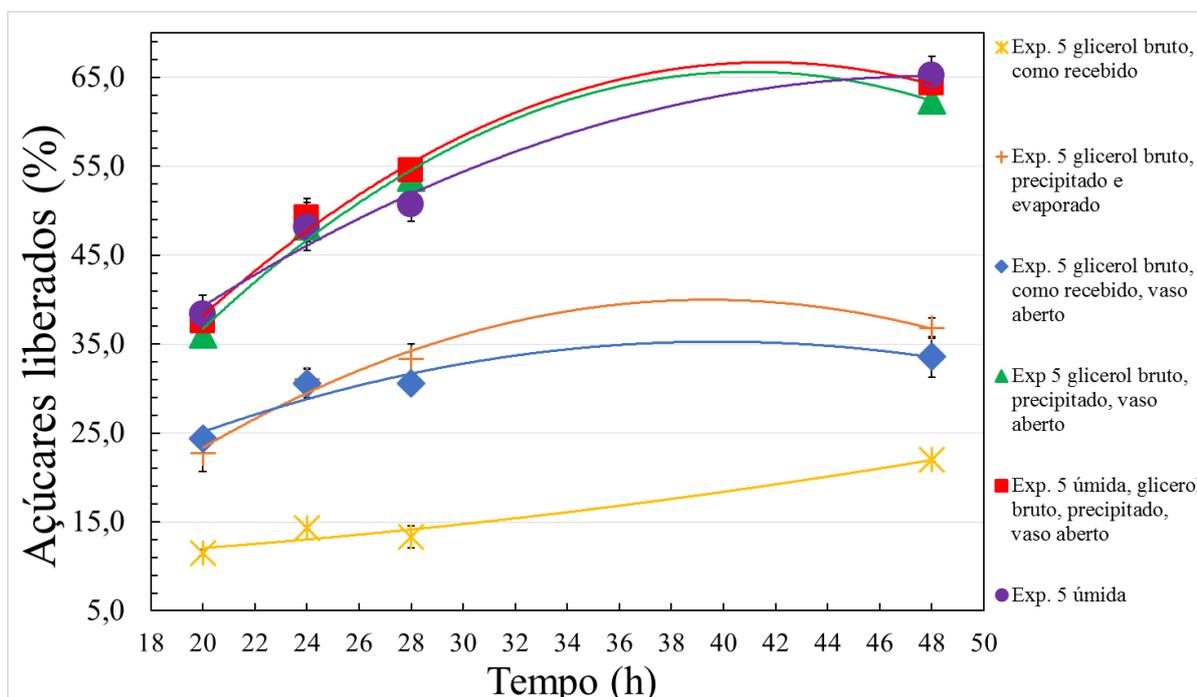
4.3.4. Aplicação do Glicerol Bruto

Para avaliar a eficácia do glicerol bruto como solvente no processo de pré-tratamento organosolv, aplicou-se o mesmo na reação de pré-tratamento do aguapé na condição ótima (Exp. 5). O primeiro teste consistiu na aplicação do glicerol bruto na forma como foi recebido a partir da produção de biodiesel de algodão. Entretanto, como mostra a Figura 32, o resultado não foi promissor. A

principal razão para isso foi o fato da temperatura da reação não ter atingido 220 °C devido à presença de água e álcool residuais da produção do biodiesel.

Assim como em todas as outras reações desse trabalho, o meio reacional foi colocado em um balão de fundo redondo e acoplado a um sistema de refluxo, permitindo que os vapores retornassem ao meio reacional. A presença de água e álcool foi percebida devido a condensação constante que, só permitiu alcançar 188 °C, temperatura, como já bem discutido, insuficiente para se atingir bons resultados para o aguapé.

Figura 32: Percentual de açúcares liberados na hidrólise enzimática em testes onde o glicerol bruto, como recebido e após passar por tratamentos, foi aplicado na reação de pré-tratamento organosolv do aguapé na condição ótima. Comparando-se os resultados com aqueles obtidos com o uso do glicerol comercial.



Diante dessa situação, uma estratégia foi submeter o glicerol bruto a um processo de evaporação, a 120 ± 5 °C, por aproximadamente três horas. Porém, esse ficou ainda mais grosso e viscoso por conta da presença de outras impurezas associadas a produção do biodiesel, como ácidos graxos (sabão), mono-, di-, e triglicerídeos, e ésteres, inviabilizando o trabalho com o mesmo.

Assim, a estratégia seguinte foi realizar uma purificação simples, tratamento com ácido, comumente chamado de neutralização. A principal pretensão desse tratamento consiste em remover os ácidos graxos que, juntamente com o catalisador básico residual, formam o sabão, conferindo ao glicerol bruto o aspecto extremamente viscoso e escuro. O processo ocorre pela reação do ácido com o sabão produzindo ácidos graxos livres insolúveis, sal e água. Com isso, os ácidos graxos precipitados podem ser separados por decantação, os mesmos ascendem ao topo, ficando o glicerol na parte inferior [154]. A Figura 33 mostra o aspecto do glicerol bruto, e a separação dos ácidos graxos insolúveis que foram precipitados.

Figura 33: Aspecto do glicerol bruto proveniente da produção de biodiesel de algodão e separação dos ácidos graxos insolúveis que foram precipitados pela adição de ácido.



O glicerol proveniente da precipitação dos ácidos graxos foi chamado de glicerol bruto precipitado. Esse foi também submetido ao processo de evaporação (120 ± 5 °C) para remover o excesso de água e álcool, sendo chamado de glicerol bruto, precipitado e evaporado. A realização do pré-tratamento com o mesmo apresentou maior liberação de açúcares do que a com

o glicerol bruto como recebido, mas o rendimento ainda foi baixo (Figura 32). Percebeu-se que o procedimento de evaporação não foi eficiente na remoção da água, pois ainda ocorreu considerável gotejamento no meio reacional, de modo que a máxima temperatura atingida foi 204 °C.

Com a percepção da insistente interferência da água, resolveu-se realizar a reação com o reator aberto, de modo a possibilitar o escape dos vapores. Primeiramente, realizou-se a reação por meio dessa estratégia usando o glicerol bruto como recebido (glicerol bruto, como recebido, reator aberto). Ocorreu liberação constante de vapores ao longo da reação e intenso borbulhamento. A temperatura atingiu 220 °C, contudo, o trabalho nas etapas seguintes, filtração e lavagem, foi muito dificultado pela viscosidade extrema associada a presença dos sabões. E, como se observa na Figura 32, o resultado não foi promissor.

