

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL

IRANILDO JOSÉ DA CRUZ FILHO

**SEPARAÇÃO DOS PRINCIPAIS COMPONENTES DO CAVACO DE
EUCALIPTO, HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA CELULOSE E
CARACTERIZAÇÃO DAS FRAÇÕES OBTIDAS**

Recife
2016

IRANILDO JOSÉ DA CRUZ FILHO

**SEPARAÇÃO DOS PRINCIPAIS COMPONENTES DO CAVACO DE
EUCALIPTO, HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA CELULOSE E
CARACTERIZAÇÃO DAS FRAÇÕES OBTIDAS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial, da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial. Área de concentração: Microbiologia, Bioprocessos e Bioprodutos

Orientadores: Prof. Dr. George Jackson de Moraes Rocha
Prof (a) Dr(a). Ana Maria Souto Maior

Recife

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

IRANILDO JOSÉ DA CRUZ FILHO

**SEPARAÇÃO DOS PRINCIPAIS COMPONENTES DO CAVACO DE
EUCALIPTO, HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA CELULOSE E
CARACTERIZAÇÃO DAS FRAÇÕES OBTIDAS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial, da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial. Área de concentração: Microbiologia, Bioprocessos e Bioprodutos.

Orientadores: Prof. Dr. George Jackson de Moraes Rocha
Prof (a) Dr(a). Ana Maria Souto Maior

Aprovado em, 26 de Fevereiro de 2016.

BANCA AVALIADORA

Prof Dr. George Jackson de Moraes Rocha
Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol

Profª Dra. Ana Maria Souto Maior
Universidade Federal de Pernambuco

Profª Dra. Marcia Silva do Nascimento
Universidade Federal de Pernambuco

Profª Dra. Andréa Lopes Bandeira Delmiro Santana
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus** pelo dom da vida e por tudo que conquistei.

Aos professores/ Orientadores Prof. **George Jackson Moraes Rocha** e Prof.^a **Ana Maria Souto-Maior** pela paciência, dedicação, competência na orientação do trabalho, pelo companheirismo e amizade.

Aos professores **Alexandre Ricardo Pereira Schuler, Olga Martins Marques, Marcia Nascimento, Eulália Ximenes, Janaina Versiani, Glaucia Manoella, Irapuan Pinheiro, Ester Gouveia** por todo auxílio durante o mestrado.

Um agradecimento especial para **Eliete, Elaine, Maria da Conceição, Gian Carlos** e **Janaina Cirino** técnicos da Central analítica do DQF, DEMEC da UFPE e CETENE. Ao Centro de apoio a pesquisa CENAPESQ da UFRPE, aonde foram realizados experimentos de caracterização dos Cavacos de Eucalipto.

A **Fibria** por gentilmente ter cedido os cavacos de eucalipto usados no trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial, **PPGBI**. Aos meus colegas do Lado B – **Andrezza, Anderson, Katharina, Natalie** e **Sabrina** pela força durante todo esse tempo. Amo vocês. À **CAPES** pela provisão da bolsa de mestrado.

Ao meu grupo de pesquisa do Laboratório de Processos Biotecnológicos: **Nina Rosa** (Ninoca), a **Vanessa Lima** (Vanessinha menina bem pretinha), **Laís Nerys** (Meu amor tão louco), **Cynthia Coimbra, Juliette, Monique, Amanda** e a mais nova integrante **Samyla**. Realmente não sei como agradecer a vocês pelas conversas e por dias em que os experimentos acabavam muito tarde, mas acima de tudo obrigado pela amizade. VALEU!

Um agradecimento em especial para **Ângela Maria, Solange, Luiz, Fatima e Emerson** funcionarios do Departamento de Antibióticos da UFPE.

Aos pesquisadores do laboratório de Biofisica de membranas por toda ajuda.

Meu agradecimento a meus pais: **Severina dos Ramos da Cruz** e **Iranildo José da Cruz** pelo amor e dedicação e aos meus irmãos **Isis** e **Iranilson**. Agradeço também aos meus amigos de jornada: **Cybelle do Carmo, Larissa Marciel, Romulo, Leticia de Paula, Michelle Oliveira, Ana Maria, Gilvania Costa, Genival Urbano, Valmir Lima**. Aos colegas dos Laboratório de Genética de micro-organismos, de Síntese Orgânica, Microbiologia industrial e Cromatografia pela ajuda e auxílio sempre pelo enorme incentivo e apoio.

E por fim a **TODOS** que estiveram presentes e contribuíram para a realização deste trabalho.

“Para realizar grandes conquistas, devemos não apenas agir, mas também sonhar; não apenas planejar, mas também acreditar”.

Anatole France

RESUMO

Considerada um importante produto comercial, a madeira de eucalipto está disponível no território brasileiro de maneira sustentável e em grandes quantidades, fornecendo produtos bastante valorizados no mercado. Atualmente o país é um dos maiores produtores de celulose proveniente das florestas de eucalipto. A lignina, depois da celulose, é o segundo mais abundante biopolímero encontrado na natureza e apresenta diversas aplicações estando inserida no conceito de biorrefinaria. O presente trabalho teve como objetivo a separação dos principais componentes do cavaco de eucalipto. Além de avaliar o efeito do pré-tratamento hidrotérmico seguido de deslignificação alcalina na biomassa, visando à obtenção de um material lignocelulósico mais facilmente hidrolisável por enzimas celulolíticas. Os pré-tratamentos foram realizados em um reator rotatório de 20 L (Regmed AU/E-20), relação sólido: líquido 1:10 ($\text{m}\cdot\text{v}^{-1}$). A eficiência dos pré-tratamentos foi verificada através da comparação de análises físico-químicas e da conversão de celulose em glicose na madeira “in natura” e pré-tratada. Os cavacos de eucalipto utilizados, foram caracterizados quimicamente e analisados por microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de infravermelho por transformada de fourier (FT-IR), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e difração de raios-X (DRX). Para avaliação da conversão enzimática, utilizou-se 15 $\text{FPU}\cdot\text{g}^{-1}$ de celulase e 10 $\text{UI}\cdot\text{g}^{-1}$ de β -glicosidase em tampão Citrato de sódio $0,05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 4,8 sob agitação de 150 rpm, temperatura de 50 °C e relação sólido: líquido 2% ($\text{m}\cdot\text{v}^{-1}$). A lignina obtida na deslignificação, foi precipitada com ácido sulfúrico até pH 2 em temperatura ambiente. A reação foi mantida sem agitação por 12h. Em seguida o precipitado foi seco, acetilado e caracterizado pelas técnicas: espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR), ressonância nuclear magnética (RMN de ^1H e ^{13}C), espectroeletrônica na região do ultravioleta UV/Vis, análise elementar e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os resultados obtidos mostraram que a hemicelulose foi o componente que sofreu maior solubilização, 93%. Após a deslignificação alcalina o teor de celulose e lignina na fração sólida diminuíram em 35,96% e 82% respectivamente, esses valores correspondem a solubilização das macromoléculas quando comparadas a biomassa “in natura”. As análises químicas comprovaram que ao decorrer do processo ocorreu aumento no índice de cristalinidade da celulose, devido a remoção de hemicelulose e lignina. A hidrólise dos cavacos deslignificados confirmou a eficiência dos pré-tratamentos, uma vez que a conversão de celulose em glicose foi de 65% indicando que quantidades menores de hemicelulose e lignina favorecem o processo de hidrólise. As técnicas de FT-IR e RMN demonstraram efetividade da reação acetilação. Através da análise elementar e de RMN foi possível obter a expressão para a fórmula mínima C_9 sendo: $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{O}_{4,8}(\text{OCH}_3)_{1,37}$. O percentual de unidades guaiacila na madeira é de 63%. O Espectros de UV/Vis mostrou um deslocamento batocrômico em 281 nm evidenciando alto teor de unidades G. O valor obtido para a absorvidade foi de $22,55\text{ L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Sendo assim a madeira de eucalipto se torna um produto bastante atrativo para o mercado, devido a quantidade de produtos que podem ser gerados.

Palavras-chave: *Eucalyptus urograndis*, Lignina, Pré-tratamento, Caracterização química, Biorrefinarias

ABSTRACT

Considered an important commercial product, the wood is available in Brazilian territory in a sustainable way and in large quantities, providing products quite valued at market. Currently the country is one of the largest producers of pulp from eucalyptus forests. The lignin, after cellulose, is the second most abundant biopolymer found in nature and presents several applications being inserted into the concept of biorefinery. The present work had as objective the separation of the main components of the eucalyptus wood. In addition to assessing the effect of pretreatment hydrothermal followed by delignification alkaline in biomass, aiming to obtain a lignocellulosic material more easily hydrolysable by enzymes. The pretreatments were performed in a reactor rotatory 20 L (Regmed AU/E-20), relationship solid: liquid 1:10 ($\text{m}\cdot\text{v}^{-1}$). The efficiency of the pre-treatments was verified through the comparison of physical-chemical analysis and the conversion of cellulose into glucose. The eucalypt wood used, were chemically characterized and analyzed by scanning electron microscopy (SEM), Fourier transformed infrared spectroscopy (FT-IR), high-performance liquid chromatography (HPLC) and X-ray diffraction (XRD). For evaluation of enzymatic conversion, it was used 15 FPU $\cdot\text{g}^{-1}$ of cellulase and 10 IU $\cdot\text{g}^{-1}$ of β -glucosidase in sodium citrate buffer 0.05 mol $\cdot\text{L}^{-1}$, pH 4.8 under stirring of 150 rpm, temperature of 50 °C and relationship solid:liquid 2% ($\text{m}\cdot\text{v}^{-1}$). The lignin obtained in delignification, was precipitated with sulfuric acid up to pH 2 at ambient temperature. The reaction was maintained without agitation for 12h. Then the precipitate was dry, acetylated and characterized by techniques: Fourier transformed infrared spectroscopy (FT-IR), nuclear magnetic resonance (NMR of ^1H and ^{13}C), in the region of ultraviolet UV/Vis, elemental analysis and scanning electron microscopy (SEM). The results obtained showed that the hemicellulose was the component that suffered the greatest solubilization, 93%. After the delignification alkaline the content of cellulose and lignin in solid fraction decreased in 35.96% and 82% respectively, these values correspond to the solubilization of macromolecules when compared to biomass in natura. The chemical analyzes have proven that the course of the procedure occurred an increase in crystallinity index of cellulose, due to removal of hemicellulose and lignin. The hydrolysis of eucalyptus wood without lignin confirmed the efficiency of pretreatments, once the conversion of cellulose into glucose was 65% indicating that smaller quantities of hemicellulose and lignin favor the process of hydrolysis. The techniques of FT-IR and NMR demonstrated effectiveness of the reaction acetylation. Through the elemental analysis and NMR was possible to obtain the expression to the minimum equation C_9 being: $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{O}_{4,8}(\text{OCH}_3)_{1,37}$. The percentage of guaiacyl in eucalyptus wood is 63%. The spectrum of UV/Vis showed a displacement in 281 nm evidencing high content of units G. the value obtained for the was 22,55 L $\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Thus the eucalypt wood becomes an attractive product for the market, due to the quantity of products which may be generated.

Keywords: *Eucalyptus urograndis*, Lignin, pretreatment, chemical characterization, biorefineries

SUMARIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	iv
1.INTRODUÇÃO	1
2.OBJETIVOS	3
2.1.Objetivo geral	3
2.2.Objetivos Específicos	3
3.REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3.1.BIORREFINARIA	4
3.2.BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA COMO MATÉRIA-PRIMA DAS BIORREFINARIAS	5
3.2.1.Parede Celular Vegetal	6
3.2.2.Composição química da biomassa lignocelulósica	7
3.2.2.1.Celulose	7
3.2.2.2.Hemicelulose	8
3.2.2.3.Lignina.....	10
3.2.2.4.Valorização da lignina: Obtenção de bioprodutos.....	14
3.3.MADEIRA DE EUCALIPTO	16
3.4.PRÉ-TRATAMENTO DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS	18
3.4.1.Pré-tratamento Hidrotérmico	20
3.4.2.Deslignificação Alcalina	22
3.5.HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS	22
4.MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.1.BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA	25

4.2.PRÉ- TRATAMENTO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA	25
4.2.1.Pré-tratamento Hidrotérmico	25
4.2.1.1.Análise química da fração solúvel obtida no pré-tratamento (hidrolisado hemicelulósico).....	27
4.2.2.Deslignificação alcalina.....	28
4.2.2.1.Obtenção da Lignina.....	29
4.3.CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS CAVACOS DE eucalipto.....	30
4.3.1.Determinação do peso seco de cavaco de eucalipto	30
4.3.2.Análise de extrativos	30
4.3.3.Hidrólise dos cavacos de eucalipto em H_2SO_4 72% ($\text{v}\cdot\text{v}^{-1}$)	30
4.3.4.Determinação do teor de lignina solúvel	31
4.3.5.Determinação de carboidratos, ácido orgânicos, HMF e furfural na fração líquida.....	33
4.3.6.Determinação de lignina insolúvel em meio ácido, teor de cinzas de lignina e cinzas totais.....	32
4.3.7.Análise morfológica e estrutural dos cavacos de eucalipto.....	33
4.3.7.1.Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	34
4.3.7.2.Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR).....	34
4.3.7.3.Difração de raio X – (DRX)	34
4.4.HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DOS CAVACOS DE EUCALIPTO	34
4.4.1.Hidrólise enzimática em biorreator de bancada	34
4.5.CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA LIGNINA.....	36
4.5.1.Identificação da estrutura química da lignina.....	36
4.5.1.1.Acetilação da lignina	36
4.5.2.Caracterização química da lignina.....	36
4.5.2.1.Análise elementar	36
4.5.2.2.Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	37

4.5.2.3. Espectroscopia de Ressonância magnética nuclear (RMN) da lignina acetilada.....	38
4.5.2.4. Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR).....	37
4.5.2.5. Análise Espectroeletrônica na região do ultravioleta	37
4.5.2.6. Determinação dos coeficientes de extinção das ligninas.....	37
4.5.2.7. Determinação da fórmula mínima	38
5.RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1. PRÉ-TRATAMENTO HIDROTÉRMICO E DESLIGNIFICAÇÃO ALCALINA DOS CAVACOS DE EUCALIPTO EM REATOR ROTATÓRIO	39
5.2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E MORFOLÓGICA DOS CAVACOS DE EUCALIPTO	42
5.2.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	42
5.2.2. Difração de raios-X (DRX)	44
5.2.3. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR).....	46
Fonte: Adaptado de Xu et al. (2013).	47
5.3. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DOS CAVACOS DE EUCALIPTO	48
5.4. CARACTERIZAÇÃO DA LIGNINA	51
5.4.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das ligninas.....	51
5.4.2. Espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier FT-IR	52
5.4.3. Espectroscopia de Ressonância Nuclear Magnética.....	55
5.4.4. Análise elementar da lignina “in natura” e acetilada.....	57
5.4.5. Espectroscopia de UV/Vis lignina de eucalipto “in natura”	58
6.CONCLUSÃO.....	60
7.SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	61
8.REFERENCIAS	62

APÊNDICE A	CURVAS ANALÍTICAS E CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR CLAE PARA OS AÇÚCARES, ÁCIDOS ORGÂNICOS E PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO.....	78
APÊNDICE B	RESULTADOS DA CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS CAVACOS DE EUCALIPTO “IN NATURA”.....	81
APÊNDICE C:	RESULTADOS DA CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS CAVACOS DE EUCALIPTO SUBMETIDOS A PRÉ-TRATAMENTO HIDROTÉRMICO.....	84
APÊNDICE D:	RESULTADOS DA CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS CAVACOS DE EUCALIPTO SUBMETIDOS A DESLIGNIFICAÇÃO ALCALINA.....	87
APÊNDICE E:	RAMPA DE CONTROLE DA TEMPERATURA E TEMPO DO PRÉ-TRATAMENTO HIDROTÉRMICO, E PÓS HIDRÓLISE ÁCIDA DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO.....	90
APÊNDICE F:	ANÁLISE POR DIFRAÇÃO DE RAIO X – (DRX)	91
APÊNDICE G:	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR) CAVACOS DE EUCALIPTO.....	95
APÊNDICE H:	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.....	99
APÊNDICE I:	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR).....	104
APÊNDICE J:	ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA NUCLEAR MAGNÉTICA.....	107
APÊNDICE K:	ESPECTROSCOPIA UV/Vis LIGNINA “IN NATURA”.....	114

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema simplificado de escala de valoração econômica dos possíveis produtos de uma biorrefinaria.....	4
Figura 2. Estrutura química da biomassa lignocelulósica, celulose, hemicelulose e lignina e as subunidades álcoois p-cumarílico (H), coniferílico (G) e sinapílico (S).....	6
Figura 3. Secção longitudinal de uma parede celular secundária. Representação tridimensional (A). Representação planar (B).	6
Figura 4. Estrutura de um fragmento de celulose.....	7
Figura 5. Derivados de glicose em uma biorrefinaria de plataforma de açúcares.....	8
Figura 6. Esquema da estrutura básica de hemicelulose. A arabinose; FeA, ácido ferúlico; G, galactose; Glc, ácido glucurônico; X, xilose.....	9
Figura 7. Derivados hemicelulose em uma Biorefinaria de Lignocelulósicos.	9
Figura 8. Esquema da estrutura química da lignina	10
Figura 9. Álcoois precursores das unidades fenilpropanóides guaiacila (G), siringila (S) e p-hidroxifenila (H).....	11
Figura 10. Mecanismo de biossíntese da lignina.....	13
Figura 11. Derivados da Lignina em uma Biorefinaria de Lignocelulósicos.....	15
Figura 12. Valorização da lignina: obtenção de produtos de interesse industrial.	16
Figura 13. Floresta de eucalipto localizada na região sudeste do Brasil.	18
Figura 14. Alterações estruturais do complexo celulose-hemicelulose-lignina determinadas pelo pré-tratamento.	19
Figura 15. Hidrólise de 4-O-metil-glucuranoxilana e celulose. (1) arabinose, (2) xilose, (3) xilooligômeros acetilados (GP=3), (4) xilooligômeros de grande massa molecular, (5) oligosacarídeos, (6) glicose, (7) celobiose, (8) celooligômeros, (9) furfural, (10) hidroxidometilfurfural, (11), ácido levulínico (12) furano (13) ácido 2-furóico.....	20
Figura 16. Mecanismo de ação do complexo de celulases frente ao polímero de celulose, hidrólise enzimática.....	23
Figura 17. Cavaco de <i>Eucalyptus urograndis</i> “in natura” (A) e moído (B).....	25
Figura 18. Foto do reator rotatório (Regmed AU/E-20) onde foi realizado o pré-tratamento hidrotérmico e deslignificação alcalina.	26
Figura 19. Hidrolisado hemicelulósico obtido no pré-tratamento hidrotérmico (A); fração sólida obtida após o processo (B).	27