Assim, a reação foi realizada com o glicerol bruto, precipitado, mantendo-se o reator aberto. A temperatura atingiu o nível ideal (220 °C) e a liberação de açúcares se igualou a da condição ótima usado o glicerol comercial (Figura 32), indicando que os sabões também estavam causando interferências. Além disso, o uso do glicerol bruto, precipitado, reator aberto, facilitou as etapas sequencias devido a menor viscosidade.

Desse modo, para confirmar a eficácia do tratamento, a reação foi repetida, e o aguapé pré-tratado, sem lavagem e úmido foi diretamente submetido ao processo de hidrólise enzimática (Exp. 5 úmida, glicerol bruto, precipitado, reator aberto). O resultado reproduziu (Figura 32), sendo que tanto com a biomassa seca quanto com a úmida e sem lavagem se atingiu o mesmo rendimento da reação com o glicerol comercial, com a biomassa úmida e sem lavagem (Exp. 5 úmida). Com isso, concluiu-se que após tratamento simples com ácido, o glicerol bruto da produção de algodão pode ser aplicado com sucesso no pré-tratamento organosolv do aguapé.

No hidrolisado, obtido com o aguapé pré-tratado nas condições do Exp. 5 úmida, glicerol bruto, precipitado, reator aberto, a formação de HMF ($0,0003 \text{ g.L}^{-1}$) e furfural ($0,0017 \text{ g.L}^{-1}$) ficou abaixo da faixa inibitória. Enquanto o ácido acético se apresentou em concentração capaz de causar leve inibição ($0,56 \text{ g.L}^{-1}$). No licor, resultado semelhante ocorreu para o HMF ($0,0030 \text{ g.L}^{-1}$) e para o

furfural ($0,0771 \text{ g.L}^{-1}$). Entretanto, o ácido acético foi produzido em grande quantidade ($7,69 \text{ g.L}^{-1}$), bem maior que com o glicerol comercial. Desse modo, esse importante insumo químico deve ser adequadamente recuperado, permitindo que o licor possa ser fermentado para o aproveitamento dos açúcares solubilizados. Sendo que, a maior formação de ácido acético, certamente, está relacionada a acidez do glicerol bruto precipitado ($\text{pH} = 3,0$) que intensificou a remoção de grupos acetil.

Trabalhos relacionados ao pré-tratamento de biomassas com a aplicação do glicerol bruto são escassos. Sun e Chen, 2008 [22] realizaram o pré-tratamento da palha de trigo ($200 \text{ }^\circ\text{C}$; 3 h), concluindo que o glicerol bruto ocasiona menor rendimento (21%) devido à presença de compostos lipofílicos que atrapalham o processo. Guragain et al [11], que aplicaram o glicerol bruto no pré-tratamento do aguapé ($230 \text{ }^\circ\text{C}$; 1 h), concluíram não ter sofrido influência de compostos lipofílicos, sendo o rendimento com o glicerol bruto 14% menor que com o puro. Como afirmam Guragain et al, o resultado pode estar associado a origem do glicerol bruto (diferenças no método de produção, catalisador utilizado, entre outros). Ambos os trabalhos indicaram ter usado o glicerol da forma como recebido e em sistema de refluxo.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos indicam que o pré-tratamento organosolv com glicerol tem potencial para tornar a produção de etanol celulósico viável. Uma vez que apresentou eficiência no fracionamento de todas as biomassas avaliadas – aguapé, bagaço de cana, palha de milho e casca de coco verde.

O estudo das variáveis consideradas importantes ao processo por meio de um planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} se mostrou uma excelente estratégia, por permitir visualizar o efeito de cada uma sobre o sistema, bem como por identificar interações importantes. Apesar desse delineamento experimental ter sido realizado com a biomassa aguapé, a otimização obtida tem grande utilidade para todas as biomassas, uma vez que direciona o estudo, ao evidenciar que longo tempo de reação e baixa razão sólido/líquido não são necessários; que a adição de água ao processo é desfavorável; que a ferrita de cobalto não é um catalisador adequado para tal aplicação; e que a temperatura tem grande efeito sobre o aguapé, sendo uma variável importante que deve ser melhor investigada.

Os sais de ferro adicionados à condição ótima de pré-tratamento apresentaram atividade. O FeCl_3 ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) foi o mais promissor, aumentando a liberação de açúcar em 14% ($51 \pm 3\%$). Nesta condição, a digestibilidade da celulose foi de 85% em apenas 24 horas de hidrólise enzimática. Assim, o uso de diferentes fontes de ferro possibilitou uma melhor compreensão do modo de ação desse metal, representando um avanço na elucidação do mecanismo de ação dos sais metálicos nas reações de pré-tratamento.

A realização do planejamento fatorial 2^3 para as quatro biomassas deixou claro que os efeitos exercidos pelas variáveis dependem das particularidades de cada lignocelulose. Contudo, foi possível encontrar uma condição comum considerada ótima para todas. Percebendo-se que o tamanho de partícula é uma variável que não deve ser negligenciada, e que o FeCl_3 em conjunto com o glicerol em temperatura elevada apresenta potencial na remoção de lignina e principalmente de hemicelulose, com isso ocorre grande redução na recalcitrância das biomassas, o que foi evidenciado pela elevada digestibilidade enzimática.

Por meio das otimizações ficou claro que com uma devida combinação entre as variáveis é possível tornar o processo bem mais econômico e sustentável. Sendo possível, no caso do aguapé, reduzir bastante a quantidade de catalisador apenas pela redução do tamanho da partícula. As outras biomassas também requerem pequena quantidade de catalisador.

Uma otimização de grande importância, alcançada sem perdas ao rendimento, foi a não necessidade de lavar a biomassa após o pré-tratamento, sendo possível realizar a hidrólise diretamente, o que foi possível devido o glicerol e o FeCl_3 , em baixa concentração, não serem danosos as enzimas. O que contribui bastante para a viabilidade econômica da metodologia proposta.

Além disso, a determinação dos inibidores de fermentação indicou que estão presentes em baixa concentração no hidrolisado quando se utiliza o FeCl_3 , enquanto com a utilização do HCl estão presentes em maior quantidade. Sendo mais viável utilizar o primeiro, uma vez que a liberação de açúcares proporcionada por ambos é equivalente.

Por fim, a conclusão mais importante desse estudo é que o glicerol bruto, após passar por simples tratamento, pode ser aplicado, proporcionado o mesmo rendimento do glicerol comercial, além disso, a biomassa pré-tratada com o mesmo também pode ser submetida ao processo de hidrólise enzimática sem passar pelo passo de lavagem.

6 PERSPECTIVAS DO TRABALHO

- Aplicar o glicerol bruto na reação de pré-tratamento das outras biomassas (bagaço de cana, palha de milho, casca de coco) para confirmar sua eficácia em lignocelulose diferente do aguapé;
- Avaliar a eficiência do glicerol bruto advindo de outros processos de produção de biodiesel;
- Realizar a fermentação dos açúcares disponibilizados no hidrolisado, de modo a conhecer a eficiência do processo proposto na geração do produto de interesse, o etanol;
- Viabilizar a separação e aproveitamento do ácido acético formado no licor, de modo a possibilitar a fermentação dos carboidratos solubilizados;
- Agregar valor ao processo encontrando correta aplicação para as ligninas recuperadas.

7 REFERÊNCIAS

- [1] Putro, J. N.; Soetarejo, F. E.; Lin, S-Y.; JU, Y-H.; Ismadjl, S. Pretreatment and conversion of lignocellulose biomass into valuable chemicals. *RSC Advances*. **2016**, 6, 46834–46852.
- [2] Oh, Y. H.; Eom, I. Y.; Joo, J. C.; Yu, J. H.; Song, B. K.; Lee, S. H.; Hong, S. H.; Park, S. J. Recent advances in development of biomass pretreatment technologies used in biorefinery for the production of bio-based fuels, chemicals and polymers. *Korean Journal of Chemical Engineering*. **2015**, 32, 1945–1959.
- [3] Das, S.; Bhattacharya, A.; Haldar, S.; Ganguly, A.; Sai Gu.; Ting. Y. P.; Chatterjee, P. K. Optimization of enzymatic saccharification of water hyacinth biomass for bio-ethanol: Comparison between artificial neural network and response surface methodology. *Sustainable Materials and Technologies*. **2015**, 3, 17–28.
- [4] Elgharbawy, A. A.; Alam, M. Z.; Moniruzzaman, M.; Goto, M. Ionic liquid pretreatment as emerging approaches for enhanced enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Biochemical Engineering Journal*. **2016**, 109, 252–267.
- [5] Lopes, A. M. C.; João, K. G.; Rubik, D. F.; Bogel-lukasik, E.; Duarte, L. C.; Adreaus, J.; Bogel-lukasik, R. Pre-treatment of lignocellulosic biomass using ionic liquids: Wheat straw fractionation. *Bioresource Technology*. **2013**, 142, 198–208.
- [6] Gao, J.; Chen, L.; Yuan, K.; Huang, H.; Yan, Z. Ionic liquid pretreatment to enhance the anaerobic digestion of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. **2013**, 150, 352–358.
- [7] Santos, F. A.; Queiróz, J. H.; Colodette, J. L.; Fernandes, S. A.; Guimarães, V. M.; Rezende, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. *Química Nova*. **2012**, 35, 1004–1010.
- [8] Lin, R.; Cheng, J.; Song, W.; Ding, L.; Xie, B.; Zhou, J.; Cen, K. Characterisation of water hyacinth with microwave-heated alkali pretreatment for enhanced enzymatic digestibility and hydrogen/methane fermentation. *Bioresource Technology*. **2015**, 182, 1–7.

- [9] Xu, F.; Chen, L.; Wang, A.; Yan, Z. Influence of surfactant-free ionic liquid microemulsions pretreatment on the composition, structure and enzymatic hydrolysis of water hyacinth. *Bioresource Technology*. **2016**, 208, 19–23.
- [10] Xia, A.; Cheng, J.; Song, W.; Yu, C.; Zhou, J.; Cen, K. Enhancing enzymatic saccharification of water hyacinth through microwave heating with dilute acid pretreatment for biomass energy utilization. *Energy*. **2013**, 61, 158–166.
- [11] Guragain, Y. N.; Coninck, J. D.; Husson, F.; Durand, A.; Rakshit, S. K. Comparison of some new pretreatment methods for second generation bioethanol production from wheat straw and water hyacinth. *Bioresource Technology*. **2011**, 102, 4416–4424.
- [12] Singh, A.; Bishnoi, N. R. Comparative study of various pretreatment techniques for ethanol production from water hyacinth. *Industrial Crops and Products*. **2013**, 44, 283–289.
- [13] Bensah, E. C.; Mensah, M. Chemical pretreatment methods for the production of cellulosic ethanol: Technologies and innovations. *International Journal of Chemical Engineering*, **2013**, 1-21.
- [14] Santos, F. A.; Queiroz, J. H.; Colodette, J. L.; Manfredi, M.; Queiroz, M. E. L. R.; Caldas, C. S.; Soares, F. E. F. Otimização do Pré-tratamento Hidrotérmico da Palha de Cana-de-açúcar Visando à Produção de Etanol Celulósico. *Quimica Nova*. **2014**, 37, 56–62.
- [15] Ranjan, A.; Singh, S.; Malani, R. S.; Moholkar, V. S. Ultrasound-assisted bioalcohol synthesis: review and analysis. *RSC Advances*. **2016**, 6, 65541–65562.
- [16] Balat, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management*. **2011**, 52, 858–875.
- [17] Sarkar, N.; Ghosh, S. K.; Bannerjee, S.; Aikat, K. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renewable Energy*. **2012**, 37, 19–27.
- [18] Zhang, Z.; Harrison, M. D.; Rackemann, D. W.; William O.S. Doherty, W. O. S.; O'Hara, I. M. Organosolv pretreatment of plant biomass for enhanced enzymatic saccharification. *Green Chemistry*. **2016**, 18, 360-381.

- [19] Sun, F. F.; Wang, L.; Hong, J.; Ren, J.; Du, F.; Hu, J.; Zang, Z.; Zhou, B. The impact of glycerol organosolv pretreatment on the chemistry and enzymatic hydrolyzability of wheat straw. *Bioresource Technology*. **2015**, 187, 354–361.
- [20] Zhang, K.; Pei, Z.; Wang, D. Organic solvent pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and biochemicals: A review. *Bioresource Technology*. **2016**, 199, 21–33.
- [21] Chen, H.; Liu, J.; Chang, X.; Chen, D.; Xue, Y.; Liu, P.; Lin, H.; Han, S. A review on the pretreatment of lignocellulose for high-value chemicals. *Fuel Processing Technology*. **2017**, 160, 196–206.
- [22] Sun, F.; Chen, H. Organosolv pretreatment by crude glycerol from oleochemicals industry for enzymatic hydrolysis of wheat straw. *Bioresource Technology*. **2008**, 99, 5474–5479.
- [23] Novo, L. P.; Gurgel, L. V. A.; Marabezi, K.; Curvelo, A. A. S. Delignification of sugarcane bagasse using glycerol–water mixtures to produce pulps for saccharification. *Bioresource Technology*. **2011**, 102, 10040–10046.
- [24] Ebrahimi, M.; Villaflores, O. B.; Ordonez, E. E.; Caparanga, A. R. Effects of acidified aqueous glycerol and glycerol carbonate pretreatment of rice husk on the enzymatic digestibility, structural characteristics, and bioethanol production. *Bioresource Technology*. **2017**, 228, 264–271.
- [25] Jiang, L.; Zheng, A.; Zhao, Z.; He, F.; Li, H. Comprehensive utilization of glycerol from sugarcane bagasse pretreatment to fermentation. *Bioresource Technology*. **2015**, 196, 194–199.
- [26] Romaní, A.; Ruiz, H. A.; Teixeira, J. A.; Domingues, L. Valorization of Eucalyptus wood by glycerol-organosolv pretreatment within the biorefinery concept: An integrated and intensified approach. *Renewable Energy*. **2016**, 95, 1-9.
- [27] Zhang, Z.; Wong, H. H.; Albertson, P. L.; Harrison, M. D.; Doherty, W. O. S.; O'Hara, I. M. Effects of glycerol on enzymatic hydrolysis and ethanol production using sugarcane bagasse pretreated by acidified glycerol solution. *Bioresource Technology*. **2015**, 192, 367–373.