Figura 20. Licor negro obtido da reação de deslignificação (A); Polpa celulósica (B).	28
Figura 21. Lignina precipitada com ácido sulfúrico.....	29
Figura 22. Biorreator de bancada instrumentado (New Brunswick Scientific, Bioflo 110) utilizado nos experimentos de cinética enzimática (A). Equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (Agilent, série 1100) (B).....	35
Figura 23. Sistema usado na acetilação da lignina de eucalipto.....	36
Figura 24. Solubilização dos componentes dos cavacos de eucalipto pós etapa de pré-tratamento e deslignificação alcalina.....	40
Figura 25. Rampa de controle da temperatura durante o pré-tratamento hidrotérmico realizado no reator modelo REGMED AU/E-20. As setas tracejadas indicam o período em que a temperatura permaneceu constante.	41
Figura 26. Fotomicrográfas dos cavacos de eucalipto “in natura” nas ampliações 1000x (A) e 180x (B), respectivamente.....	43
Figura 27. Fotomicrográfas dos cavacos de eucalipto pré-tratado nas ampliações 1000x (A) e 180x (B), respectivamente.....	43
Figura 28. Fotomicrográfas dos cavacos de eucalipto deslignificado nas ampliações 1000x (A) e 180x (B) respectivamente.....	44
Figura 29. Difrátogramas de raios-X para os cavacos de eucalipto.	45
Figura 30. Espectro de FT-IR dos cavacos de eucalipto “in natura” e os obtidos durante o processo.	46
Figura 31. Perfis de concentrações de celobiose (A). Glicose, (B), obtidos na hidrólise enzimática utilizando-se enzimas comerciais Celluclast® 1,5L e Novozym® 188 dos cavacos de eucalipto.	48
Figura 32. Conversões de celulose em glicose obtidos na hidrólise enzimática utilizando-se enzimas comerciais Celluclast® 1,5L e Novozym® 188 para os cavacos de eucalipto.....	50
Figura 33. Fotomicrográfas da lignina “in natura” (A, B) e lignina acetilada (C, D) nas ampliações 400x e 1000x, respectivamente.	52
Figura 34. Espectroscopia de FT-IR das ligninas “in natura” e acetilada.	53
Figura 35. Espectro de UV/Vis da lignina de <i>Eucalyptus urograndis</i> “in natura”.....	58
Figura 36. Curva analítica absorvância x concentração de lignina de <i>Eucalyptus urograndis</i> “in natura”.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fatores de conversão dos componentes precursores de Celulose (C) e Hemicelulose (H).....	32
Tabela 2. Composição química dos cavacos de eucalipto “in natura” pré-tratado e deslignificado em base seca, juntamente com o balanço de material.....	39
Tabela 3. Parâmetros de cristalinidade para os cavacos de eucalipto.....	45
Tabela 4. Atribuições das bandas de absorção na região do infravermelho para biomassas lignocelulósicas.....	47
Tabela 5. Atribuições das bandas de absorção na região do infravermelho de grupos funcionais presentes em ligninas.....	54
Tabela 6. Atribuições dos sinais no espectro de RMN de ^{13}C	55
Tabela 7. Atribuições dos sinais no espectro de RMN de ^1H da lignina acetilada de <i>Eucalyptus urograndis</i>	56
Tabela 8. Dados da análise elementar de lignina da madeira de <i>Eucalyptus urograndis</i>	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CDCl₃	Clorofórmio deuterado
CENAPESQ	Centro de apoio a pesquisa
CETENE	Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CTec2	Complexo enzimático comercial
DANTI	Departamento de Antibióticos
DEMEC	Departamento de Engenharia Mecânica
DQF	Departamento de Química Fundamental
DRX	Difratometria de raios-X
EDS	Espectroscopia por dispersão de energia de Raios X
FPU	Unidade de papel de filtro “ <i>Filter paper unit</i> ”
FT-IR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
HTec2	Complexo enzimático comercial
LMNANO	Laboratório Multiusuário de Nanotecnologia
LPB	Laboratório de Processos Biotecnológicos
LSO	Laboratório de Síntese Orgânica
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
RMN de ¹³C	Ressonância magnética nuclear de carbono
RMN de ¹H	Ressonância magnética nuclear de prótons
rpm	Rotações por minuto
UI	Unidade internacional
UV/Vis	Ultravioleta visível

1. INTRODUÇÃO

A economia mundial é altamente dependente de fontes de energias não renováveis, as quais estão sendo utilizadas para a produção de eletricidade, combustível e outros bens. A utilização destas fontes, acúmulo de CO₂ e esgotamento de combustíveis fósseis (ZHANG, 2008). Devido a esse fato, tem-se um crescente interesse no desenvolvimento de energias e produtos obtidos por fontes renováveis. Principalmente aqueles oriundos de biomassa vegetal, pois esta apresenta baixo custo e esta facilmente disponível em escala global (CGEE, 2010).

No cenário mundial, o Brasil tem se destacado na utilização de biomassas lignocelulósicas por apresentar extensa área florestal, além de possuir uma grande diversidade de espécies nativas (GOMIDE; FANTUZZI; REGAZZI, 2010). Atualmente o país é um dos maiores produtores de celulose proveniente das florestas de eucalipto (BRACELPA, 2015).

As espécies do gênero *Eucalyptus* pertencem à família Myrtaceae e são de origem Australiana. O eucalipto brasileiro tem produtividade cerca de 10 vezes maior, quando comparado aos provenientes de alguns países líderes de mercado, isso é devido ao solo e as condições edafoclimáticas (CHAVES, 2012). Dentre as espécies mais plantadas, pode-se citar o *Eucalyptus urograndis*, um híbrido desenvolvido no Brasil, através do cruzamento do *E. grandis* x *E. urophylla*, que apresenta como características maior crescimento e rendimento volumétrico, sendo uma das principais fontes de matéria-prima para produção de celulose (BARROSO et al., 2000; PINTO, et al., 2014).

As indústrias de papel e celulose representam uma importante base para a economia mundial. O processo de obtenção da celulose, utilizado pela indústria papelreira é o Kraft, o qual apresenta, como produtos, a polpa celulósica e o licor negro (BERGERON; CARRIER; RAMASWAMY, 2012).

Com objetivo de diminuir o impacto ambiental e custos operacionais, as indústrias queimam a lignina presente no licor (SOUTO; CALADO; PEREIRA, 2015). No entanto, esta poderia ser isolada e posteriormente inserida numa plataforma de biorrefinaria, com a finalidade de se obter produtos de interesse industrial, o que levaria a substituição gradativa da plataforma petroquímica (KAMM; GRUBER; KAMM, 2006). A lignina obtida no licor é uma macromolécula amorfa, constituída de precursores fenilpropanóides

e representa um dos polímeros mais abundantes na natureza, estando presente na parede celular das plantas (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

Com o intuito de utilizar a lignina como molécula precursora de produtos, a Suzano uma das empresas líder em celulose e papel no Brasil, investiu R\$ 70 milhões para a instalação da primeira planta-piloto de extração de lignina da América do Sul, com capacidade de produção de 20 mil toneladas por ano, que será implantada em Limeira, interior de São Paulo. A expectativa é que a planta entre em operação no primeiro semestre de 2018 (SUZANO, 2015).

A tecnologia utilizada para separar a lignina do licor será baseada na precipitação por ácidos orgânicos seguido de lavagens e filtração (PURE LIGNIN, 2015). O principal objetivo da planta em Limeira é utilizar a lignina de modo que a mesma possa substituir produtos derivados do petróleo.

Uma das possíveis aplicações de produtos derivados de lignina é a fabricação dos compostos lignosulfonatos, os quais podem ser utilizados como dispersantes para concreto, ração animal ou mesmo na composição de produtos químicos e fármacos. Outra possibilidade é sua utilização para a fabricação de bioplásticos (SUZANO, 2015).

Sendo assim, este trabalho teve como objetivo a separação das principais macromoléculas presentes nos cavacos da madeira de *Eucalyptus urograndis* afim de inseri-las em uma plataforma de biorrefinaria, com a finalidade de utiliza-las como precursoras para obtenção de produtos de interesse industrial, agregando valores as indústrias de papel e celulose.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo a separação dos principais componentes celulose, hemicelulose e lignina dos cavacos da madeira de *Eucalyptus urograndis*. Afim de inseri-los em uma plataforma de biorrefinaria, agregando valores as indústrias de papel e celulose.

2.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar os cavacos de eucalipto “in natura”, submetidos a pré-tratamento hidrotérmico e deslignificação alcalina, quanto à sua composição química, celulose, hemicelulose e lignina e solubilização dessas macromoléculas durante cada etapa do processo.
- Utilizar técnicas de microscopia eletrônica de varredura, difração de raios x e espectroscopia no infravermelho, nos cavacos “in natura” e após pré-tratamento e deslignificação alcalina, afim de avaliar mudanças morfológicas na superfície das biomassas.
- Avaliar a conversão celulósica das biomassas, “in natura”, pré-tratada e deslignificada, após hidrólise enzimática, afim de verificar a eficiência de cada processo.
- Identificar e quantificar os compostos presentes no hidrolisado hemicelulósico obtido na etapa de pré-tratamento hidrotérmico por cromatografia líquida de alta eficiência.
- Obtenção e caracterização química da lignina de *Eucalyptus urograndis*, pelas técnicas de espectroscopia de infravermelho por transformada de fourier (FT-IR), ressonância magnética nuclear (RMN de ^1H e ^{13}C) e espectroeletrônica na região do ultravioleta UV/VIS.

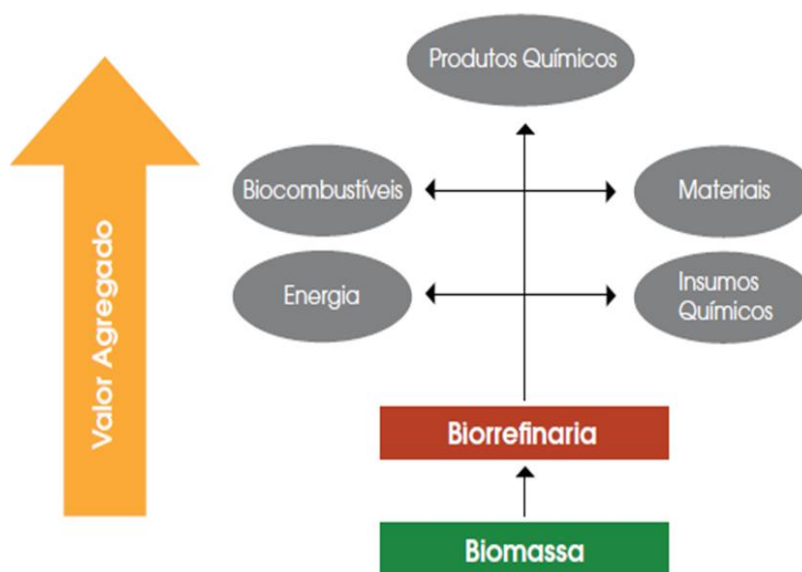
3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. BIORREFINARIA

A questão ambiental é sem dúvida um fator muito importante no interesse de se utilizar matérias-primas renováveis e processos químicos que sejam mais limpos e verdes (BASTOS, 2007). O investimento mundial em tecnologias limpas tem crescido e alcançou em média US\$ 211 bilhões em 2010 (UNEP, 2011). Os países líderes em inovação tecnológica verde e limpa são: Japão, Alemanha e Estados Unidos que juntos correspondem a 60% das inovações, embora países com economias emergentes como China, Brasil e Índia respondem por 80% de todas as patentes verdes concedidas a países em desenvolvimento no período de 2006-2010 (DUTZ; SHARMA, 2012).

Os bioprocessos tem sido ferramentas fundamentais na utilização e conversão dessas fontes não fósseis, em produtos de interesse industrial. Direcionando assim, a indústria atual para uma tendência mais verde proposta pelas biorrefinarias (CGEE, 2010). O termo biorrefinaria foi citado pela primeira vez na legislação americana, no que se diz respeito a processos que convertem biomassa renovável de maneira integral e/ou diversificada (Figura 1), para a obtenção de combustíveis, produtos químicos e energia (BASTOS, 2007).

Figura 1. Esquema simplificado de escala de valoração econômica dos possíveis produtos de uma biorrefinaria.



Fonte: VAZ, (2012).

Sendo esses produtos obtidos por rota química, bioquímica ou biotecnológica e que

produzam uma quantidade mínima de resíduos e emissão de gases poluentes (RAGAUSKAS et al., 2006). De maneira geral o conceito de biorrefinaria faz sentido quando se utiliza biomassas, abundantes e baratas. Por exemplo, pode-se citar, os resíduos agrícolas e agroindustriais que ao contrário das fontes fósseis não sofrem oscilações no mercado econômico (ONDREY, 2006; RAGAUSKAS et al, 2006).

A biorrefinaria pode produzir uma quantidade relativamente maior de produtos, quando comparada a refinaria de petróleo. Em contrapartida um número maior de processos unitários se faz necessário. Além do que muitos destes processos, ainda estão em estágio de desenvolvimento ou otimização (RODRIGUES, 2011).

O Brasil se encontra em uma posição privilegiada em relação ao aproveitamento integral das biomassas, isso porque o país apresenta: grandes extensões de culturas agrícolas, vasta biodiversidade, água em abundância, intensa radiação solar e diversidade climática (CGEE, 2010). Por ano, no país, são produzidos em média 350 milhões de toneladas de resíduos lignocelulósicos (PEREIRA; COUTO; ANA, 2008).

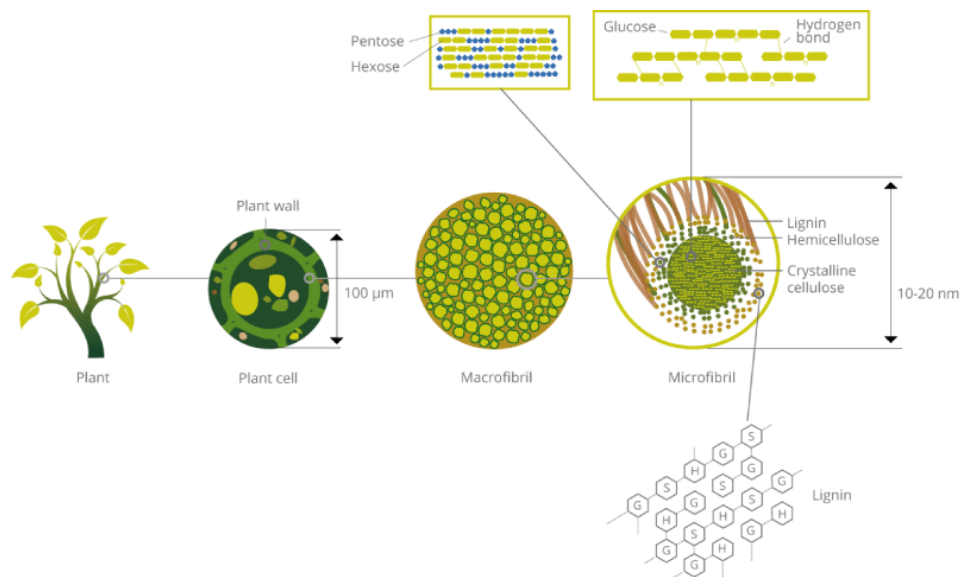
Devido a estas características citadas e a grande variedade de resíduos lignocelulósicos produzidos anualmente, tem se despertado o interesse econômico pelo reaproveitamento dessas matérias-primas.

3.2. BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA COMO MATÉRIA-PRIMA DAS BIORREFINARIAS

As biomassas lignocelulósicas constituem a maior fonte de obtenção de carboidratos e compostos carbônicos do mundo (SANTOS et al., 2012). A grande dificuldade de se obter produtos provenientes de biomassas, está relacionada com suas características químicas e morfológicas. Em sua constituição apresentam fibras de celulose envolvidas em uma matriz amorfa de hemiceluloses e lignina, como representada na Figura 2.

Esse complexo químico torna a biomassa mais resistente e a protege contra o ataque de micro-organismos, insetos e substâncias químicas (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

Figura 2. Estrutura química da biomassa lignocelulósica, celulose, hemicelulose e lignina e as subunidades álcoois p-cumarílico (H), coniferílico (G) e sinapílico (S).

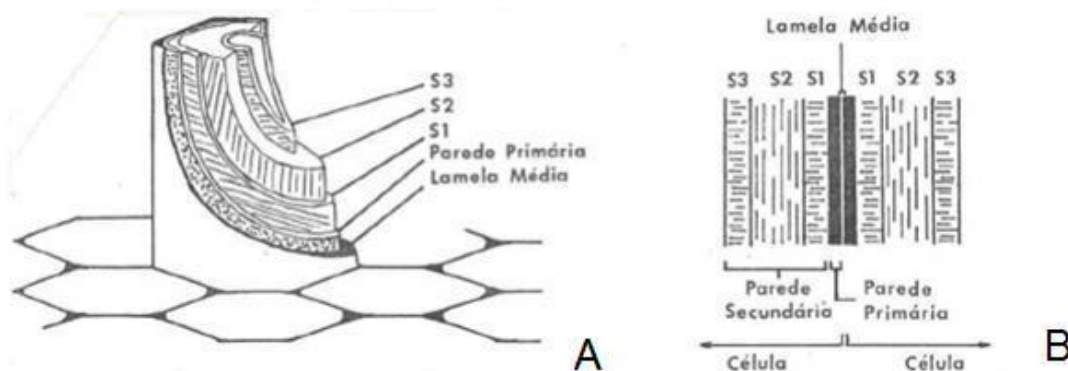


Fonte: STREFFER, (2014).