- [28] Trinh, L. T. P.; Lee, J-W.; Lee, H-J. Acidified glycerol pretreatment for enhanced ethanol production from rice straw. *Biomass and Bioenergy*. **2016**, 94, 39-45.
- [29] Demirbas, A. Aqueous glycerol delignification of wood chips and ground wood. *Bioresource Technology*. **1998**, 63, 179-185.
- [30] Kuçuk, M. M. Delignification of biomass using alkaline glycerol. *Energy Sour.* **2005**, 27, 1245-1255.
- [31] Alio, M. A.; Tugui, O.; Vial, C.; Pons, A. Microwave-assisted organosolv pretreatment of a sawmill mixed feedstock for bioethanol production in a wood biorefinery. *Bioresource Technology*. **2019**, 276, 170-176.
- [32] Kim, Y.; Yu, A.; Han, M.; Choib, G.; Chunga, B. Ethanosolv pretreatment of barley straw with iron(III) chloride for enzymatic saccharification. *Journal of Chemical Technology Biotechnology*. **2010**, 85,1494–1498.
- [33] Degenstein, J.; Kamireddy, S. R.; Tucker, M. P.; Ji, Y. Oligomer saccharide reduction during dilute acid pretreatment co-catalyzed with Lewis acids on corn stover biomass. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*. **2013**, 6, 54-62.
- [34] López-Linares, J. C.; Romero, I.; Moya, M.; Cara, C.; Ruiz, E.; Castro, E. Pretreatment of olive tree biomass with FeCl₃ prior enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*. **2013**, 128, 180-187.
- [35] Constant, S.; Basset, C.; Dumas, C.; Renzo, F.D.; Robitzer, M.; Barakat, A.; Quignard, F. Reactive organosolv lignin extraction from wheat straw: Influence of Lewis acid catalysts on structural and chemical properties of lignins. *Industrial Crops and Products*. **2015**, 65, 180-189.
- [36] Liu, L.; Sun, J.; Cai, C.; Wang, S.; Pei, H.; Zhang, J. Corn stover pretreatment by inorganic salts and its effects on hemicellulose and cellulose degradation. *Bioresource Technology*. **2009**, 100, 5865-5871.

- [37] Romero, I.; López-Linares, J. C.; Moya, M.; Castro, E. Optimization of sugar recovery from rapeseed straw pretreated with FeCl₃. *Bioresource Technology*. **2018**, 268, 204-211.
- [38] Agência Nacional de Energia Elétrica (ANEEL) - disponível em [WWW2.aneel.gov.br/aplicacoes/atlas/pdf/05-Biomassa\(2\).pdf](http://WWW2.aneel.gov.br/aplicacoes/atlas/pdf/05-Biomassa(2).pdf)
- [39] Zhang, Y-H. P.; Lynd, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. *Biotechnology and Bioengineering*. **2004**, 88, 797–824.
- [40] Shahzadi, T.; Mehmood, S.; Irshad, M.; Anwar, Z.; Afroz, A.; Zeeshan, N.; Rashid, U.; Sughra, K. Advances in lignocellulosic biotechnology: A brief review on lignocellulosic biomass and cellulases. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. **2014**, 5, 246–251.
- [41] Silva, F.V. Panorama e perspectivas do etanol lignocelulósico. *Revista Liberato*. **2012**, 13, 43–58.
- [42] Piló-Veloso, D.; Nascimento, E. A.; Morais, S. A. L. Isolamento e análise estrutural de ligninas. *Química Nova*. **1993**, 16, 435-448.
- [43] Rezania, S.; Ponraj, M.; Talaiekhosani, A.; Mohamad, S. E.; Din, M. F. M.; Taib, M. S.; Farzaneh Sabbagh, F.; Sairan, F. M. Perspectives of phytoremediation using water hyacinth for removal of heavy metals, organic and inorganic pollutants in wastewater. *Journal of Environmental Management*. **2015**, 163, 125-133.
- [44] Holanda, C. A. Aguapé (*Eichhornia crassipes*) como bioadsorvente do corante turquesa remazol. Dissertação. (Mestrado em Química Analítica) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís 2010.
- [45] Zhang, Q.; Wei, Y.; Han, H.; Weng, C. Enhancing bioethanol production from water hyacinth by new combined pretreatment methods. *Bioresource Technology*. **2018**, 251, 358–363.
- [46] Araujo, G. J. F.; Filho, A. R. A utilização do bagaço de cana de açúcar para a geração de energia elétrica: o estudo de caso em uma usina sucroenergética de grande

porte. *Revista de Agronegócio – Reagro, Jales*. **2018**, 7, 17-29.

[47] Zhang, H.; Lyu, G.; Zhang, A.; Li, X.; Xie, J. Effects of ferric chloride pretreatment and surfactants on the sugar production from sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*. **2018**, 265, 93-101.

[48] Zhang, Z.; Wongb, H. H.; Albertson, P. L.; Doherty, W. O. S.; O'Hara, I. M. Laboratory and pilot scale pretreatment of sugarcane bagasse by acidified aqueous glycerol solutions. *Bioresource Technology*. **2013**, 138, 14–21.

[49] Lv, X.; Lin, J.; Luo, L.; Zhang, D.; Lei, S.; Xiao, W.; Xu, Y.; Gong, Y.; Liu, Z. Enhanced enzymatic saccharification of sugarcane bagasse pretreated by sodium methoxide with glycerol. *Bioresource Technology*. **2017**, 249, 226-233.

[50] Cabral, A. C.; Theodorovitz, A. V.; Souza, S. N. M.; Junior, A. M. J.; Cabral, C. Milho (Zea Mays) uma cultura energética. *Acta Iguazu, Cascavel*. **2012**, 4, 47-54, 2012.