3.2.1. Parede Celular Vegetal

A parede celular vegetal é formada por polissacarídeos, compostos fenólicos, sais minerais e proteínas, os quais se distribuem ao longo de suas camadas primária e secundária. A parede primária apresenta cerca de 90% de carboidratos, enquanto a secundária compreende a lamela média e a parede celular primária, além dessas estruturas a parede secundária também é dividida em três camadas: S1 (exterior), S2 (camada intermediária) e S3 (interior) (Figura 3). Estas camadas diferem em espessura, orientação de microfibrilas e composição (FENGEL; WAGENER, 1984).

Figura 3. Secção longitudinal de uma parede celular secundária. Representação tridimensional (A). Representação planar (B).



Fonte: BRETT; WALDRON, (1990); SELVENDRAN, (1983).

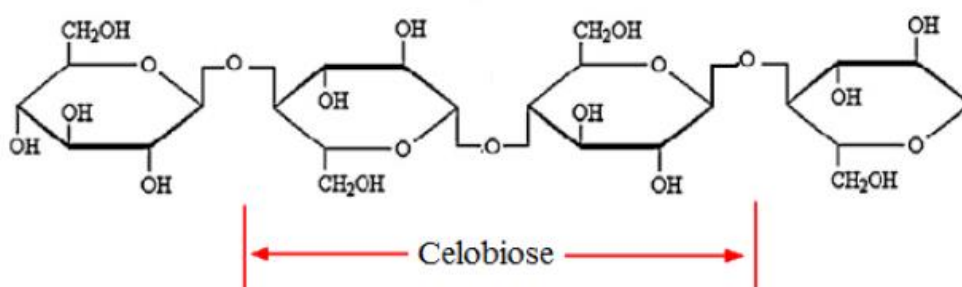
3.2.2. Composição química da biomassa lignocelulósica

3.2.2.1. Celulose

A celulose é uma das principais macromoléculas presentes nas biomassas lignocelulósicas, podendo ser encontrada em diversas fontes: espécies de vegetais e organismos primitivos, tais como algas marinhas e bactérias (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). É um homopolímero constituído por monômeros de glicose unidos por ligações β -1,4 glicosídicas e de conformação linear devido as ligações equatoriais entre monômeros.

As cadeias de celulose (Figura 4) podem fazer ligações inter e intramoleculares, onde essas interações são responsáveis pela estabilidade das regiões cristalinas o que torna a celulose altamente resistente à hidrólise química ou enzimática (WOOD; SADDLER, 1998; CONVERSE; WARE, 1994).

Figura 4. Estrutura de um fragmento de celulose.



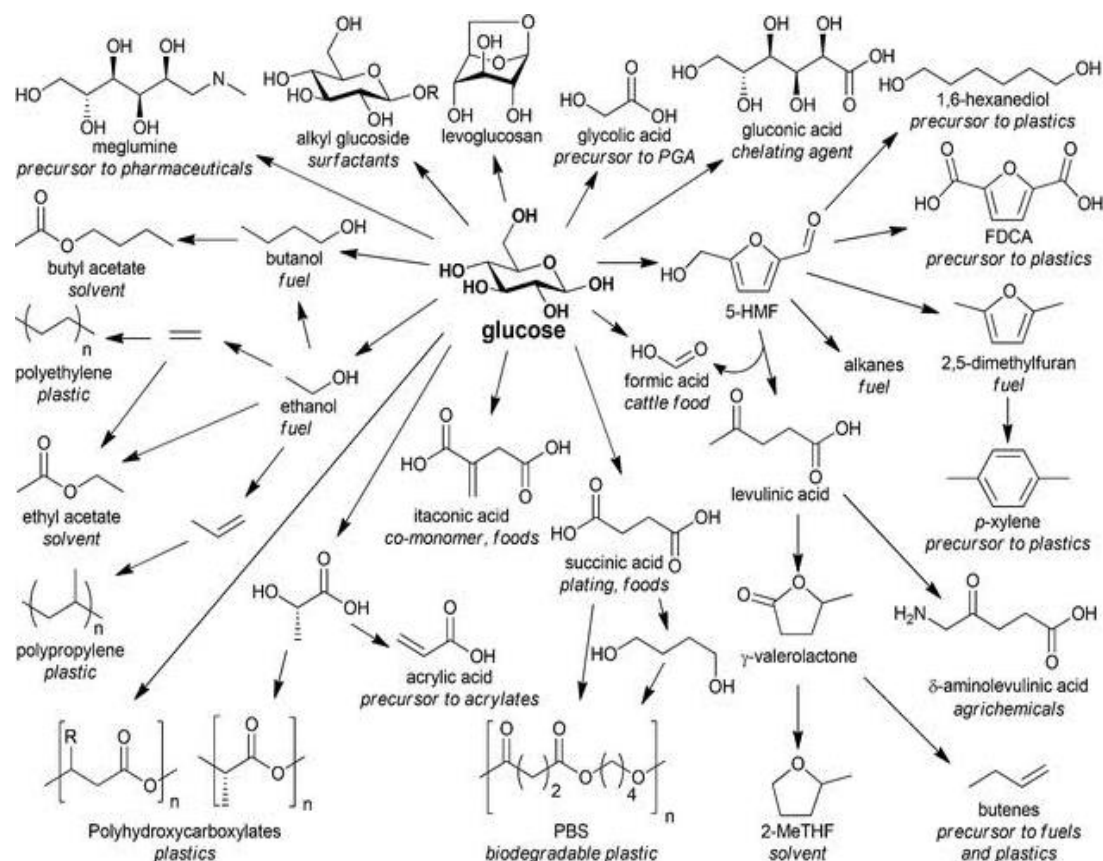
Fonte: Adaptado de SANDERS et al. (2012).

Esse polissacarídeo apresenta diversas aplicações quando inserido em uma plataforma de biorrefinaria, isso devido a sua composição química e por ser de fácil obtenção em larga escala (SCHUCHARDT; RIBEIRO; GONÇALVES, 2001). Sendo assim a celulose pode ser utilizada como matéria-prima para produção de diversos tipos de papel, enquanto que na indústria química pode ser utilizada como emulsificante, antiaglutinante, dispersante e espessante. Quando modificada a celulose pode produzir produtos com alto valor agregado, tais como: triacetato de celulose, nitrocelulose, carboximetil celulose e rayon (JUNIOR; MIRANDA; JOSE, 2014).

Os açúcares obtidos a partir da hidrólise da celulose podem também gerar diversos produtos dentre estes etanol, 2,5- dimetilfurano, acetato de etila, butanol, acetato de

butila, ácido acrílico (RODRIGUES, 2011) como mostra a Figura 5.

Figura 5. Derivados de glicose em uma biorrefinaria de plataforma de açúcares.

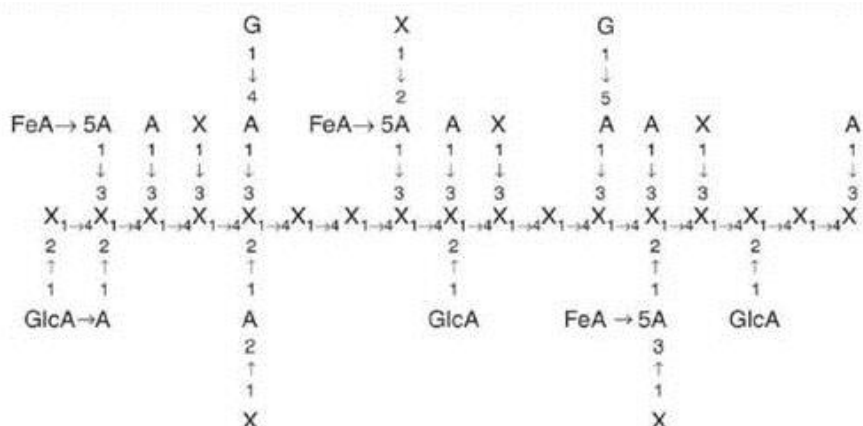


Fonte: KOBAYASHI; FUKUOSA, (2013).

3.2.2.2. Hemicelulose

A hemicelulose (Figura 6) é composta por polissacarídeos amorfos de baixa massa molecular. É uma estrutura heteropolissacarídea ramificada formada principalmente por D-xilose com pequenas quantidades de L-arabinose, D-glicose, D-manose, D-galactose, ácido glucurônico e ácido manurônico. Na região central da molécula se encontra xilose seguida de várias ramificações de ramnose, arabinose e hexoses (glicose, manose e galactose), ácidos urônicos (ácidos α -D-glucurônico, α -D-4-O-metilgalacturônico e α -D-galacturônico) e radicais acetila (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). Os componentes mais importantes devido à sua abundância são as xilanas e as glucomananas (TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

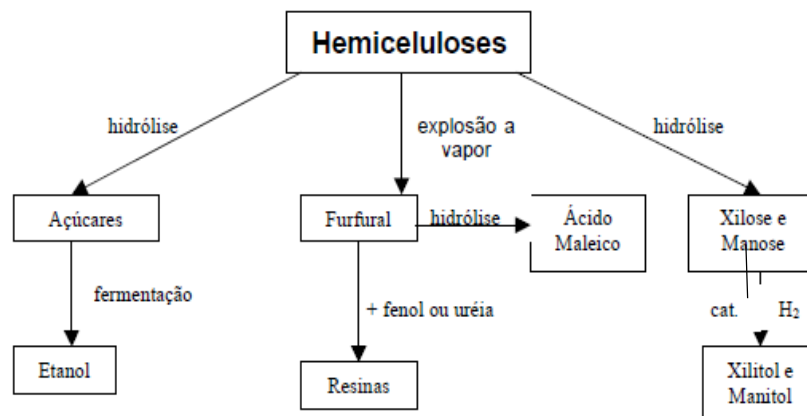
Figura 6. Esquema da estrutura básica de hemicelulose. A arabinose; FeA, ácido ferúlico; G, galactose; Glc, ácido glucurônico; X, xilose.



Fonte: GRAY; ZHAO; EMPTAGE, (2006).

As cadeias laterais encontradas nas hemiceluloses apresentam grande potencial reacional, isso devido à sua conformação espacial menos impedida, quando comparada à celulose. Essa característica permite que a hemicelulose seja facilmente hidrolisada a açúcares do grupo das pentoses, os quais podem gerar uma infinidade de produtos de interesse industrial (GRAY; ZHAO; EMPTAGE, 2006). Dentre estes produtos pode-se citar o etanol, obtido da fermentação da xilose. A hemicelulose quando submetida a pré-tratamento sob pressão e altas temperaturas pode-se obter furfural, o qual pode formar resinas com fenol e ureia ou ainda ser hidrolisado a ácido maleico. Essa macromolécula também, pode apresentar grande importância para a indústria alimentícia, fornecendo produtos como xilitol e manitol e de alguns ácidos orgânicos (SCHUCHARDT; RIBEIRO; GONÇALVES, 2001) como mostra a Figura 7.

Figura 7. Derivados hemicelulose em uma Biorefinaria de Lignocelulósicos.



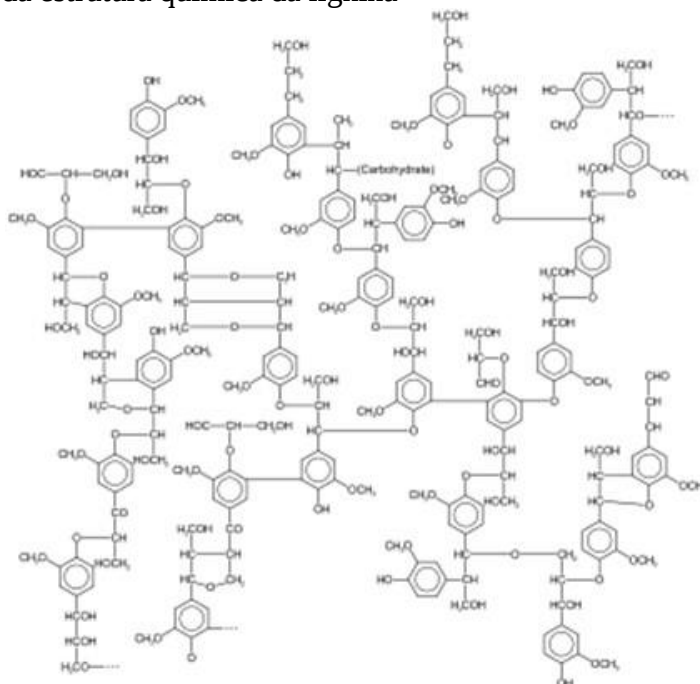
Fonte: Adaptado de SCHUCHARDT; RIBEIRO; GONÇALVES, (2001).

3.2.2.3. Lignina

A palavra lignina tem origem latina *lignum*, que significa madeira. Sua descoberta se deu por volta de 1838 por Anselme Payen, estudando madeiras tratadas com ácido nítrico concentrado. Ele observou que o produto da reação era celulose e um outro polímero. Porém, só em 1865 Schultz denominou esse outro polímero como lignina (SJOSTROM, 1981). Depois da celulose, a lignina é a segunda fonte mais abundante de matéria-prima renovável e a maior fonte de polímeros aromáticos de natureza fenólica (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

A lignina (Figura 8) é uma macromolécula amorfa e ramificada. Agindo como “cola” a lignina preenche os espaços entre e em torno da celulose e hemicelulose, por isso tem o papel de suporte na estrutura da biomassa (MORAIS; NASCIMENTO; MELO, 2005). Além disso, confere ao material lignocelulósico rigidez, força e flexibilidade, atuando como barreira física, protegendo a madeira contra degradação enzimática, microbiana e ao ataque de insetos e patógenos (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

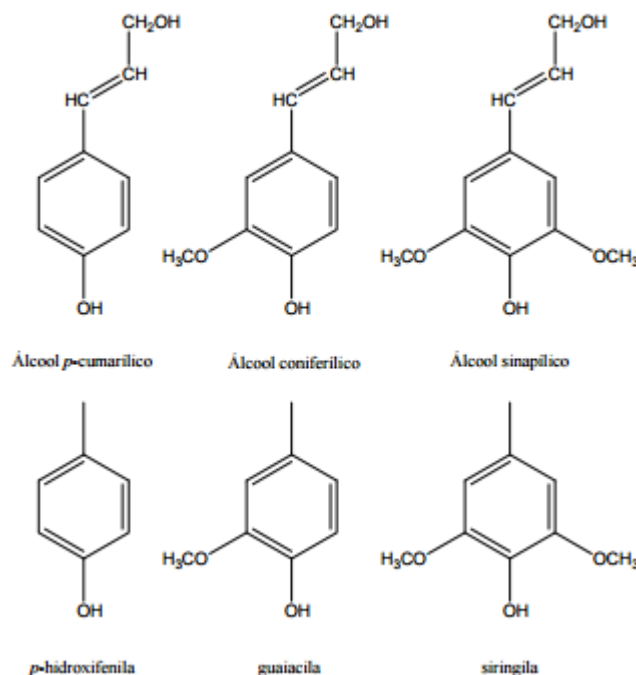
Figura 8. Esquema da estrutura química da lignina



Fonte: Adaptado de CHRISTOPHER; YAO; JI, (2014).

Em geral, a lignina é classificada de acordo com a quantidade relativa dos monômeros guaiacila (G), siringila (S) e *p*-hidroxifenila (H), sendo estes derivados dos álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico como mostra a Figura 9.

Figura 9. Álcoois precursores das unidades fenilpropanóides guaiacila (G), siringila (S) e p-hidroxifenila (H)



Fonte: Adaptado de CHRISTOPHER; YAO; JI, (2014).

A biogênese das ligninas tem início nas regiões da lamela mediana e parede celular S1, se espalhando por toda a parede secundária S2 sempre em direção à luz. A lignificação é uma das últimas etapas da diferenciação de células do xilema, onde a lignina é depositada sobre carboidratos na matriz da parede celular (DONALDSON, 2001).

A lignina é formada via fenilpropanóides (Figura 10), tendo fenilalanina como substrato inicial. Atualmente são conhecidas dez enzimas necessárias para a síntese de monolignóis sendo elas: fenilalanina amonialiase (PAL), cinamato-4-hidroxilase (C4H), hidroxicinamoil-CoA ligase (4CL), hidroxicinamoil-CoA: shiquimato/quinato hidroxicinamoiltransferase (HCT), p-cumarato 3-hidroxilase (C3H), cafeoil-CoA ometiltransferase (CCoAOMT), hidroxicinamoil-CoA redutase (CCR), ferulato 5-hidroxilase (F5H), ácido cafeico o-metiltransferase (COMT), cinamil álcool desidrogenase (CAD). Os monolignóis produzidos são transportados até a parede celular e oxidados pelas enzimas peroxidases (PER) e lacases (LAC) dando início a polimerização (LIGNIN SYSTEMS, 2015).

A polimerização é iniciada pela remoção enzimática de um próton e um elétron formando radicais fenóxi (Figura 10). O acoplamento posterior ocorre sem controle

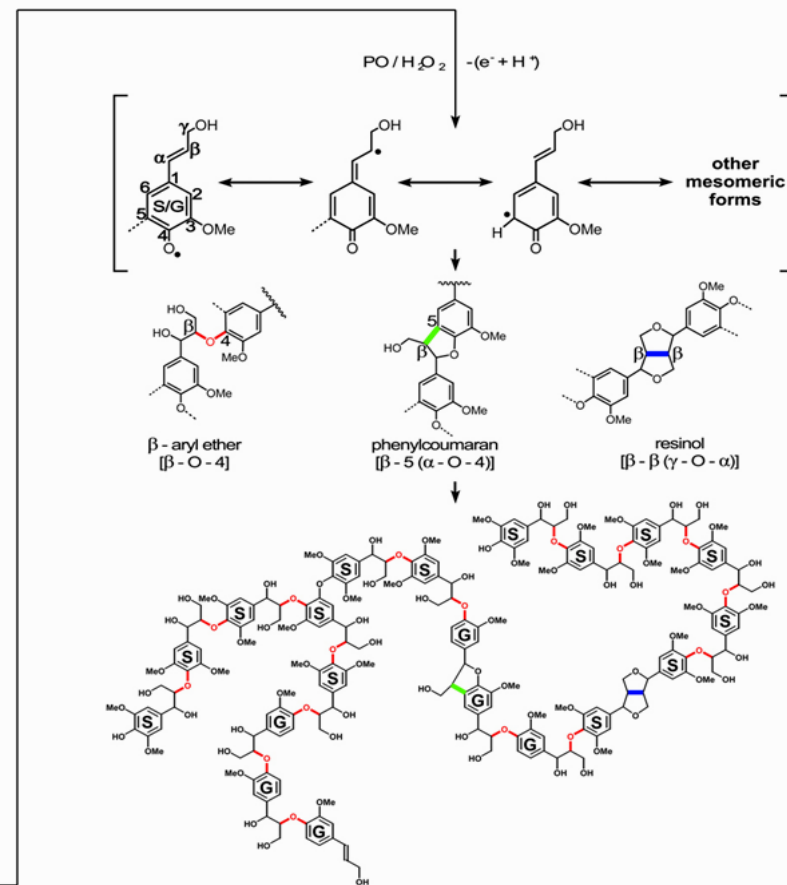
enzimático, formando o primeiro dímero que se acopla a outros monômeros, gerando trímeros e tetrâmeros e cadeias maiores (CHRISTOPHER; YAO; JI, 2014). O acoplamento pode acontecer em diversas regiões na molécula, formando diferentes tipos de ligações, gerando estruturas aleatórias e bastante reticuladas.

Baseado nos tipos de ligações e grupos funcionais presentes na lignina, Freudenberg, em 1968, propôs o primeiro modelo da estrutura química para lignina de madeira. Devido à complexidade química que a molécula apresenta, Saliba et al. (2001) afirmam que a estrutura química exata de qualquer lignina não pode ser completamente resolvida. Segundo Donaldson (2001), a lignina pode apresentar várias estruturas químicas, e isso é devido a variação de espécies lignocelulósicas bem como regiões de cultivo.

Na literatura, alguns autores propõem uma representação esquemática. Nesta, as ligninas são ligadas entre si através dos anéis aromáticos e das cadeias alifáticas. Essas ligações garantem a formação de estruturas tridimensionais complexas (CHRISTOPHER, YAO e JI, 2014). Além disso, a molécula apresenta uma variedade de grupos funcionais, como, por exemplo grupos metoxila, hidroxila, carbonila, carboxila, éter e éster (ADAGANTI et al., 2014).

O avanço das técnicas de extração e purificação tem favorecido novas conclusões em relação a estrutura química da lignina. Estudos têm demonstrado que a lignina em sua forma nativa possui estrutura mais linear do que se acreditava e com repetições mais frequentes nas unidades β -O-4' (SOUTO; CALADO; PEREIRA, 2015).

Fonte : LIGNIN SYSTEMS, (2015).



3.2.2.4. Valorização da lignina: Obtenção de bioprodutos

As indústrias de papel e celulose representam uma importante base para a economia mundial. As cinco empresas brasileiras líderes de mercado no setor são: Fibria, Suzano, Klabin, Cenibra e International Paper do Brasil. A produção nacional de celulose, nos dois primeiros meses de 2014, cresceu 4,5% e a de papel 1,7%, em comparação com o mesmo período de 2013. Foram produzidos, em média, 1,7 milhão de toneladas de papel e 2,5 milhões de toneladas de celulose. As exportações aumentaram 17,9% para celulose e 7,7% para o papel. Com isso, a balança comercial do setor totalizou US\$ 1,2 bilhão, com aumento de 15,9% sobre o valor do primeiro bimestre de 2013 (BRACELPA, 2015).

O processo de obtenção da celulose utilizado pela indústria papelreira é o Kraft (BERGERON; CARRIER; RAMASWAMY, 2012). Neste, processo os cavacos de madeira são aquecidos a 170 °C em reator pressurizado e digeridos em solução de hidróxido de sódio e sulfeto de sódio. Ao término da reação, é obtido como produtos a polpa celulósica e o licor negro, que é uma mistura de lignina, celulose, hemicelulose e compostos inorgânicos (VILA et al., 2011). Uma quantidade consideravelmente grande de licor tem sido produzida no Brasil. No ano de 2010, foram produzidos 21.247.000 toneladas, sendo que 4.796.000 toneladas foram aplicadas em geração de energia elétrica (IBPBB, 2015).

Com objetivo de diminuir o impacto ambiental e custos operacionais, as indústrias queimam a lignina presente no licor (SOUTO; CALADO; PEREIRA, 2015). No entanto, esta poderia ser isolada e, posteriormente, inserida numa plataforma de biorrefinaria. A finalidade de isolar a molécula seria a obtenção de bioprodutos, o que levaria à substituição gradativa da plataforma petroquímica (KAMM; GRUBER; KAMM, 2006).

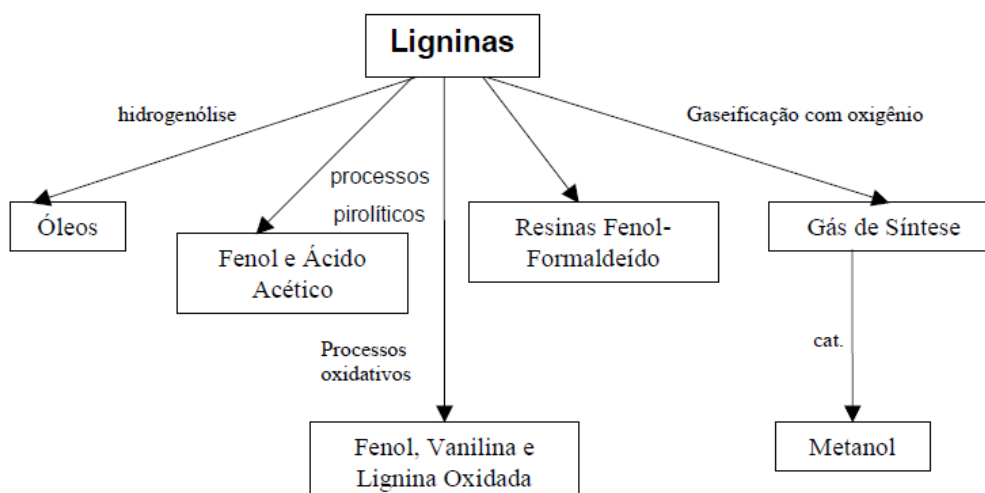
No mercado mundial, a utilização da lignina como combustível apresenta equivalência monetária entorno de 0,18 US\$/kg, enquanto o seu uso para o um aproveitamento em conversão química pode chegar em média a 1,08 US\$/kg, representando, assim, um mercado bastante promissor na utilização de produtos derivados das indústrias de papel e celulose (VISHTAL; KRASLAWSKI, 2011).

Com o intuito de utilizar a lignina como molécula precursora de produtos para fins industriais, a Suzano, uma das empresas líderes de mercado em celulose e papel no Brasil, investiu R\$ 70 milhões para a instalação da primeira planta-piloto de extração de lignina da América do Sul, cuja capacidade de produção será de 20 mil toneladas por ano. A planta será implantada na Unidade Limeira, interior de São Paulo. A expectativa é que o

piloto entre em operação no primeiro semestre de 2018 (SUZANO, 2015). A tecnologia utilizada para separar a lignina do licor será baseada na sua precipitação por ácidos minerais seguido de lavagens e filtração (PURE LIGNIN, 2015). O principal objetivo da planta em Limeira é utilizar a lignina de modo que a mesma possa substituir produtos derivados do petróleo.

Após isolada, a lignina apresenta inúmeras aplicações em diversos setores industriais como, por exemplo: na indústria de cimento e concreto, os sais lignosulfonato fornecem plasticidade e fluidez ao concreto, atuando como aditivos (SOUTO; CALADO; PEREIRA, 2015), na produção de poliolefinas, como dispersantes em pastilhas de ração animal micronutrientes agrícolas (SANTOS, 2011), em lamas de produção de petróleo, apresentando atividade antimicrobiana, no tratamento de água, atuando como adsorvente natural, adsorvendo metais tóxicos; e na indústria de pesticidas (RAGAUSKAS et al., 2014). A Figura 11 mostra os produtos que podem ser obtidos pela lignina.

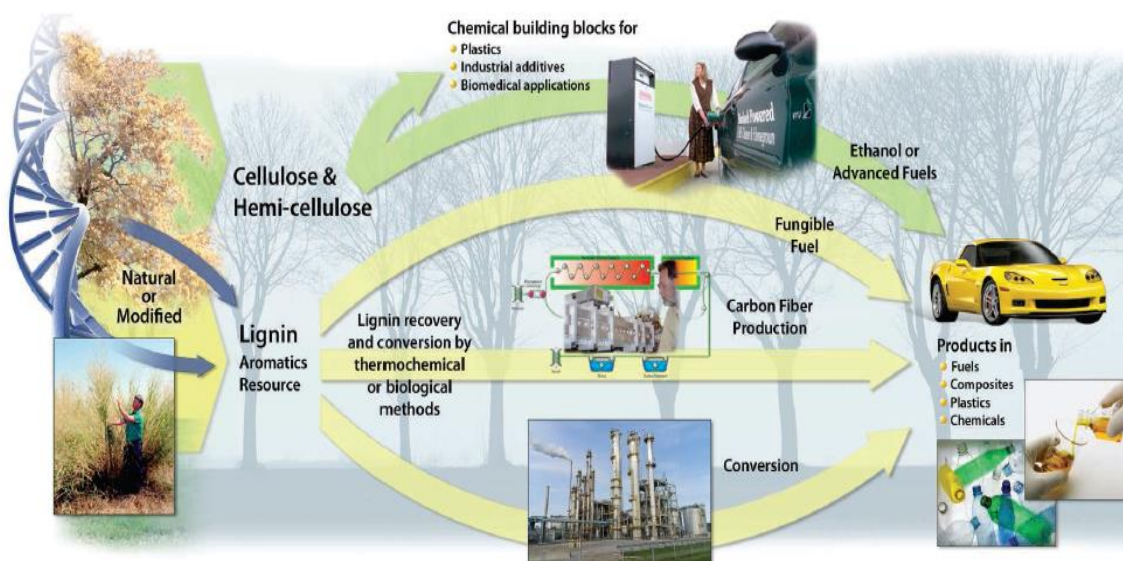
Figura 11. Derivados da lignina em uma biorefinaria de lignocelulósicos.



Fonte: SCHUCHARDT; RIBEIRO; GONÇALVES, (2001).

A grande dificuldade na obtenção de derivados de lignina está relacionada com a sua estrutura química complexa de difícil rompimento a custos elevados de purificação, em especial para as ligninas kraft e lignosulfonada. Em contrapartida, a infinidade de produtos obtidos e aplicações da lignina (FIGURA 12) é superior quando comparado a celulose e hemicelulose (RAGAUSKAS et al., 2014).

Figura 12. Valorização da lignina: obtenção de produtos de interesse industrial.



Fonte: RAGAUSKAS et al. (2014).

Além das macromoléculas, a biomassa lignocelulósica também pode apresentar em sua composição outras moléculas tais como: ácidos graxos, alcaloides, açúcares simples, ceras, proteínas, fenólicos, mucilagens, gomas, resinas, terpenos, amido, glicosídeos, saponinas, óleos essenciais e pequenas quantidades de compostos inorgânicos, resultante do metabolismo (FENGEL; WEGENER, 1984; YU, LOU; WU, 2008).

3.3. MADEIRA DE EUCALIPTO

O gênero *Eucalyptus*, pertencente à família Myrtaceae, é composto por mais de 700 espécies e apresenta como características: rápido crescimento, facilidade a programas de manejo e melhoramento, fácil adaptação em diversas condições e alta produção de sementes o que facilita a sua propagação (SHARMA, 2006). É um dos gêneros mais plantados no mundo, em média 17,8 milhões de hectares. Entre os países com maiores áreas reflorestadas destacam-se a Índia com 8 milhões de hectares, seguido Brasil com cerca de 3 milhões hectares plantados (ALFENAS et al., 2004). Proveniente da Austrália, o eucalipto foi introduzido no Brasil por volta de 1868, e em 1904, foi utilizado com objetivo de suprir a demanda de madeira, sendo usado como lenha e dormentes nas estradas de ferro da região Sudeste. Em meados dos anos 50, a madeira de eucalipto passou a ser utilizada como matéria-prima pela indústria papeleira e de celulose (SILVEIRA, 2004).

No cenário mundial, o Brasil tem se destacado na utilização de biomassas lignocelulósicas por apresentar extensa área florestal, além de possuir uma grande diversidade de espécies nativas (GOMIDE; FANTUZZI; REGAZZI, 2010). Considerado um importante produto comercial, a madeira está disponível no território brasileiro de maneira sustentável e em grandes quantidades, fornecendo produtos bastante valorizados no mercado. Atualmente, o país é um dos maiores produtores mundiais de celulose proveniente das florestas de eucalipto (BRACELPA, 2015).

A indústria brasileira de base florestal (móveis, madeira, papel e celulose) busca no mercado externo oportunidade de crescimento e em 2010, atingiu em média US\$ 11 bilhões de vendas. Já no mercado nacional, movimenta 3,5% do PIB, reunindo mais de 30 mil empresas. Nesse panorama, o estado de Minas Gerais é um dos maiores produtores e consumidores da madeira, possuindo o maior parque siderúrgico e carvão vegetal do mundo, contribuindo de forma direta para a participação do setor florestal com 7% do PIB nacional (AMS, 2015). Em 2007, a exportação de produtos provenientes de florestas somou US\$ 6,1 bilhões, dos quais 70% foram provenientes de florestas de eucalipto (BRACELPA, 2015).

Atualmente a Fibria, indústria brasileira, é a líder mundial na produção de celulose de eucalipto, possuindo capacidade produtiva de 5,3 milhões de toneladas anuais, com operação integralmente baseada em plantios florestais renováveis. A empresa trabalha com uma base florestal total de 969 mil hectares, dos quais 343 mil são destinados à conservação ambiental (FIBRIA, 2015).

O aumento na produção do eucalipto para suprir a demanda da indústria da madeira está relacionado em grande parte ao melhoramento genético das árvores que, por sua vez, está associado aos avanços na área de manejo florestal (MARTINS et al., 2005). Para que se torne possível a utilização desses métodos de melhoramento, é de fundamental importância verificar a existência de parâmetros genéticos tais como: coeficiente de herdabilidade e de variação genética, úteis para a orientação do melhorista na adoção de uma estratégia de melhor eficiência na seleção (VENCOSKY, 1969).

Dentre as espécies mais plantadas, pode-se citar *Eucalyptus urograndis* (Figura 13), um híbrido desenvolvido no Brasil, através do cruzamento do *E. grandis* x *E. urophylla*, apresentando como características maior crescimento e rendimento volumétrico. Atualmente mais de 600.000 ha da espécie são cultivados, constituindo a base da silvicultura clonal, além de ser uma das principais fontes de matéria-prima para produção de celulose (BARROSO et al., 2000; PINTO, et al., 2014).

Figura 13. Floresta de eucalipto localizada na região sudeste do Brasil.



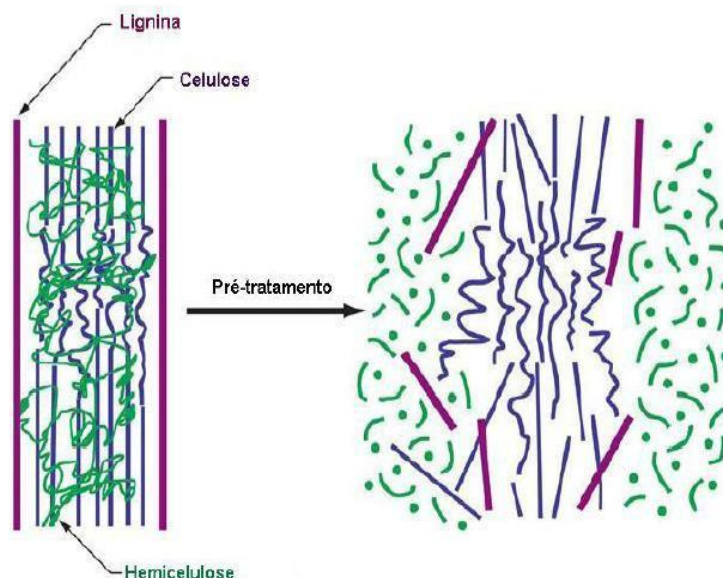
Fonte: PORTAL, (2015).

O objetivo desse cruzamento é a obtenção de árvores que possuam bom crescimento, uma característica marcante da espécie *E. grandis* e madeira com maior densidade, o que fornece melhorias no rendimento e propriedades físicas da celulose e resistência ao déficit hídrico, características atribuídas à espécie *E. uropllylla* (AGROTECA, 2015). A espécie apresenta fibras com comprimento em média de 0,90 mm e densidade básica de $0,510 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$. Essa composição favorece a impregnação e remoção da lignina dos cavacos nos processos de cozimento (BHAT; BHAT; DHAMODARAN, 1990; ZOBEL; BUJTENEN, 1989). Diante destas características, a espécie conquistou posição importante na indústria de celulose e papel assim como na produção de carvão vegetal (COSTA, 1996).

3.4. PRÉ-TRATAMENTO DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

A hidrólise de materiais lignocelulósicos “in natura” é lenta, e isso é devido à interassociação entre as macromoléculas de lignina, hemicelulose com a celulose, as quais formam uma barreira contra o ataque biológico. Em consequência disto, um pré-tratamento se faz necessário para que ocorra mudança na sua estrutura química (desestruturação) (Figura 14) (MOSIER et al., 2005).

Figura 14. Alterações estruturais do complexo celulose-hemicelulose-lignina determinadas pelo pré-tratamento.



Fonte: Adaptado de MOSIER et al. (2005).