[51] Wei, W.; Jin, Y.; Wu, h.; Yuan, Z. Improving corn stover enzymatic saccharification via ferric chloride catalyzed dimethyl sulfoxide pretreatment and various additives. *Industrial Crops & Products*. **2019**, 140, 111663.

[52] Diaz, A. B.; Moretti, M. M. S.; Bezerra-Bussoli, C.; Nunes, C. C. C.; Blandino, A.; Silva, R.; Gomes, E. Evaluation of microwave-assisted pretreatment of lignocellulosic biomass immersed in alkaline glycerol for fermentable sugars production. *Bioresource Technology*, **2015**, 185, 316–323.

[53] Gonçalves, F. A.; Ruiz, H. A.; Santos, E. S. S.; Teixeira, J. A.; Gorete Ribeiro de Macedoa, G. R. Bioethanol production from coconuts and cactus pretreated by autohydrolysis. *Industrial Crops and Products*. **2015**, 1–12

[54] http://educabras.com/enem/matéria/biologia/reino_vegetal/aulas/angiopermas

[55] Nogueira, C. C.; Padilha, C. E. A.; Leitão, A. L. S.; Rocha, P. M.; Macedo, G. R.; Santos, E. S. Enhancing enzymatic hydrolysis of green coconut fiber—Pretreatment assisted by tween 80 and water effect on the post-washing. *Industrial Crops & Products*. **2018**, 112, 734–740.

- [56] Vaithanomsat, P.; Apiwatanapiwat, W.; Chumchuent, N.; Kongtud, W.; Sundhrarajun, S. The potential of coconut husk utilization for bioethanol production. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)*. **2011**, 45, 159-164.
- [57] Nogueira, C. C.; Padilha, C. E. A.; Jesus, A. A.; Souza, D. F. S.; Assis, C. F.; Junior, F. C. S.; Santos, E. S. Pressurized pretreatment and simultaneous saccharification and fermentation with in situ detoxification to increase bioethanol production from green coconut fibers. *Industrial Crops & Products*. **2019**, 130, 259–266.
- [58] Cabral, M. M. S.; Abud, A. K. S.; Silva, C. E. F.; Almeida, R. M. R. G. Bioethanol production from coconut husk fiber. *Ciência Rural, Santa Maria*. **2016**, 46, 1872-1877.
- [59] Padilha, C. E. A.; Nogueira, C. C.; Souza, D. F. S.; Oliveira, J. A.; Santos, E. S. Valorization of green coconut fibre: Use of the black liquor of organosolv pretreatment for ethanol production and the washing water for production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27583. *Industrial Crops & Products*. **2019**, 140, 111604.
- [60] De Rossi, E.; Lindino, C. A.; Santos, K. G.; Bariccattl, R. A.; Cremonez, P. A.; Antoneli, J.; Nadaleti, W. C. Pré-Tratamentos Na Produção De Etanol De Segunda Geração. *Revista Monografias Ambientais*. **2014**, 13, 3516–3522.
- [61] Ogeda, T. L.; Petri, D. F. S. Hidrólise Enzimática de Biomassa. *Quimica Nova*, **2010**, 33, 1549–1558.
- [62] Ganguly, A.; Chatterjee, P. K.; Dey, A. Studies on ethanol production from water hyacinth - A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. **2012**, 16, 966–972.
- [63] Trinh, L. T. P.; Lee, Y. J.; Lee, J-W.; Lee, H-J. Characterization of ionic liquid pretreatment and the bioconversion of pretreated mixed softwood biomass. *Biomass and Bioenergy*. **2015**, 81, 1–8.
- [64] Zhu, J. Y.; Pan, H. J. Woody biomass treatment for cellulosic ethanol production: technology and energy consumption evaluation. *Bioresource Technology*. **2010**.
- [65] Limayer, A.; Ricke, S. C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Progress in Energy and Combustion*

Science, **2012**, 38, 449–467.

[66] Nunes, R. M.; Guarda, E. A.; Serra, J. C. V.; Martins, A. A. Resíduos agroindustriais: potencial de produção do etanol de segunda geração no Brasil. *Liberato*. **2013**, 14, 113–238.

[67] Santos, J. R. A.; Souto-Maior, A. M.; Gouveia, E. R.; Martín, C. Comparação entre Processo em SHF e em SSF de Bagaço de Cana-de-açúcar para a Produção de Etanol por *Saccharomyces cerevisiae*. *Quimica Nova*. **2010**, 33, 904–908.

[68] Trinh, L. T. P.; Lee, J-W.; Lee, H-J. Acidified glycerol pretreatment for enhanced ethanol production from rice straw. *Biomass and Bioenergy*. **2016**, 94, 39-45.

[69] Agbor, V. B.; Cicek, N.; Sparling, R.; Berlin, A.; Levin, D. B. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. *Biotechnology Advances*. **2011**, 29, 675–685.

[70] Zhang, Z.; Wong, H. H.; Albertson, P. L.; Harrison, M. D.; Doherty, W. O. S.; O'Hara, I. M. Effects of glycerol on enzymatic hydrolysis and ethanol production using sugarcane bagasse pretreated by acidified glycerol solution. *Bioresource Technology*. **2015**, 192, 367–373.

[71] Arato, C.; Pye, E. K.; Gjennestad, G. The lignol approach to biorefining of woody biomass to produce ethanol and chemicals. *Application Biochemical Biotechnology*. **2005**, 123, 871–882.

[72] Zhao, X.; Cheng, K.; Liu, D. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. *Application Microbiology Biotechnology*. **2009**, 82, 815–827.

[73] Kim, D.; Pan, X. Preliminary study on converting hybrid poplar to high-value chemicals and lignin using organosolv ethanol process. *Industrial Engineering Chemistry Research*. **2010**, 49, 12156–12163.

[74] Martín, C.; Puls, J.; SaaKe, B.; Schreiber, A. Effect of Glycerol Preatreatment on Component Recovery and Enzymatic Hydrolysis of Sugarcane Bagasse. *Cellulose Chemical. Technology*. **2011**, 45, 487-494.

[75] Lenardão, E. J.; Barcellos, A. M.; Penteadó, F.; Alves, D.; Perin, G. Glicerol como

Solvente em Síntese Orgânica. *Revista Virtual Química*. **2017**, 9, 192-237.

[76] Hundt, M.; Shnitzlein, K.; Schnitzlein, M. G. Alkaline polyol pulping and enzymatic hydrolysis of hardwood: Effect of pulping severity and pulp composition on cellulase activity and overall sugar yield. *Bioresource Technology*. **2013**, 136, 672–679.

[77] Sun, F.; Chen, H. Enhanced enzymatic hydrolysis of wheat straw by aqueous glycerol pretreatment. *Bioresource Technology*. **2008**, 99, 6156–6161.

[78] Diaz, A. B.; Moretti, M. M. S.; Bezerra-Bussoli, C.; Nunes, C. C. C.; Blandino, A.; Silva, R.; Gomes, E. Evaluation of microwave-assisted pretreatment of lignocellulosic biomass immersed in alkaline glycerol for fermentable sugars production. *Bioresource Technology*, **2015**, 185, 316–323.

[79] Francisco Junior, W. E. Carboidratos: Estrutura, Propriedades e Funções. *Química Nova na Escola*, **2008**, 29, 8-13.

[80] Bruice, P. Y. *Química Orgânica*, 4ed.; SãoPaulo: Pearson Prentice Hall, 2006.

[81] Santos, A. A.; Deoti, J. R.; Müller, G.; Dário, M. G.; Stambuk, B. U.; Alves Junior, S. L. Dosagem de açúcares redutores com o reativo DNS em microplaca. *Brazilian Journal Food Technology*, Campinas, **2017**, 20, 1-9.

[82] Shao, Y.; Lin, A. H-M. Improvement in the quantification of reducing sugars by miniaturizing the Somogyi-Nelson assay using a microtiter plate. *Food Chemistry*, **2018**, 240, 898–903.

[83] Negrulescu, A.; Patrulea, V.; Mincea, M. M.; Ionascu, C.; Beatrice A. Vlad-Oros, B. A.; Ostafe, V. Adapting the Reducing Sugars Method with Dinitrosalicylic Acid to Microtiter Plates and Microwave Heating. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **2012**, 12, 2176-2182.

[84] Saqib, A. A. N.; Whitney, P. J. Differential behaviour of the dinitrosalicylic acid (DNS) reagent towards mono- and di-saccharide sugars. *Biomass and Bioenergy*, **2011**, 35, 4748-4750.

- [85] Caldas, B. S.; Constantino, L. V.; Cynthia Helena Gomes Alves Silva, C. H. G. A.; Madeira, T. B.; Nixdorf, S. L. Determinação de açúcares em suco concentrado e néctar de uva: comparativo empregando refratometria, espectrofotometria e cromatografia líquida. *Scientia Chromatographica*, **2015**; 7, 53-63.
- [86] Corrêa, L. C.; Rybka, A. C. P.; Silva, P. T. S.; Aline Camarão Telles Biasoto, A. C. T.; Pereira, G. E. Determinação de Açúcares em Mosto, Sucos de Uva e Vinho por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Clae). *Petrolina: Embrapa Semiárido*, **2013**.
- [87] Goncalves, C.; Rodriguez-Jasso, R. M.; Gomes, N.; Teixeira, J. A.; Belo, I. Adaptation of dinitrosalicylic acid method to microtiter plates. *Analytical Methods*, **2010**, 2, 2046–2048.
- [88] Vasconcelos, N. M.; Pinto, G. A. S.; Aragão, F. A. S. Determinação de Açúcares Redutores pelo Ácido 3,5-Dinitrosalicílico: Histórico do Desenvolvimento do Método e Estabelecimento de um Protocolo para o Laboratório de Bioprocessos. *Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical*, **2013**.
- [89] Maldonade, I. R.; Carvalho, P. G. B.; Ferreira, N. A. Protocolo para determinação de açúcares totais em hortaliças pelo método de DNS. *Comunicado Técnico 85, Embrapa*, **2013**.
- [90] Sumner, J. B. Dinitrosalicylic acid: a reagent for the estimation of sugar in normal and diabetic urine. *The Journal of Biological Chemistry*, **1921**, 47, 5-9.
- [91] Sumner, J. B. The estimation of sugar in diabetic urine, using dinitrosalicylic acid. *The Journal of Biological Chemistry*, **1924**, 62, 287-290.
- [92] Sumner, J. B. A more specific reagent for the determination of sugar in urine. *The Journal of Biological Chemistry*, **1925**, 65, 393-395.
- [93] Bernfeld, P. Amylases, α and β . *Methods in Enzymology*, **1955**, 1, 149-157.
- [94] Miller, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, **1959**, 31, 426-428.

- [95] Yan, J.; Wei, Z.; Wanga, Q.; He, M.; Li, S.; Irbis, C. Bioethanol production from sodium hydroxide/hydrogen peroxide-pretreated water hyacinth via simultaneous saccharification and fermentation with a newly isolated thermotolerant *Kluyveromyces marxianu* strain. *Bioresource Technology*, **2015**, 193, 103–109.
- [96] Condezo-Hoyos, L.; Pérez-López, L.; Rupérez, P. Improved evaporative light scattering detection for carbohydrate analysis. *Food Chemistry*, **2015**, 180, 265–271.
- [97] Filson, P. B.; Dawson-Andoh, B. E. Characterization of sugars from model and enzyme-mediated pulp hydrolyzates using high-performance liquid chromatography coupled to evaporative light scattering detection. *Bioresource Technology*, **2009**, 100, 6661–6664.
- [98] Li, J.; Chen, M.; Zhua, Y. Separation and determination of carbohydrates in drinks by ion chromatography with a self-regenerating suppressor and an evaporative light-scattering detector. *Journal of Chromatography A*, **2007**, 1155, 50–56.
- [99] Liu, X.; Ai, N.; Zhang, H.; Lu, M.; Ji, D.; Yu, F.; Ji, J. Quantification of glucose, xylose, arabinose, furfural, and HMF in corncob hydrolysate by HPLC-PDA–ELSD. *Carbohydrate Research*, **2012**, 353, 111–114.
- [100] Ma, C.; Sun, Z.; Chen, C.; Zhang, L.; Zhu, S. Simultaneous separation and determination of fructose, sorbitol, glucose and sucrose in fruits by HPLC–ELSD. *Food Chemistry*, **2014**, 145, 784–788.
- [101] Shanmugavelan, P.; Kim, S. Y.; Kim, J. B.; Kim, H. W.; Cho, S. M.; Kim, S. N.; Kim, S. Y.; Cho, Y. S.; Kim, H. R. Evaluation of sugar content and composition in commonly consumed Korean vegetables, fruits, cereals, seed plants, and leaves by HPLC-ELSD. *Carbohydrate Research*, **2013**, 380, 112–117.
- [102] Wang, S.; Yang, F.; Feng, K.; Li, D.; Zhao, J.; Li, S. Simultaneous determination of nucleosides, myriocin, and carbohydrates in *Cordyceps* by HPLC coupled with diode array detection and evaporative light scattering detection. *Journal of Separation Science*, **2009**, 32, 4069–4076.