O efeito da desestruturação química da biomassa pode ser analisado através da conversão da celulose em glicose na etapa de hidrólise enzimática e da quantificação da celulose e hemicelulose liberada durante o processo. Essa quantificação é influenciada por diversos fatores tais como: cristalinidade da celulose, grau de polimerização, umidade, área superficial disponível e quantidade de lignina (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

De acordo com Taherzadeh e Karimi (2008) e Alvira et al. (2010), o pré-tratamento precisa ser eficiente e econômico, para isso deve atender a alguns requisitos, dentre os quais pode-se citar:

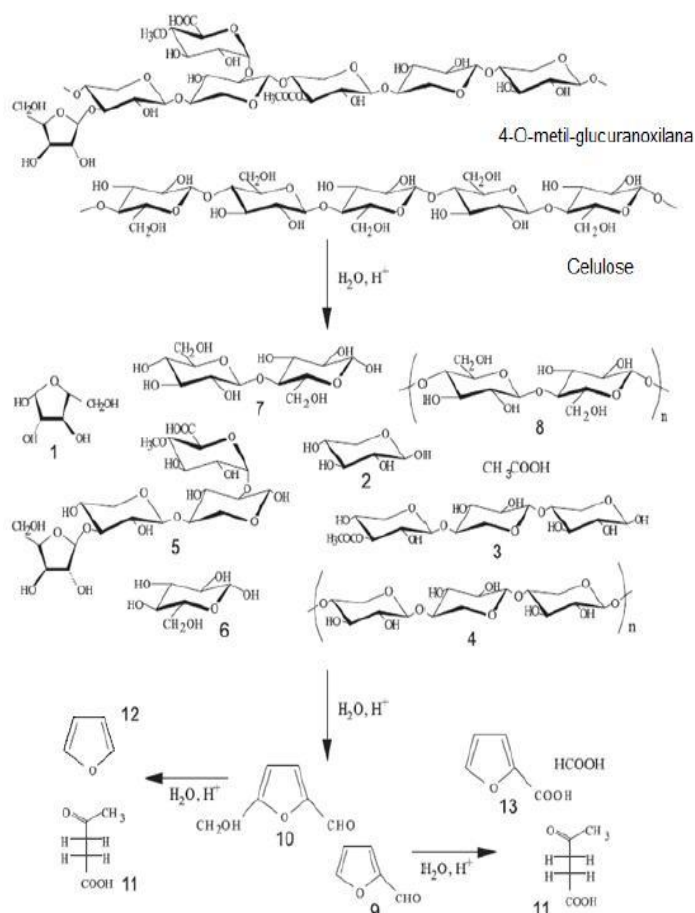
- Produzir regiões que disponibilize a celulose para ataque enzimático;
- Evitar formação de subprodutos inibidores do processo de hidrólise enzimática e crescimento microbiano;
- Minimizar os custos com a redução da matéria-prima;
- Reduzir os custos com material de construção dos reatores de pré-tratamento;
- Produzir menos resíduos.

3.4.1. Pré-tratamento Hidrotérmico

Considerado um dos métodos mais promissores de pré-tratamento de materiais lignocelulósicos, o processo hidrotérmico consiste na utilização da água sob alta temperatura e pressão (geralmente entre 180 a 240 °C) (ROGALINSKI; INGRAM; BRUNNER, 2008).

O mecanismo de reação do pré-tratamento da biomassa é representado na Figura 15. A água sob elevada pressão pode penetrar na estrutura celular da biomassa, hidratar a celulose e remover a hemicelulose. A temperatura afeta o pKa da água de maneira alterar o valor do pH que passa de 7,0 a 25 °C para próximo de 5,0 a 200 °C (ALLEN et al., 2001).

Figura 15. Hidrólise de 4-O-metil-glucuranoxilana e celulose. (1) arabinose, (2) xilose, (3) xilooligômeros acetilados (GP=3), (4) xilooligômeros de grande massa molecular, (5) oligosacarídeos, (6) glicose, (7) celobiose, (8) celooligômeros, (9) furfural, (10) hidroxidometilfurfural, (11), ácido levulínico (12) furano (13) ácido 2-furóico.



Fonte: Adaptado de RAMOS, (2003).

Em consequência disto, ocorre clivagem das ligações no complexo lignina-carboidrato provocando a quebra das ligações glicosídicas dos polissacarídeos, principalmente as presentes na hemicelulose. O ácido acético, formado a partir da desacetilação parcial da fração hemicelulósica, atua como catalisador da reação da hidrólise promovendo a despolimerização da hemicelulose (processo autocatalítico) (RAMOS, 2003).

Segundo Allen et al. (1996), durante o processo hidrotérmico, em média 90% de hemicelulose é recuperada. Já em relação a celulose, ocorre perda entre 4-22% e grande quantidade de lignina pode ser removida (35-60%). A desvantagem de se utilizar processos hidrotérmicos está relacionada com grande quantidade de água utilizada, o que gera a produção de hidrolisados muito diluídos dificultando as etapas posteriores de bioconversão (PITARELO, 2007).

Um método definido por Overend, Chornet e Gascoigne (1987) com a finalidade de avaliar a intensidade do pré-tratamento, é baseado no fator severidade do processo. E tem como objetivo simplificar a interpretação de dados, referente ao efeito de duas variáveis operacionais (tempo de reação e temperatura). O fator severidade é calculado de acordo com a equação (1)

$$\log(r_o) = \log \left\{ t e^{\left[\frac{(T - T_{ref})}{14,75} \right]} \right\} \quad (1)$$

Sendo: $\log(r_o)$ = índice de severidade; t = tempo de reação (min); T = Temperatura (°C); $T_{ref} = 100$ °C

Segundo Garrote, Domínguez e Parajó (2002), um pré-tratamento é considerado brando quando apresenta índice de severidade entre 0~3 e severo entre 4~6. Em temperaturas na faixa entre 180 a 240 °C e em curtos períodos de reação, a fração hemicelulósica é dissolvida em água durante ou após o pré-tratamento. Além disso, dependendo do grau de condensação do vapor, diferentes quantidades de celulose e lignina também podem ser extraídas (BOBLETER, 1994). No entanto, este pré-tratamento contribui para a formação de produtos de degradação indesejáveis, tais como furfural e ácidos carboxílicos, inibidores do crescimento microbiano. Como a recuperação da xilose é alta (88–98%) e nenhum produto químico é necessário, o método é ambientalmente econômico e atrativo (SARKAR et al., 2012).

3.4.2. Deslignificação Alcalina

Por via de regra, para se obter alto rendimento em açúcares (tanto hexoses quanto pentoses) na hidrólise enzimática de um material lignocelulósico, a hemicelulose e a lignina precisam ser removidas ou modificadas. Assim como a hemicelulose, a lignina forma uma barreira física, protegendo a celulose do ataque enzimático, não sendo facilmente removida na etapa de pré-tratamento (ÖHGREN et al., 2007; PAN et al., 2005). Na literatura são citados diversos métodos utilizados para remoção de lignina. Dentre eles, estão a polpação soda, polpação soda-antraquinona, polpação sulfito, polpação Kraft e polpação organosolv (SÁNCHEZ e CARDONA, 2008).

Estas metodologias são geralmente aplicadas em materiais lignocelulósicos “in natura”, por apresentarem estrutura morfológica rígida e recalcitrante, devido à interassociação das macromoléculas pertencentes à biomassa (HENDRIX; ZEEMAN, 2009). Sendo assim, condições mais severas de processo são aplicadas (concentração de álcali > 10% e temperatura acima de 150 °C) afim de separar os componentes. Por outro lado, quando a biomassa é submetida inicialmente a um pré-tratamento, torna a lignina mais frágil, podendo esta ser facilmente removida por extração alcalina, cujo método apresenta a mesma ideia do processo da polpação soda, porém em condições de reação mais amenas (concentração de álcali no máximo 4% e temperaturas na ordem de 70 °C) (BALAT, 2011).

O tratamento alcalino com NaOH das biomassas lignocelulósicas provoca aumento da área superficial interna, diminuição da cristalinidade e a separação das ligações do complexo celulignina, promovendo, assim, a solubilização da lignina (BALAT, 2011; QUILHO, 2011). De acordo com Zheng, Pan e Zhang (2009), acredita-se que o mecanismo de deslignificação alcalina esteja relacionado com a saponificação de ésteres de ligações intramoleculares entre a lignina e outros compostos.

3.5. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

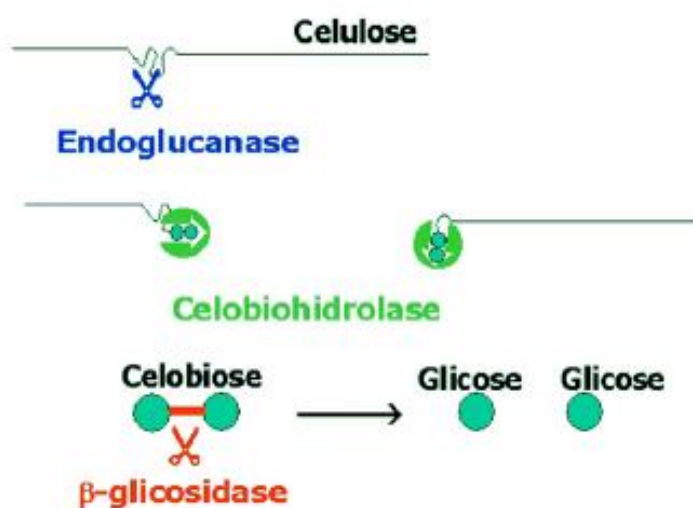
A hidrólise enzimática da celulose depende da atuação de um conjunto de enzimas específicas e complementares, cujo sinergismo é essencial para que o carboidrato nela disponível seja hidrolisado (PITARELO, 2007).

As celulasas são usualmente uma mistura de diversas enzimas. Pelo menos três grupos estão envolvidos no processo de hidrólise: as endoglucanases (EGs) que promovem ataque nas regiões de baixa cristalinidade, hidrolisando as ligações internas

β -D-1,4-glucosídica, criando cadeias com extremidades livres e formando oligossacarídeos; as exoglucanases ou celobiohidrolases (1,4- β -D-glucano celobiohidrolase ou EC 3.2.1.91), que se ligam nas extremidades das cadeias e geram principalmente glicose e celobiose; e, por fim a β -glicosidase (EC 3.2.1.21), responsável por clivar a celobiose produzindo duas moléculas de glicose, que também podem romper ligações de oligossacarídeos (BINOD, 2011).

A Figura 16 mostra o mecanismo de hidrólise da celulose para produção de glicose catalisado por um conjunto de enzimas celulolíticas.

Figura 16. Mecanismo de ação do complexo de celulasas frente ao polímero de celulose, hidrólise enzimática.



Fonte: OGEDA; PETRI, (2010).

O pré-tratamento favorece a hidrólise enzimática, permitindo que a celulose se apresente mais exposta ao ataque enzimático. Outro ponto importante, está relacionado à dosagem da carga enzimática. Altas concentrações de enzimas melhoram a eficiência, em contrapartida encarecem o processo. Em estudos realizados por Cara et al. (2006) e Ballesteros et al. (2004), foi observado que as condições de maior eficiência em conversão de celulose em glicose para materiais lignocelulósicos foram: celulase 15 FPU e 10 UI de β -glicosidade por grama de substrato, tempo de reação entre 48-72h, pH em torno de 4-5 e temperatura no intervalo de 45-55 °C.

Afim de melhorar a atividade enzimática, utiliza-se surfactantes no meio reacional, já que a atividade celulolítica diminui durante a hidrólise, devida a adsorção

irreversível da enzima sobre a celulose. Essas substâncias químicas quando adicionadas modificam a superfície da celulose minimizando a força da ligação enzima-substrato. Em estudos realizados por Talebnia (2010) foi observado que surfactantes não iônicos são mais eficientes em ensaios de hidrólise enzimática. Vasconcelos et.al. (2009), realizando hidrólise enzimática em bagaço de cana de açúcar, também observou que a adição de surfactante, favoreceu a atuação enzimática frente a biomassa lignocelulósica.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

Os cavacos de *Eucalyptus urograndis* (Figura 16) utilizados neste trabalho foram gentilmente cedidos pela Fibria, empresa líder mundial na produção de celulose de eucalipto, unidade de Jacareí, estado de São Paulo- Brasil. A madeira foi seca a 75 °C e classificada em peneiras com aberturas de 32 x 32 mm e 16 x16 mm conforme a norma SCAN-C 40:94 (1994) (Figura 17A). Em seguida amostras de cavacos foram moídas (Figura 17B) em moinho de facas (FRITSCH – Pulverisette 14) pertencente ao Departamento de Antibióticos- DANTI da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE numa faixa granulométrica <10 mm.

Figura 17. Cavaco de *Eucalyptus urograndis* “in natura” (A) e moído (B).



FONTE: Autor, (2015).

4.2. PRÉ- TRATAMENTO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

4.2.1. Pré-tratamento Hidrotérmico

Os cavacos de eucalipto “in natura” foram submetidos ao pré-tratamento hidrotérmico, em reator modelo Regmed AU/E-20, com sistema de mistura por rotação completa (360°), ajustável de 2 a 6 rpm, com capacidade de 20 L, localizado no Departamento de Engenharia Química- DEQ da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE (Figura 18).

Figura 18. Foto do reator rotatório (Regmed AU/E-20) onde foi realizado o pré-tratamento hidrotérmico e deslignificação alcalina.



FONTE: Autor, (2015).

As condições utilizadas no pré-tratamento foram: temperatura de 190 ± 5 °C por 20 min, relação sólido: líquido 1:10 ($\text{m} \cdot \text{v}^{-1}$) e rotação de 6 rpm. Cerca de 1 kg de cavaco seco juntamente com 10 L de água destilada foram adicionados ao reator e fechados hermeticamente. Posteriormente, a camisa de aquecimento do equipamento foi ligada e a temperatura e o tempo de reação foram monitorados. Ao término da reação, a pressão foi liberada gradualmente até atingir a pressão ambiente e temperatura de 100 ± 5 °C, visando diminuir a severidade do processo.

Em seguida, o reator foi descarregado e o hidrolisado hemicelulósico (Figura 19A) separado por filtração da fração sólida (celulignina) (Figura 19B). A biomassa obtida no final do pré-tratamento foi lavada com 60 L de água (em porções de 20 L), para a remoção de quantidades residuais do hidrolisado hemicelulósico e neutralização do pH. Posteriormente, foi seca em estufa (Tecnal, TE-393/1) a 105 ± 2 °C por 72 h.

Figura 19. Hidrolisado hemicelulósico obtido no pré-tratamento hidrotérmico (A); fração sólida obtida após o processo (B).



FONTE: Autor, (2015).

O rendimento em massa da fração sólida, obtida na etapa de pré-tratamento, foi determinado por gravimetria, em relação ao peso seco do cavaco inicialmente submetido ao processo, calculado pela equação 2.

$$R(\%) = \frac{M_f}{M_i} \cdot 100\% \quad (2)$$

Onde: R (%) = Rendimento da fração sólida de cavaco (%; $m \cdot m^{-1}$); M_f = Massa final de cavaco (base seca), após pré-tratamento (g); M_i = Massa inicial de cavaco (base seca), antes do pré-tratamento (g).

Frações do material sólido resultante do pré-tratamento hidrotérmico foram reservadas para ensaios de hidrólise enzimática, caracterização físico-química, deslignificação alcalina e o hidrolisado hemicelulósico foi armazenado para ensaios de pós-hidrólise.

4.2.1.1. Análise química da fração solúvel obtida no pré-tratamento (hidrolisado hemicelulósico)

O hidrolisado hemicelulósico obtido no pré-tratamento hidrotérmico foi submetido a uma pós-hidrólise, empregando-se H_2SO_4 4%. Foram adicionadas partes iguais de hidrolisado e de ácido (diluição de 1:1), a 121 °C (1,05 atm), em autoclave, durante 1 h

para hidrólise de oligossacarídeos resultantes do pré-tratamento hidrotérmico (ÖHGREN et al., 2007).

A identificação e quantificação dos compostos presentes no hidrolisado pós-hidrólise, foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência (Agilent, série 1100), coluna Aminex HPX87H (Bio-Rad), temperatura de 60 °C, fase móvel: H₂SO₄ 5mM, fluxo de 0,6 mL·min⁻¹ e detector (IR) índice de refração para a identificação e quantificação dos componentes (celobiose, glicose, xilose, arabinose, ácido fórmico, ácido acético). A concentração de furfural e HMF foi determinada utilizando-se uma coluna de fase reversa (C-18) (Agilent Technologies), com uma fase móvel composta por uma solução de acetonitrila-água-ácido acético 1:8:1%, utilizando-se um detector de UV/Vis (274 nm) a 25 °C (SLUITER et al., 2006). As amostras foram filtradas em membrana 0,22 µm antes do procedimento analítico.

4.2.2. Deslignificação alcalina

Para o processo de deslignificação dos materiais lignocelulósicos, foi empregada a técnica de extração alcalina, utilizando o mesmo reator da etapa de pré-tratamento (Item 4.2.1). Parte do material obtido no pré-tratamento hidrotérmico foi utilizado para a reação de deslignificação. As condições para esta reação foram as seguintes: NaOH 1% (m·v⁻¹), relação sólido:líquido 1:10 (m·v⁻¹), agitação de 6 rpm e 100 ± 5 °C por 1 h. Após o término da reação, o material deslignificado foi imediatamente descarregado do reator e o licor negro (Figura 20A) separado da polpa celulósica (Figura 20B) por filtração.

Figura 20. Licor negro obtido da reação de deslignificação (A); Polpa celulósica (B).



FONTE: Autor, (2015).

A polpa celulósica resultante deste processo, foi lavada com água destilada (60 L) até atingir pH neutro e, posteriormente, mensuradas para se determinar o rendimento mássico da etapa de deslignificação, também calculado pela equação 1. A fração sólida do material (polpa celulósica), foi separada para a caracterização físico-química e para as reações de hidrólise enzimática. A fração líquida foi armazenada para a obtenção da lignina sólida.

4.2.2.1. Obtenção da Lignina

O licor negro, contendo lignina, foi acidificado com ácido sulfúrico P.A até pH 2 em temperatura ambiente, e mantido sem agitação por 12 h. Ao término da reação o sistema foi filtrado em papel de filtro e lavado exaustivamente até neutralização. A lignina sólida (Figura 21) foi seca a 70 °C por aproximadamente 72 h (ROCHA et al., 2012).