- [103] Wei, Y.; Ding, M. Analysis of carbohydrates in drinks by high-performance liquid chromatography with a dynamically modified amino column and evaporative light scattering detection. *Journal of Chromatography A*, **2000**, 904, 113–117.
- [104] Filip, M.; Vlassa, M.; Coman, V.; Halmagyi, A. Simultaneous determination of glucose, fructose, sucrose and sorbitol in the leaf and fruit peel of different apple cultivars by the HPLC–RI optimized method. *Food Chemistry*, **2016**, 199, 653–659.
- [105] Hetrick, E. M.; Kramer, T. T.; Risley, D. S. Evaluation of a hydrophilic interaction liquid chromatography design space for sugars and sugar alcohols. *Journal of Chromatography A*, **2017**, 1489, 65–74.
- [106] Karlsson, G.; Winge, S.; Sandberg, H. Separation of monosaccharides by hydrophilic interaction chromatography with evaporative light scattering detection. *Journal of Chromatography A*, **2005**, 1092, 246–249.
- [107] Galant, A. L.; Kaufman, R. C.; Wilson, J. D. Glucose: Detection and analysis. *Food Chemistry*, **2015**, 188, 149–160.
- [108] Nogueira, L. C.; Silvab, F.; Ferreira, I. M. P. V. O.; Trugo, L. C. Separation and quantification of beer carbohydrates by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *Journal of Chromatography A*, **2005**, 1065, 207–210.
- [109] Sharma, U.; Bhandari, P.; Kumar, N.; Singh, B. Simultaneous Determination of Ten Sugars in *Tinospora cordifolia* by Ultrasonic Assisted Extraction and LC-ELSD. *Chromatographia*, **2010**, 71, 633-638.
- [110] Schulze, C.; Strehle, A.; Merdivan, S.; Mundt, S. Carbohydrates in microalgae: Comparative determination by TLC, LC-MS without derivatization, and the photometric thymol-sulfuric acid method. *Algal Research*, **2017**, 25, 372–380.
- [111] Ghfar, A. A.; Wabaidur, S. M.; Ahmed, A. Y. B. H.; Alothman, Z. A.; Khan, M. R.; Al-Shaalan, N. H. Simultaneous determination of monosaccharides and oligosaccharides in dates using liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry*, **2015**, 176, 487–492.

- [112] Gonzalez, M. H.; Bianchi, S. R.; Pereira, C. D.; Cassiano, N. M.; Cass, Q. B. Detector evaporativo com espalhamento de luz: princípios de operação e aplicações em cromatografia líquida de alta eficiência. *Scientia Chromatographica*, **2011**; 3, 315-325.
- [113] Wang, W.; Chen, F.; Wang, Y.; Wang, L.; Fub, H.; Zheng, F.; Beecherd, L. Optimization of reactions between reducing sugars and 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP) by response surface methodology. *Food Chemistry*, **2018**, 254, 158–164.
- [114] Ricochon, G.; Paris, C.; Girardin, M.; Muniglia, L. Highly sensitive, quick and simple quantification method for mono and disaccharides in aqueous media using liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization–mass spectrometry (LC–APCI–MS). *Journal of Chromatography B*, **2011**, 879, 1529–1536.
- [115] Yan, J.; Shi, S.; Wang, H.; Liu, R.; Li, N.; Chen, Y.; Wang, S. Neutral monosaccharide composition analysis of plant-derived oligo- and polysaccharides by high performance liquid chromatography. *Carbohydrate Polymers*, **2016**, 136, 1273–1280.
- [116] Forrest, A. K.; Hernandez, J.; Holtzapple, M. T. Effects of temperature and pretreatment conditions on mixed-acid fermentation of water hyacinths using a mixed culture of thermophilic microorganisms. *Bioresource Technology*, **2010**, 101, 7510–7515.
- [117] Lynam, J. G.; Coronella, C. J. Glycerol as an ionic liquid co-solvent for pretreatment of rice hulls to enhance glucose and xylose yield. *Bioresource Technology*, **2014**, 166, 471–478.
- [118] Jiang, L.; Zheng, A.; Zhao, Z.; He, F.; Li, H. Comprehensive utilization of glycerol from sugarcane bagasse pretreatment to fermentation. *Bioresource Technology*, **2015**, 196, 194–199.
- [119] Rodrigues, M. I.; Iemma, A. F. *Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: uma estratégia sequencial de planejamentos*, 1ed.; Campinas, SP: Casa do Pão Editora, **2005**.
- [120] Neto, B. B.; Scarminio, I. S.; Bruns, R. E. *Planejamento e Otimização de Experimentos*, 2ed.; Campinas, SP: Editora da UNICAMP, **1996**.

- [121] Pereira-Filho, E. R.; Poppi, R. J.; Arruda, M. A. Z. Emprego de Planejamento Fatorial Para a Otimização das Temperaturas de Pirólise e Atomização de Al, Cd, Mo E Pb por ETAAS. *Quimica Nova*, **2002**, 2, 246-253.
- [122] Neves, C. F. C.; Mônica Maria de Abreu Mendonça Schwartzman, M. M. A. M.; Jordão, E. Técnica Para Seleção de Variáveis Aplicada à Separação de Gases. *Quimica Nova*, **2002**, 2, 327-329.
- [123] Singh, R. S.; Lotey, S. Enhanced Exoinulinase Production from *Kluyveromyces marxianus* YS-1 using Response Surface Methodology. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **2010**, 5, 1005-1013.
- [124] Jalali-Heravi, M.; Parastar, H.; Ebrahimi-Najafabadi, H. Characterization of volatile components of Iranian saffron using factorial-based response surface modeling of ultrasonic extraction combined with gas chromatography–mass spectrometry analysis. *Journal of Chromatography A*, **2009**, 1216, 6088–6097.
- [125] Gilannejad, N.; Martínez-Rodríguez, G.; Yúfera, M.; Moyano, F. J. Estimating the effect of different factors on the digestive bioaccessibility of protein by the Senegalese sole (*Solea senegalensis*); combination of response surface methodology and in vitro assays. *Aquaculture*, **2017**, 477, 28–34.
- [126] Rodrigues, M. I.; Maciel Filho, R.; Maugeri, F. Optimization of a process of continuous enzyme purification by surface response analysis. *Food Control*, **1993**, 3, 144-148.
- [127] Ribeiro, L. R.; Leite Júnior, B. R. C.; Tribst, A. A. L.; Cristianini, M. Comparative study of the effect of high pressure processing on the residual activity of milk coagulants in buffer and in ultrafiltered cheese. *LWT - Food Science and Technology*, **2017**, 82, 1-7.
- [128] Nawani, N. N.; Kapadnis, B. P. Optimization of chitinase production using statistics based experimental designs. *Process Biochemistry*, **2005**, 40, 651–660.
- [129] Liu, C.; Linb, T.; Juang, R. Optimization of recombinant hexaoligochitin-producing chitinase production with response surface methodology. *International Journal of Biological Macromolecules*, **2013**, 62, 518– 522.

- [130] Pandit, P. R.; Fulekar, M. H. Egg shell waste as heterogeneous nanocatalyst for biodiesel production: Optimized by response surface methodology. *Journal of Environmental Management*, **2017**, 198, 319-329.
- [131] Brasil, J. L.; Eva, R. R.; Milcharek, C. D.; Martins, L. C.; Flavio A. Pavan, F. A.; Santos Jr., A. A.; Dias, S. L. P.; Dupont, J.; Norena, C. P. Z.; Eder C. Lima, E. C. Statistical design of experiments as a tool for optimizing the batch conditions to Cr(VI) biosorption on *Araucaria angustifolia* wastes. *Journal of Hazardous Materials B*, **2006**, 133, 143–153.
- [132] Santos, L. K.; Hatanaka, R. R.; Oliveira, J. E.; Flumignan, D. L. Experimental factorial design on hydroesterification of waste cooking oil by subcritical conditions for biodiesel production. *Renewable Energy*, **2017**, 114, 574-580.
- [133] Box, G. E. P.; Hunter, J. S.; Hunter, W. G. *Statistics for Experimenters: Design, Innovation, and Discovery*, 2 ed.; John Wiley & Sons, 1976.
- [134] Cruz, D. R. S.; Santos, B. T. J.; Cunha, G. C.; Romão, L. P. C. Green synthesis of a magnetic hybrid adsorbent (CoFe₂O₄/NOM): Removal of chromium from industrial effluent and evaluation of the catalytic potential of recovered chromium ions. *Journal of Hazardous Materials*, **2017**, 334, 76–85.
- [135] Ghose, T.K. Measurement of Cellulase Activities. *Pure & Applied Chemistry*, **1987**, 59, 257-268.
- [136] 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. *NREL/TP-510-42621*, **2008**.
- [137] Sluiter, A.; Hames, B.; Ruiz, R.; Scarlata, C.; Sluiter, J.; Templeton, D. Determination of Ash in Biomass. *NREL/TP-510-42622*, **2008**.
- [138] Sluiter, A.; Hames, B.; Ruiz, R.; Scarlata, C.; Sluiter, J.; Templeton, D.; Crocker, D. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. *NREL/TP-510-42618*, **2012**.

- [139] Zhang, W.; Barone, J.R.; Renneckar, S. Biomass fractionation after denaturing cell walls by glycerol thermal processing. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, **2015**, 3, 413-420.
- [140] Liu, J.; Takada, R.; Karita, S.; Watanabe, T.; Honda, Y.; Watanabe, T. Microwave-assisted pretreatment of recalcitrant softwood in aqueous glycerol. *Bioresource Technology*, **2010**, 101, 9355-9360.
- [141] Ji, L.; Lei, F.; Zhang, W.; Song, X.; Jiang, J.; Wang, K. Enhancement of bioethanol production from Moso bamboo pretreated with biodiesel crude glycerol: Substrate digestibility, cellulase adsorption and fermentability. *Bioresource Technology*, **2019**, 276, 300-309.
- [142] Zhang, W.; Sathitsuksanoh, N.; Simmons, B. A.; Frazier, C. E.; Barone, J.; Renneckar, S. Revealing the thermal sensitivity of lignin during glycerol thermal processing through structural analysis. *RSC Advances*, **2016**, 6, 30234-30246.
- [143] Liu, C.; Wyman, C. E. The enhancement of xylose monomer and xylotriose degradation by inorganic salts in aqueous solutions at 180 °C. *Carbohydrate Research*, **2006**, 341, 2550-2556.
- [144] Hilares, R. T.; Swerts, M. P.; Ahmed, M. A.; Ramos, L.; Silva, S. S.; Santos, J. C. Organosolv pretreatment of sugarcane bagasse for bioethanol production. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **2017**, 56, 3833-3838.
- [145] Kim, Y.; Yu, A.; Han, M.; Choib, G.; Chunga, B. Ethanosolv pretreatment of barley straw with iron(III) chloride for enzymatic saccharification. *Journal of Chemical Technology Biotechnology*, **2010**, 85,1494–1498.
- [146] Kamireddy, S. R.; Li, J.; Tucker, M.; Degenstein, J.; Ji, Y. Effects and mechanism of metal chloride salts on pretreatment and enzymatic digestibility of corn stover. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **2013**, 52, 1775-1782.
- [147] Zhang, H.; Zhang, S.; Yuan, H.; Lyu, G.; Xie, J. FeCl₃-catalyzed ethanol pretreatment of sugarcane bagasse boosts sugar yields with low enzyme loadings and short hydrolysis time. *Bioresource Technology*, **2018**, 249, 395-401.

- [148] Bellido, C.; Bolado, S.; Coca, M.; Lucas, S.; González-Benito, G.; García-Cubero, M. T. Effect of inhibitors formed during wheat straw pretreatment on ethanol fermentation by *Pichia stipites*. *Bioresource Technology*, **2011**, 102, 10868-10874.
- [149] Toquero, C.; Bolado, S. Effect of four pretreatments on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of wheat straw. Influence of inhibitors and washing. *Bioresource Technology*, **2014**, 157, 68-76.
- [150] Gundupalli, M. P.; Bhattacharyya, D. Sequential acid hydrolysis and enzymatic saccharification of coconut coir for recovering reducing sugar: Process evaluation and optimization. *Bioresource Technology Reports*, **2019**, 6, 70–80.
- [151] Minu, K.; Jiby, K. K.; Kishore, V. V. N. Isolation and purification of lignin and silica from the black liquor generated during the production of bioethanol from rice straw. *Biomass and Bioenergy*, **2012**, 39, 210-217.
- [152] Kim, D.; Cheon, J.; Kim, J.; Hwang, D.; Hong, I.; Kwon, O. H.; Park, W. H.; Cho, D. Extraction and characterization of lignin from black liquor and preparation of biomass-based activated carbon there from. *Carbon Letters*, **2017**, 22, 81-88.
- [153] Guo, X.; Zhang, S.; Shan, X-q. Adsorption of metal ions on lignin. *Journal of Hazardous Materials*, **2008**, 151, 134-142.
- [154] Ardi, M. S.; Aroua, M. K.; Awanis Hashim, N. Progress, prospect and challenges in glycerol purification process: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **2015**, 42, 1164-1173.