Figura 21. Lignina precipitada com ácido sulfúrico.



FONTE: Autor, (2015).

4.3. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS CAVACOS DE EUCALIPTO

A determinação da composição química dos cavacos de eucalipto, “in natura”, pré-tratado e deslignificado foi realizada segundo a metodologia utilizada por Rocha et al., 2012.

4.3.1. Determinação do peso seco de cavaco de eucalipto

Para a determinação do peso seco, utilizou-se a metodologia do peso constante, onde 2 g de biomassa foram levados à estufa (Tecnal, TE-393/1), a 105 ± 2 °C, e pesados em intervalos regulares de tempo, até peso constante. O peso seco foi calculado em relação à massa inicial do material. A umidade dos cavacos foi determinada pela equação 3 (SLUITER et al., 2005).

$$\%U = \left(1 - \frac{M_{seca}}{M_{úmida}}\right) * 100 \quad (3)$$

Onde: %U= Percentual de umidade; M_{seca} =Massa seca (g); $M_{úmida}$ = Massa úmida (g)

4.3.2. Análise de extrativos

Para a quantificação dos extrativos dos cavacos “in natura” foi realizada uma extração em um aparelho de Soxhlet, utilizando como solvente extrator o sistema cicloexano:etanol 1:1 por 8 h. Ao final do processo, o material foi seco em estufa (Tecnal, TE-393/1) a 105 ± 2 °C, até peso constante.

O percentual de extrativos foi calculado por diferença de massa através da equação 4 (SLUITER et al., 2005).

$$\%Ext = \left(\frac{M_{ce} - M_{le}}{M_a}\right) * 100 \quad (4)$$

Sendo: M_{ce} = Massa da amostra com extrativos (g); M_{le} = Massa da amostra livre de extrativos (g); M_a = massa da amostra inicial seca (g).

4.3.3. Hidrólise dos cavacos de eucalipto em H₂SO₄ 72% (v·v⁻¹)

Amostras de 2 g de cavaco livre de extrativos e os obtidos após pré-tratamento hidrotérmico e deslignificação alcalina foram transferidas para béqueres de 100 mL e tratadas com 12 mL de H₂SO₄ 72% (v·v⁻¹), sob agitação durante 8 minutos, a uma temperatura de 45 ± 3 °C em banho termostático (Tecnal, TE-2005). Em seguida foram adicionados 50 mL de água destilada. Transferiram-se as amostras para frascos Erlenmeyer de 500 mL e adicionaram-se 225 mL de água destilada. O sistema foi levado

à autoclave durante 30 min a 121 °C (1,05 atm) e resfriado a 25 °C.

O material hidrolisado foi filtrado por filtração simples em papel de filtro previamente seco e pesado. O hidrolisado foi recolhido em balão volumétrico de 500 mL e o sólido, contido no papel de filtro, foi lavado com porções de 50 mL de água destilada até completar o volume do balão.

Após a separação da fração líquida, o sólido retido no papel de filtro, foi lavado com 1500 mL de água destilada para a remoção de ânions sulfato. As frações obtidas (hidrolisado e sólido) foram utilizados para a quantificação de lignina solúvel, insolúvel e determinação de açúcares, ácidos orgânicos e HMF e furfural (GOUVEIA et al., 2009; ROCHA et al., 2011).

4.3.4. Determinação do teor de lignina solúvel

Para a determinação da lignina solúvel, uma alíquota de 5 mL do hidrolisado (item 4.3.3) foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL e corrigida com 1,5 mL de uma solução de NaOH 6 M para obter solução com pH 12. Completou-se o volume do balão com água destilada obtendo assim uma diluição de 1:20. Em seguida foi realizada a leitura de absorbância do hidrolisado em espectrofotômetro (Hewlett-Packard, modelo 8453), a 280 nm, tendo água como branco. A concentração da lignina solúvel foi obtida pelas equações 5 e 6 (ROCHA et al., 2011).

$$C.LigS = [4,187.10^{-2}(A_{t280} - A_{pd280}) - 3,279.10^{-4}] \quad (5)$$

$$A_{pd280} = [(C_{Furf} \cdot \epsilon_{Furf}) + (C_{HMF} \cdot \epsilon_{HMF})] \quad (6)$$

Sendo:

C. Lig S: Concentração de lignina solúvel

A_{t280} : Absorbância da solução de lignina junto com os produtos de degradação em 280 nm;

A_{pd280} : Absorbância, em 280 nm, dos produtos de decomposição dos açúcares (furfural e HMF);

C_{Furf} : Concentração de furfural;

C_{HMF} : Concentração de HMF;

ϵ_{Furf} : Absortividade furfural 146, 85 L·g⁻¹·cm⁻¹;

ϵ_{HMF} : Absortividade HMF 114,0 L·g⁻¹·cm⁻¹;

4.3.5. Determinação de carboidratos, ácido orgânicos, HMF e furfural na fração líquida.

A identificação e quantificação dos compostos presentes no hidrolisado, obtido a partir da hidrólise com H_2SO_4 72% ($\text{v}\cdot\text{v}^{-1}$) (item 4.3.3), foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência (Agilent, série 1100), coluna Aminex HPX87H (Bio-Rad), temperatura de 60 °C, fase móvel: H_2SO_4 5mM, fluxo de $0,6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e detector índice de refração (IR) para a identificação e quantificação dos componentes (celobiose, glicose, xilose, arabinose, ácido fórmico, ácido acético).

A concentração de furfural e HMF foi determinada utilizando-se uma coluna de fase reversa (C-18) (Agilent Technologies), com uma fase móvel composta por uma solução de acetonitrila-água-ácido acético 1:8:1 utilizando-se um detector de UV/Vis (274 nm) a 25 °C (SLUITER et al., 2006). As amostras foram filtradas em membrana $0,22 \mu\text{m}$ antes do procedimento analítico. Para a determinação da quantidade final dos polissacarídeos (celulose e hemicelulose), utilizou-se uma correção através os fatores de conversão encontrados na Tabela 1.

Tabela 1. Fatores de conversão dos componentes precursores de Celulose (C) e Hemicelulose (H).

Componentes	Fator de Conversão
Celobiose (C)	0,95
Glicose (C)	0,90
Xilose (H)	0,88
Arabinose (H)	0,88
Ácido Acético (H)	0,72
Ácido Fórmico (C)	3,52
Furfural (H)	1,37
Hidroximetilfurfural (C)	1,29

FONTE: Adaptado de ROCHA, (2000); SLUITER et al. (2008).

4.3.6. Determinação de lignina insolúvel em meio ácido, teor de cinzas de lignina e cinzas totais

O material insolúvel retido no papel de filtro, proveniente da etapa de hidrólise ácida (item 4.3.3), após lavagem com 1500 mL de água destilada, foi seco em estufa (Tecnal, TE-393/1) a $105 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ até massa constante. Em seguida, o material seco foi transferido

quantitativamente para cadinhos de porcelana, previamente secos e pesados. Posteriormente, as amostras foram calcinadas a 300 °C por aproximadamente 1 h e, em seguida, a 800 °C por 2 h. Ao final do processo, os cadinhos, contendo as cinzas, foram resfriados em dessecador e a massa de cinzas, presente na lignina insolúvel (equação 7), foi quantificada em balança analítica (Ohaus, modelo, PA214CP) (GOUVEIA et al., 2009; ROCHA et al., 2011).

$$\text{Cinzas } I (g) = M_{cc} - M_{cd} \quad (7)$$

Sendo: M_{cc} : Massa de cinzas + massa do cadinho (g); M_{cd} : Massa do cadinho (g).

A porcentagem de lignina insolúvel em meio ácido foi calculada pela equação 8 em relação à massa de material lignocelulósico seco, subtraindo-se a massa de cinzas presente na lignina (GOUVEIA et al., 2009; ROCHA et al., 2011). O teor de lignina insolúvel em meio ácido é dado pela equação 8:

$$\text{LigI}(\%) = \left[\frac{M_{pr} - (M_c + M_{fp})}{M_a} \right] \cdot 100\% \quad (8)$$

Sendo:

$\text{LigI}(\%)$ = Porcentagem de lignina insolúvel; M_{pr} = Massa do papel de filtro com os resíduos sólidos + massa de cinzas (g); M_c = Massa de cinzas insolúveis em meio ácido (g); M_{fp} = Massa do papel de filtro (g) ; M_a = Massa da amostra inicial seca (g)

Para determinação do teor de cinzas totais (em triplicata), foram pesados aproximadamente 2 g de cavaco seco em cadinhos de porcelana previamente secos e tarados. Estes materiais foram inicialmente calcinados a 300 °C por aproximadamente 1 h e, então, a 800 °C por 2 h. Após a calcinação, os cadinhos foram resfriados em dessecador e a massa de cinzas determinada em balança analítica (Ohaus, modelo, PA214CP) (GOUVEIA et al., 2009; ROCHA et al., 2011).

4.3.7. Análise morfológica e estrutural dos cavacos de eucalipto

As análises morfológicas e estruturais foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Engenharia Mecânica, na Central Analítica do Departamento de Química Fundamental-DQF da Universidade Federal de

Pernambuco-UFPE; e no Laboratório Multiusuário de Nanotecnologia-LMNANO do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste-CETENE. As análises realizadas foram: microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) e difração de raio X (DRX).

4.3.7.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para verificar as mudanças na superfície dos cavacos de eucalipto “in natura” quando comparados, as biomassas obtidas no pré-tratamento hidrotérmico e deslignificação alcalina, foi empregada a técnica em microscópio (Shimadzu SS-550) com filamento de Tungstênio e com acoplamento para espectroscopia por dispersão de energia de raios X (EDS), nas ampliações de 180x e 1000x.

4.3.7.2. Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

Para visualização das modificações dos grupos funcionais pertencentes aos cavacos. Foi empregada a técnica em infravermelho (Bruker IFS66). Pastilhas de KBr foram preparadas, a partir de maceração de 200 mg de KBr e 2 mg de amostra, em um almofariz Gral de ágata. Em seguida, a mistura foi colocada em um molde pastilhador de aço inoxidável, o qual foi submetido a vácuo durante 5 min e pressionado até 15 kgf.cm^{-2} , para a formação da pastilha. Os espectros foram obtidos na região de $4000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$.

4.3.7.3. Difração de raio X – (DRX)

Com o objetivo de se avaliar as alterações nos cristais de celulose nos cavacos de eucalipto, utilizou-se um difratômetro de raios- X (XRD-6000/Shimadzu). As condições aplicadas foram: 40 kV, intervalo angular 4° a 60° (ângulo de Bragg- 2θ), variação angular $0,05^\circ$ e tempo de contagem de 1s.

4.4. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DOS CAVACOS DE EUCALIPTO

4.4.1. Hidrólise enzimática em biorreator de bancada

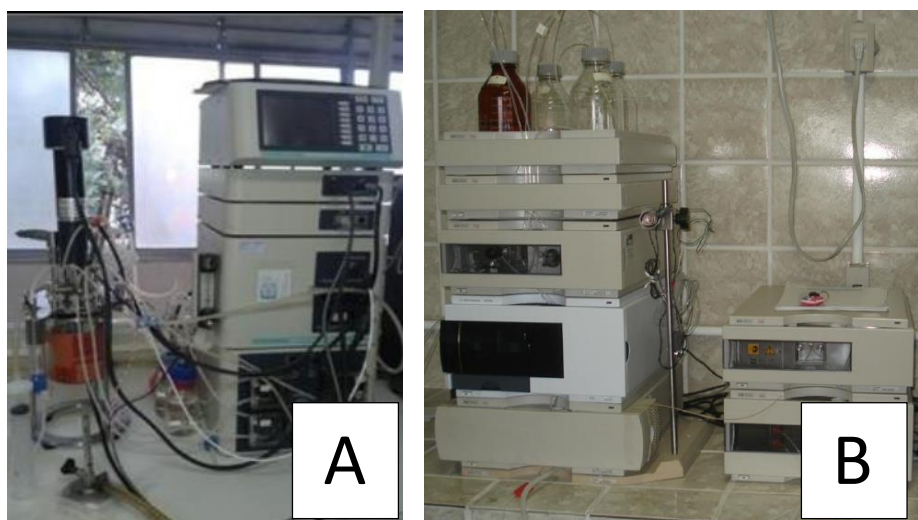
A hidrólise dos cavacos de eucalipto “in natura, após pré-tratamento hidrotérmico e deslignificação, foi realizada nas seguintes condições: tampão Citrato de

sódio $0,05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 4,8, sob agitação de 150 rpm, temperatura de $50 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e relação sólido: líquido 2% ($\text{m} \cdot \text{v}^{-1}$) com as biomassas em granulação de 80 mesh, por 96 h. As atividades enzimáticas utilizadas foram de $15 \text{ FPU} \cdot \text{g}^{-1}$ substrato (Celluclast 1.5 L) e $10 \text{ UI} \cdot \text{g}^{-1}$ substrato (Novozym 188) (CARA et al., 2006; BALLESTEROS et al., 2004).

Os ensaios conduzidos foram realizados em biorreator de bancada com volume útil de 1L (Bioflo 110, New Brunswick Scientific) (Figura 22A). O pH foi controlado com soluções de ácido sulfúrico e hidróxido de sódio 3,0 M. Amostras foram retiradas nos tempos de hidrólise durante 96 h.

As amostras retiradas, foram submetidas a um banho em ebulição por 5 min e logo após em um banho de gelo para inativação das enzimas e por fim foram centrifugadas, filtradas em membranas $0,22 \text{ } \mu\text{m}$ e posteriormente analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) nas seguintes condições: coluna HPX 87H (Bio-Rad), temperatura de $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$, fase móvel: H_2SO_4 5 mM, e fluxo de $0,6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, detector índice de refração (IR) (Figura 22B).

Figura 22. Biorreator de bancada instrumentado (New Brunswick Scientific, Bioflo 110) utilizado nos experimentos de cinética enzimática (A). Equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (Agilent, série 1100) (B).



FONTE: Autor, (2015).

O percentual de conversão enzimática de celulose foi obtido através da equação 9.

$$CC(\%) = \left[\frac{M_{\text{glucose}} \cdot F_h}{M_{\text{inicial}} \cdot Y_i} \right] \cdot 100\% \quad (9)$$

Onde: CC%: Conversão enzimática da celulose; M_{glucose} : Massa de glicose presente no

hidrolisado (g); M_{inicial} : Massa seca do material lignocelulósico antes da etapa de hidrólise; Y_i : Teor de celulose no material lignocelulósico ; F_h : Fator de hidrólise da celulose = 0,9

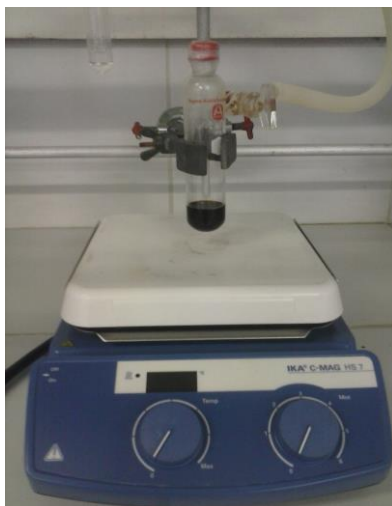
4.5. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA LIGNINA

4.5.1. Identificação da estrutura química da lignina

4.5.1.1. Acetilação da lignina

A acetilação foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Lenz (1968). Cerca de 30 mg de lignina, obtidas pelo item 4.2.2.1, foram dissolvidas em 5 mL de piridina e 5 mL de anidrido acético. A mistura foi borbulhada por 15 min com nitrogênio e o frasco selado. O sistema foi deixado a temperatura ambiente no escuro durante 50 h (Figura 23). Ao término da reação o excesso de anidrido acético foi removido pela adição de 4 mL de metanol. Os solventes foram evaporados sob pressão reduzida, com o auxílio da formação de azeótropo com tolueno e etanol. Finalmente as amostras foram completamente secas por três dias a vácuo.

Figura 23. Sistema usado na acetilação da lignina de eucalipto.



FONTE: Autor, (2015).

4.5.2. Caracterização química da lignina

4.5.2.1. Análise elementar

As análises do conteúdo de Carbono (C), Hidrogênio (H), Nitrogênio (N) e Enxofre (S) presentes nas ligninas “in natura” e acetilada. Foi utilizado um analisador

elementar (CHNS-O), da marca CE instruments, modelo EA 1110.

4.5.2.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Análises morfológicas da lignina “in natura” e acetilada foram realizadas empregando-se a técnica, em microscópio (Shimadzu SS-550) com filamento de Tungstênio e com acoplamento para EDS. Nas ampliações de 180x e 1000x.

4.5.2.3. Espectroscopia de Ressonância magnética nuclear (RMN) da lignina acetilada

Cerca de 20 mg de lignina acetilada foram dissolvidas em CDCl_3 . O espectro de RMN de ^1H de 400 MHz com pulsos de 45° ; tempo de aquisição de 2,049 s perfazendo um total de 16 repetições (Tempo total de 49 s). O espectro de RMN de ^{13}C de 400 MHz com pulsos de 45° ; tempo de aquisição de 1,285 s perfazendo um total de 856 repetições (Tempo total de 1h, 17min).

4.5.2.4. Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

As amostras de lignina “in natura” e acetilada foram previamente secas em dessecador, sob vácuo durante 3 dias, e preparadas como pastilhas de KBr contendo 0,5% de lignina compactadas a $10\text{-}12 \text{ kgf.cm}^{-2}$ sob vácuo. Em seguida, medidos os espectros na região de $4.000 \text{ a } 400 \text{ cm}^{-1}$ foram adquiridos em um espectrofotômetro FT-IR (Bruker IFS66).

4.5.2.5. Análise Espectroeletrônica na região do ultravioleta

Amostras de lignina “in natura” foram solubilizadas em solução de hidróxido de sódio $0,01\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($\text{pH}=12$) e os espectros foram obtidos numa faixa de 190 a 400 nm em espectrofotômetro (Hewlett-Packard, modelo 8453).

4.5.2.6. Determinação dos coeficientes de extinção das ligninas

Uma solução estoque foi preparada dissolvendo 50 mg de lignina “in natura” (previamente seca em dessecador a vácuo), em 100 mL de NaOH $0,01 \text{ M}$. Foram realizadas diluições partindo-se da solução estoque de 50 mL para a construção de uma curva analítica. As concentrações para a curva foram de $0,1 \text{ a } 0,02 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, foi utilizado como branco a solução de NaOH $0,01 \text{ M}$, e em seguida lidas em espectrofotômetro (Hewlett-Packard, modelo 8453) num comprimento de onda de 280 nm. A absorção em

280 nm pode ser atribuída as estruturas quinoides e demais grupos cromóforos presentes na estrutura da lignina Lenz (1968).

4.5.2.7. Determinação da fórmula mínima

Com os valores das porcentagens de C, H e N obtidos na análise elementar (4.5.3.1) e o teor de metoxilas obtida no RMN ^1H (4.5.3.3), determinou-se a fórmula mínima para lignina, usando-se as expressões descritas por Freudenberg e Neish (1968). A lignina pode ser representada pela equação geral $\text{C}_9\text{H}_x\text{O}_y(\text{OCH}_3)_z$ onde x, y e z são obtidos pelas equações 9, 10 e 11:

$$X = \frac{277(\%H) - 27(\%OCH_3)}{2,584(\%C) - (\%OCH_3)} \quad (9)$$

$$Y = \frac{17,45(\%O) - 9(\%OCH_3)}{2,584(\%C) - (\%OCH_3)} \quad (10)$$

$$Z = \frac{9(\%OCH_3)}{2,5884(\%C) - (\%OCH_3)} \quad (11)$$

Onde: %H: Porcentagem de hidrogênio; %O: Porcentagem de carbono; %OCH₃:

Porcentagem de Metoxilas nas amostras de lignina acetilada.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. PRÉ-TRATAMENTO HIDROTÉRMICO E DESLIGNIFICAÇÃO ALCALINA DOS CAVACOS DE EUCALIPTO EM REATOR ROTATÓRIO

Os cavacos de eucalipto foram submetidos ao pré-tratamento hidrotérmico para solubilização da hemicelulose e logo após submetidos a deslignificação alcalina para solubilização da lignina. Na Tabela 2 são apresentados os valores da composição química dos cavacos de eucalipto “in natura”, pré-tratado e deslignificado, juntamente com o balanço de material e rendimento obtido durante o pré-tratamento e deslignificação. As curvas analíticas de açúcares, ácidos orgânicos e produtos de degradação são apresentados no Apêndice A. Os resultados da caracterização físico-química para os cavacos “in natura”, pré-tratado e deslignificado assim como seus respectivos cromatogramas são encontrados nos Apêndices B, C e D respectivamente.

Tabela 2. Composição química dos cavacos de eucalipto “in natura” pré-tratado e deslignificado em base seca, juntamente com o balanço de material.

Composição química (%)	“in natura” (%)	Pré-tratado H ₂ O (%)	Corrigido pelo rendimento do Pré-tratado H ₂ O (%)	Pré-tratado NaOH 1% (%)	Corrigido pelo rendimento do Pré-tratado NaOH 1% (%)
Rendimento	-	-	64,8 ± 2,68	-	54,6 ± 14,5
Celulose	40,88 ± 0,1	45,96 ± 0,7	29,8 ± 0,1	74,00 ± 2,1	26,18 ± 0,0
Hemicelulose	14,82 ± 0,1	1,60 ± 0,0	1,04 ± 0,0	1,09 ± 0,1	0,39 ± 0,0
Lignina	34,54 ± 3,4	46,98 ± 0,9	30,06 ± 0,4	18,05 ± 0,1	6,39 ± 0,0
Extrativos	4,24 ± 0,3	-	-	-	-
Cinzas	0,45 ± 0,1	0,14 ± 0,1	0,09 ± 0,1	0,11 ± 0,0	0,02 ± 0,0
Total	94,93 ± 3,4	94,68 ± 0,8	-	93,25 ± 2,1	-

Memória do cálculo: Pré-tratamento (45,96*0,648=29,8%); Deslignificação (74,00*0,648*0,546=26,18%).

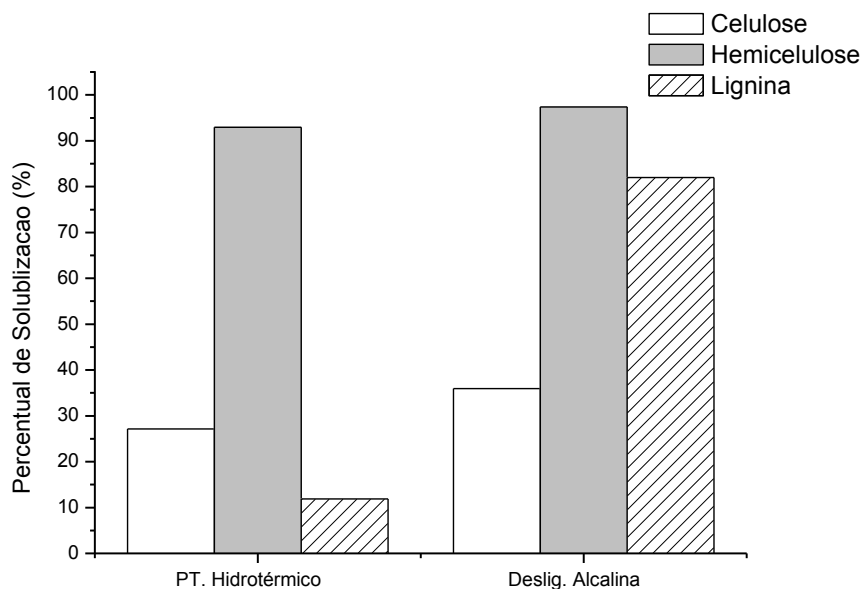
FONTE: Autor, (2015).

A composição química dos cavacos de eucalipto, em termos dos principais componentes (celulose, hemicelulose e lignina), aproxima-se da obtida por outros autores. O eucalipto é composto por 17-27% de hemicelulose, 39-46 % de celulose, 26,7-32,1% de lignina, 2-12,4 % de extrativos e 0,24-0,34% de cinzas (PEREZ et al., 2010; GONZALEZ et al., 2011; SILVA et al., 2012; NUNES et al., 2011; RAGAUSKAS et al., 2014; MOKFIENSKI et al., 2003; MORI et al., 2003 e TRUGILHO et al., 2004). Conforme se pode observar, os valores determinados na caracterização química da madeira de *Eucalyptus urograndis* são coerentes às diversas literaturas analisadas.

A composição química total da madeira foi de 94,93 %. Como era de se esperar, o percentual foi inferior a 100%, devido à ausência de algumas análises, como é o caso da

quantificação, ácido 4-O-metilglucurônico, ácido levulínico, galactose, arabinose, ácido glucurônico, xilooligômeros acetilados, celooligômeros, ácido furóico (RAMOS, 2003) bem como erros experimentais. A Figura 24 mostra a solubilização dos componentes macromoleculares (celulose, hemicelulose e lignina).

Figura 24. Solubilização dos componentes dos cavacos de eucalipto pós etapa de pré-tratamento e deslignificação alcalina.



FONTE: Autor, (2015).

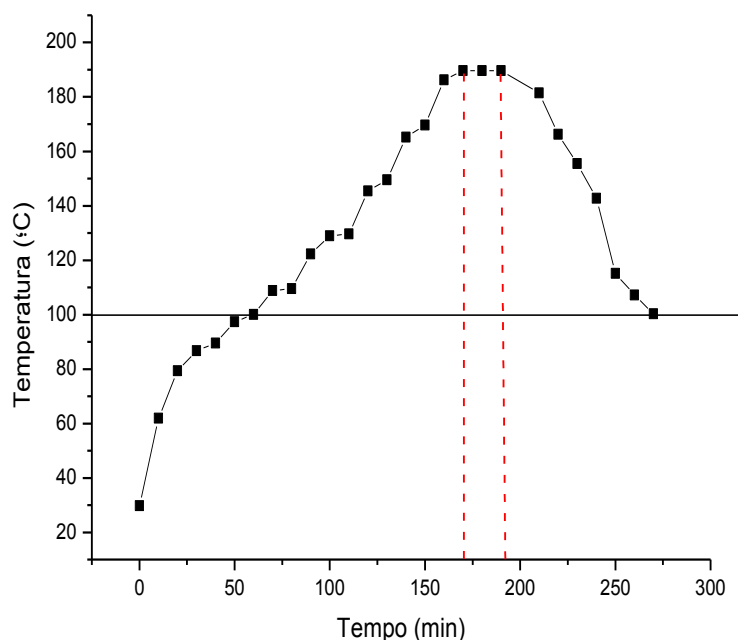
De acordo com a Figura 24, a hemicelulose foi o componente que sofreu maior solubilização 93%. Yu et al. (2010), estudando o efeito do pré-tratamento hidrotérmico em *Eucalyptus grandis* nas condições: relação sólido:líquido 5% ($\text{m}\cdot\text{v}^{-1}$) e temperatura de 180 °C por 20 min, obteve solubilização de 86,4%. Estes valores são próximos aos encontrados por Xiao et al. (2014), que estudando madeira de *Eucalyptus grandis* obteve rendimentos em torno de 96,6% nas condições: relação sólido:líquido 1:10 ($\text{m}\cdot\text{v}^{-1}$) e temperatura de 160 °C por 15 min. Ao final da reação o pH do hidrolisado hemicelulósico foi 3,8. Valor próximo aos obtidos por Lima e Assumpção (1982) e Canettieri et al., (2002) em estudos com hidrólise em que madeira, que obtiveram valores de pH entre 3 e 4. Os autores comentam que o licor residual após a hidrólise fica enriquecido com grupos ácidos orgânicos (glucorônico, galactourônico e acético) o que tende a diminuir o pH.

As concentrações dos componentes químicos presentes no hidrolisado (Apêndice E, na Tabela E.2) foram: xilose $2,9 \pm 0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; glicose $2,3 \pm 0,04 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; ácido fórmico

$0,8 \pm 0,07 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; e ácido acético $4,4 \pm 0,264 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; HMF $0,45 \pm 0,004 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e furfural $0,66 \pm 0,014 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Assim, a alta solubilização alcançada é um indicativo da eficiência do pré-tratamento aplicado. Essa alta eficiência está relacionada com as características química da hemicelulose, a qual apresenta uma estrutura amorfa e ramificada, sendo mais facilmente hidrolisada em condições ácidas (ALVIRA et al., 2010; TAHERZADEH; KARIMI, 2008). A menor estabilidade da hemicelulose ocorre devido ao fato de suas cadeias laterais inibirem a formação de ligações de hidrogênio, o que a torna muito mais acessível ao ataque hidrolítico (BOBLETER, 1994).

A Figura 25 e o Apêndice B (Tabela E.1) mostram a rampa e os dados obtidos de aquecimento e resfriamento durante o pré-tratamento hidrotérmico. Através da integração matemática da curva obtida, foi possível determinar o fator severidade de 2,94 (Equação 2) para a condição de pré-tratamento. Com esse índice, segundo Garrote, Domínguez e Parajó (2002), o processo é considerado brando.

Figura 25. Rampa de controle da temperatura durante o pré-tratamento hidrotérmico realizado no reator modelo REGMED AU/E-20. As setas tracejadas indicam o período em que a temperatura permaneceu constante.



FONTE: Autor, (2015).

A celulose e lignina, por outro lado, foram menos solubilizadas 27,1% e 11,98% respectivamente. Em relação à celulose, esta é conhecida como sendo o componente mais recalcitrante frente ao pré-tratamento hidrotérmico, o que justifica ter sido menos hidrolisada que a hemicelulose. Esse fato é devido às ligações de hidrogênio intramoleculares, que conferem rigidez à molécula (VASCONCELOS et.al., 2013; BOBLETER, 1994; CANILHA et al., 2011).

Após a deslignificação alcalina, o teor de celulose e lignina na fração sólida diminuíram em 35,96% e 82%, respectivamente. Esses valores correspondem à solubilização da biomassa quando comparada à biomassa “in natura”. Esse valor de solubilização de lignina é próximo ao obtido por Lima et al. (2013), que utilizando madeiras de *Eucalyptus urograndis* pré-tratadas com HCl 1% (v·v⁻¹) seguidas de deslignificação com NaOH 4% (m·v⁻¹) e nas condições: relação sólido:líquido 1:10 (m·v⁻¹), temperatura de 120 °C por 1 h removeram 84% de lignina. Perez e colaboradores (2010) removeram 65% de lignina nas seguintes condições: 165 °C por 2 h, sistema de deslignificação acetona:água 1:1 (v·v⁻¹), relação sólido:líquido 1:10 (m·v⁻¹)

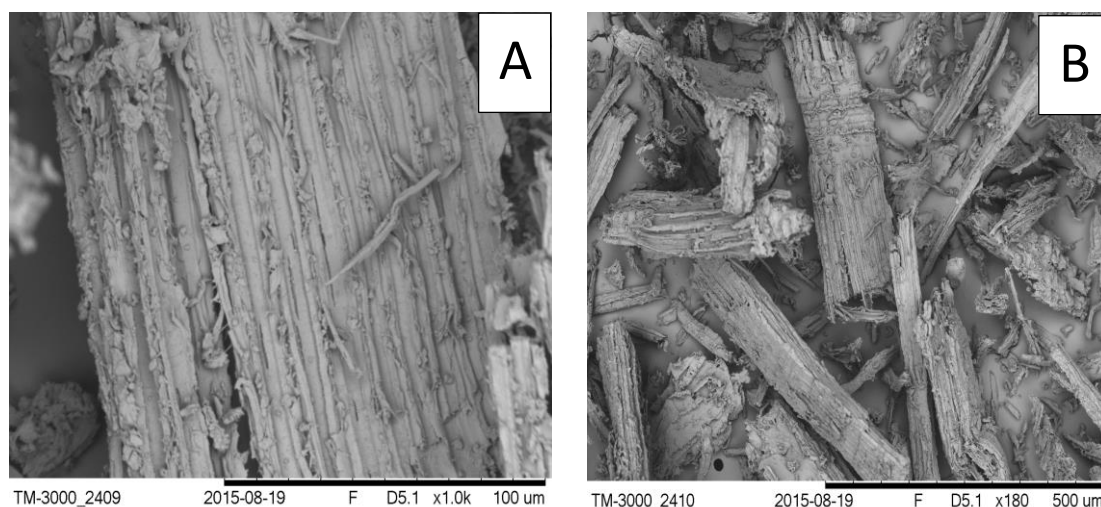
O tratamento alcalino com NaOH provoca na madeira aumento da área superficial interna, diminuição da cristalinidade e a separação das ligações do complexo celulignina, provocando, assim, a solubilização da lignina (BALAT, 2011). De acordo com Zheng, Pan e Zhang (2009), o mecanismo de deslignificação alcalina está relacionado com a saponificação de ésteres de ligações intramoleculares. O processo de deslignificação alcalina não é seletivo apenas para a lignina, podendo também degradar os carboidratos, incluindo a celulose (PAN et al., 2005).

5.2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E MORFOLÓGICA DOS CAVACOS DE EUCALIPTO

5.2.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Os cavacos de eucalipto “in natura”, pré-tratados hidrotermicamente e deslignificados foram submetidos a MEV (Figuras 26, 27 e 28) com o objetivo de verificar mudanças provocadas na sua morfologia. Nas Figuras 26A e 26B, o cavaco de eucalipto “in natura” apresenta aspecto de um material heterogêneo constituído por um tecido fibroso e medular, além de possuir aparência regular e compacta.

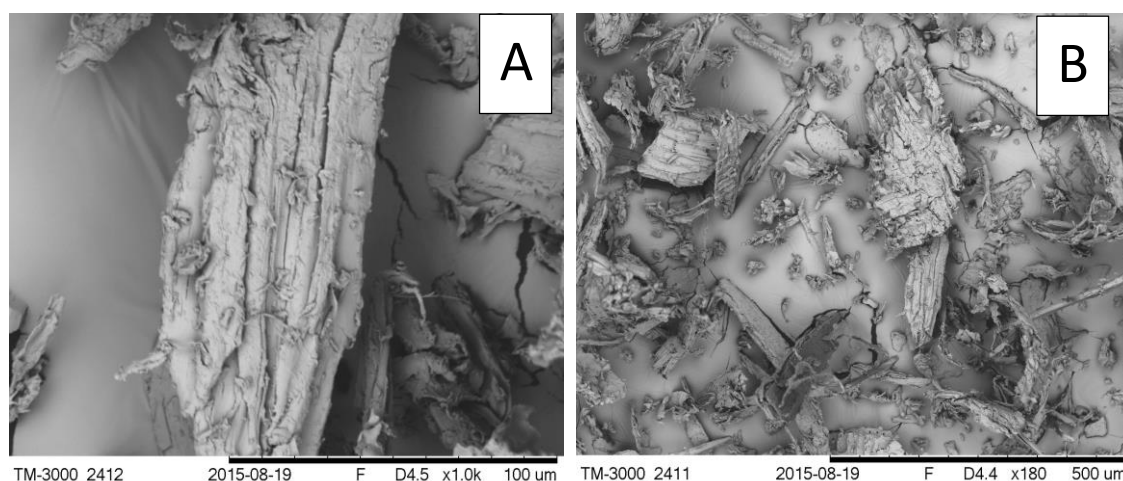
Figura 26. Fotomicrográfas dos cavacos de eucalipto “in natura” nas ampliações 1000x (A) e 180x (B), respectivamente.



FONTE: Autor, (2015).

Após o pré-tratamento hidrotérmico (Figuras 27A e 27B), foi possível observar pequenas mudanças estruturais no material que se apresentou fraturado e quebradiço, indicando que a área superficial da fibra foi modificada e aumentada. Além disso, a quantidade de ranhuras e regiões rugosas se tornaram mais proeminente, demonstrando a separação parcial da compacta estrutura lignocelulósica.

Figura 27. Fotomicrográfas dos cavacos de eucalipto pré-tratado nas ampliações 1000x (A) e 180x (B), respectivamente.

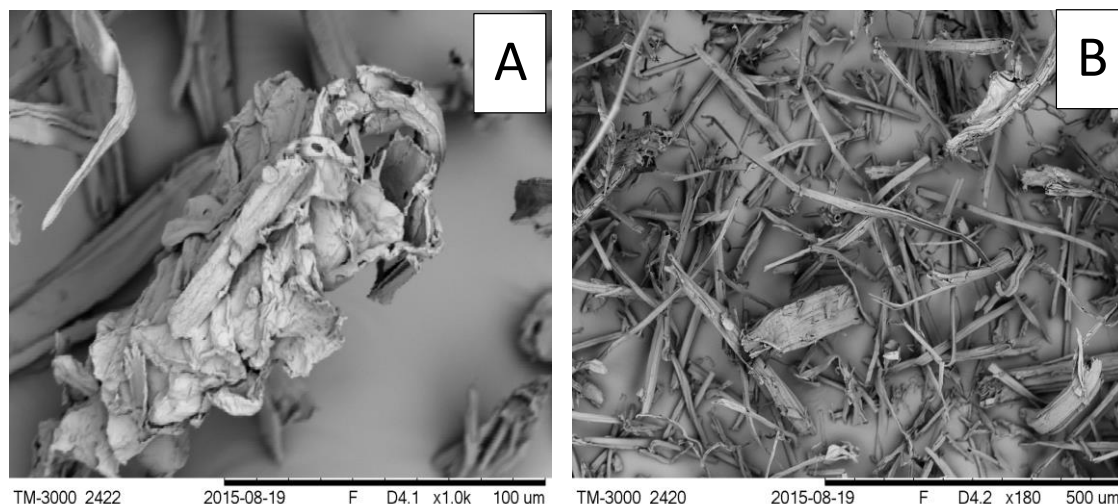


FONTE: Autor, (2015).

A deslignificação alcalina (Figuras 28A e 28B), promoveu quebra do complexo celulignina, indicada pela desorganização do material, Alvira et al. (2010) afirmam que

essa desestruturação é devida à solubilização da lignina, provocando aumento na porosidade da estrutura assim como a digestibilidade da celulose, deixando-a mais exposta para hidrólise enzimática (QI et al., 2009).

Figura 28. Fotomicrográfas dos cavacos de eucalipto deslignificado nas ampliações 1000x (A) e 180x (B) respectivamente.



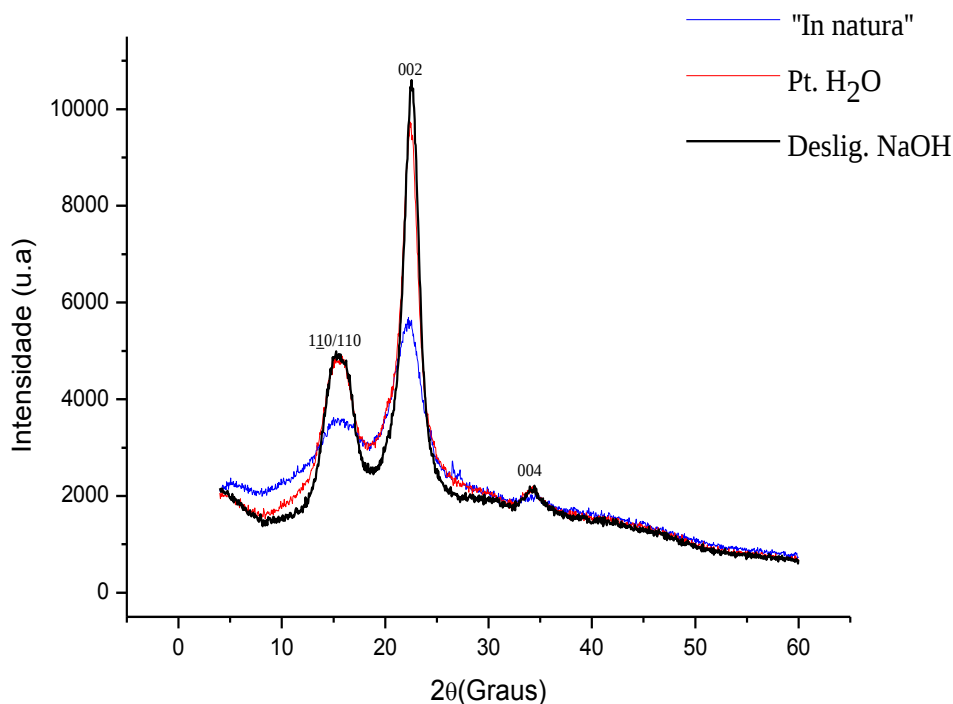
FONTE: Autor, (2015).

5.2.2. Difração de raios-X (DRX)

As análises por difração de raios-X das amostras permitiram avaliar as mudanças ocorridas na celulose do cavaco “in natura”, quando submetido ao pré-tratamento e após deslignificação, em nível macromolecular. Os perfis de DRX estão apresentados na Figura 29 e no Apêndice F (Figuras F.1, F.2 e F.3). O difratograma do cavaco de eucalipto “in natura” apresentou picos mais largos quando comparado aos submetidos ao pré-tratamento hidrotérmico e a deslignificação alcalina. Isso é devido à associação da celulose com as outras macromoléculas, hemicelulose e lignina. As mudanças no comportamento dos difratogramas ao longo dos pré-tratamentos podem estar relacionadas com a solubilização das estruturas amorfas e com a transformação da celulose em outras formas cristalinas (SARKO et al., 1986).

Na espectroscopia por DRX, a celulose é padrão para a medida de cristalinidade de materiais lignocelulósicos. A Tabela 3 mostra os valores da largura média dos cristalitos no plano reticulado de maior intensidade, o índice de cristalinidade (IC) e a intensidade máxima nas regiões amorfas e cristalinas para os cavacos de eucalipto.

Figura 29. Difratomogramas de raios-X para os cavacos de eucalipto.



FONTE: Autor, (2015).

Tabela 3. Parâmetros de cristalinidade para os cavacos de eucalipto.

Cavacos	Intensidade em 2θ		Largura cristalito (Å)	% IC
	I ₀₀₂	I _{amorfa}		
In. Natura	5645,3 ± 0,8	3050,9 ± 26,5	22,7 ± 0,4	46,1 ± 0,3
Pré-tratado	9713,5 ± 9,3	3023,7 ± 125,6	39,0 ± 0,7	68,9 ± 0,5
Deslignificado	105831,1 ± 61,5	2572,6 ± 34,5	40,4 ± 0,5	75,7 ± 0,2

FONTE: Autor, (2015).

De acordo com os resultados obtidos na Tabela 3, a largura do cristalito de celulose sofreu aumento ao longo do processo (pré-tratamento e deslignificação). Lima et al. (2013), estudando madeira de *Eucalyptus urograndis* submetidas a pré-tratamento com HCl 1% (v·v⁻¹) seguidas de deslignificação alcalina com NaOH 4% (m·v⁻¹) nas condições: relação sólido:líquido 1:10 (m·v⁻¹) e temperatura de 120 °C por 1h, obtiveram índice de cristalinidade próximos aos valores obtidos na Tabela 3 para as biomassas 68,6 ± 1,6% biomassa pré-tratada e 81,6 ± 1,3% biomassa deslignificada.

O aumento do índice de cristalinidade se deu por conta da solubilização de compostos não celulósicos que influenciam diretamente no alargamento dos cristalitos. Entretanto, os mecanismos que regem o alargamento dos cristalitos ainda não estão bem elucidados. Porém estudos realizados por Driemeier et al. (2011) revelaram que a largura tanto pode estar associada ao crescimento do cristalito ou até mesmo à agregação dos

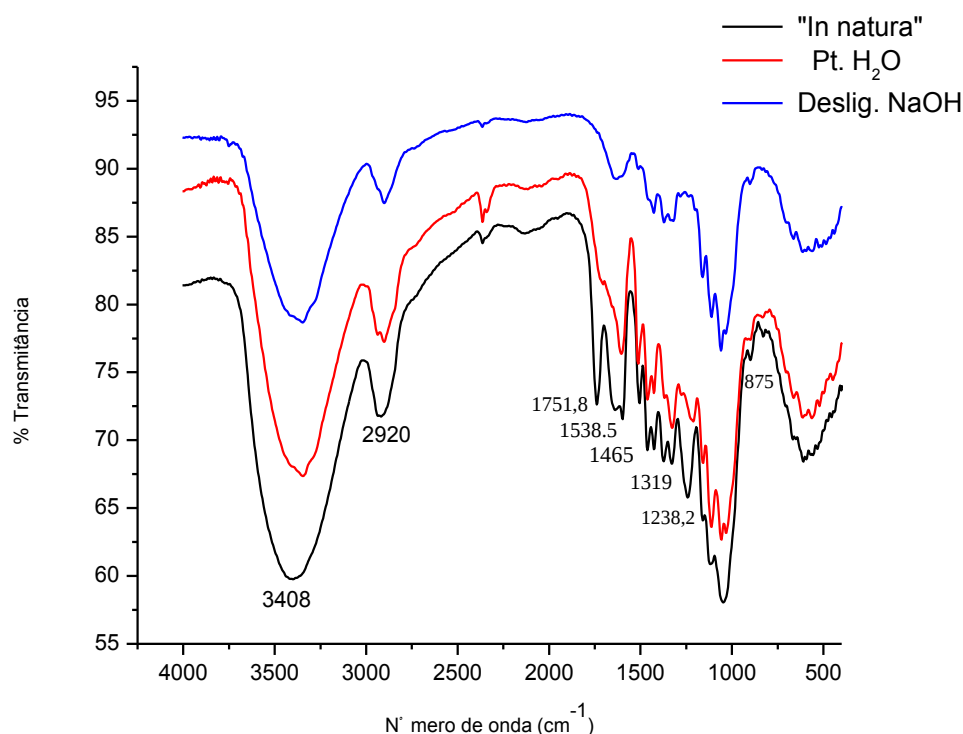
mesmos devido à remoção de componentes, fazendo com que os cristais originais de celulose se fundam aumentando assim de tamanho.

Além disso, vários autores também reportam que o aumento desses parâmetros de cristalinidade é devido ao processo de transformação da celulose “in natura” do tipo I em celulosas cristalinas do tipo II-IV (ATTALA, 1993).

5.2.3. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

As análises de FT-IR dos cavacos de eucalipto “in natura”, pré-tratado hidrotermicamente e deslignificado foram realizadas na região entre 4000 – 400 cm^{-1} . A estrutura química é analisada em função dos grupos funcionais presentes nos cavacos. A Figura 30 e o Apêndice G (Figuras G.1, G.2 e G.3) apresentam os espectros dos cavacos de eucalipto “in natura” e os obtidos em cada etapa do processo.

Figura 30. Espectro de FT-IR dos cavacos de eucalipto “in natura” e os obtidos durante o processo.



FONTE: Autor, (2015).

A banda em 3408 cm^{-1} , pode ser atribuída a deformação do grupo (O-H), que está relacionado com a presença de álcoois e fenóis com ligações de hidrogênio. A banda registrada em 2920 cm^{-1} estiramentos (CH_2) apresentou maior intensidade no espectro do

cavaco de eucalipto “in natura” quando comparados aos outros. Esse fato pode estar associado a presença das frações alifáticas representada pelos extrativos (ZHANG, et al., 2012). As principais mudanças entre os espectros dos cavacos de eucalipto “in natura” e pré-tratado ocorreram no comprimento de onda de 1751 cm^{-1} , relacionado a deformações axial de grupos carbonilas. Observa-se uma banda de absorção com uma frequência acentuada no cavaco “in natura” em 875 cm^{-1} , referente à ligação glicosídica, quando submetido ao pré-tratamento hidrotérmico a frequência de absorção nessas regiões se apresentam bastante reduzida isso devido a remoção da hemicelulose (XU et al., 2013).

Por outro lado, os cavacos “in natura” quando comparados aos deslignificados, apresentaram as bandas referentes a lignina bastante reduzidas principalmente as vibrações do anel aromático mais estiramento C=O em 1538 cm^{-1} , deformação do grupamento C-H em 1465 cm^{-1} , C-O do anel siringílico em 1319 cm^{-1} e estiramento C-C + C-O em 1238 cm^{-1} , essa redução se deu devido à solubilização parcial da lignina (XU et al., 2013). Isso é confirmado pela recalcitrância devida à presença de compostos aromáticos secundários presentes no material submetidos a tratamento (HENDRIX e ZEEMAN, 2009). A Tabela 4 mostra outras bandas identificadas e as suas atribuições, de acordo com Xu et al., (2013).

Tabela 4. Atribuições das bandas de absorção na região do infravermelho para biomassas lignocelulósicas.

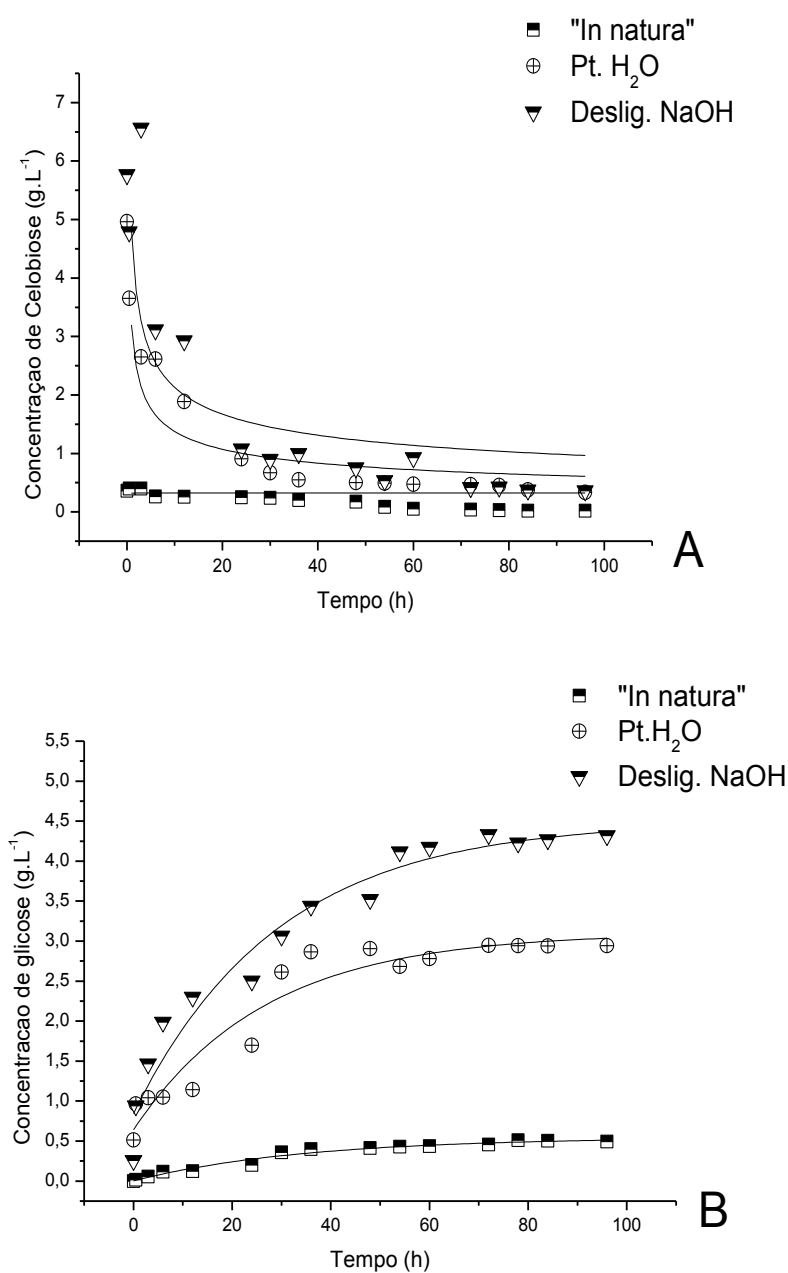
Absorção (cm^{-1})	Atribuição
3408	Estiramento –OH do álcool e fenol
2840, 2937	Estiramento C-H dos alcanos, álcoois e anel aromático
1730	Estiramento C=O Aldeído/Cetona
1682	Estiramento de C=O de cetonas não conjugadas
1675-1650	Arilcetonas (C=O) conjugada
1589	Vibração do anel aromático + Estiramento C=O
1500	Vibração do anel aromático
1465	Deformação do grupamento C-H
1440	Deformação em-CH ₃ e CH ₂ -
1425	Esqueleto aromático combinado com C–H no plano de deformação e alongamento.
1319	C-O do anel Siringílico
1270	Vibrações C-O-C do anel Guaicílico
1237	Estiramento C-C + C-O
1160	Estiramento vibracional do anel C–O–C do acoplamento (1,4) – glicosídico.
1035	Estiramento C-O do álcool, C-C, C-O-C
930	Ligação glicosídica
875	Ligação glicosídica

Fonte: Adaptado de Xu et al. (2013).

5.3. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DOS CAVACOS DE EUCALIPTO

Os perfis de concentrações de celobiose e glicose, obtidas durante o processo de hidrólise enzimática dos cavacos de eucalipto, estão apresentados na Figura 31 e no Apêndice H (figuras H.2.1 e H.2.2).

Figura 31. Perfis de concentrações de celobiose (A). Glicose, (B), obtidos na hidrólise enzimática utilizando-se enzimas comerciais Celluclast® 1,5L e Novozym® 188 dos cavacos de eucalipto.



FONTE: Autor, (2015).

A celobiose nos cavacos “in natura” atingiu a maior concentração $0,4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ nas primeiras 8 h. A partir de 12 h, a concentração de celobiose foi sendo reduzida, chegando a $0,02 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ no tempo final de hidrólise, em 96 h. A concentração de glicose liberada aumentou com o tempo de hidrólise, alcançando $0,45 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ em 72 h.

Segundo Ogeda e Petri (2010), a baixa sacarificação é devido às complexas interações entre celulose e hemicelulose presente nas paredes celulares dos vegetais e entre esses polissacarídeos e a lignina. A barreira física formada pela lignina e hemicelulose ao redor das fibras celulósicas impede a atuação do complexo enzimático. Por esta razão, é preciso que a biomassa sofra um pré-tratamento para separar a matriz lignina, reduzir a cristalinidade da celulose e hidrolisar a hemicelulose (LIMA et al., 2013).

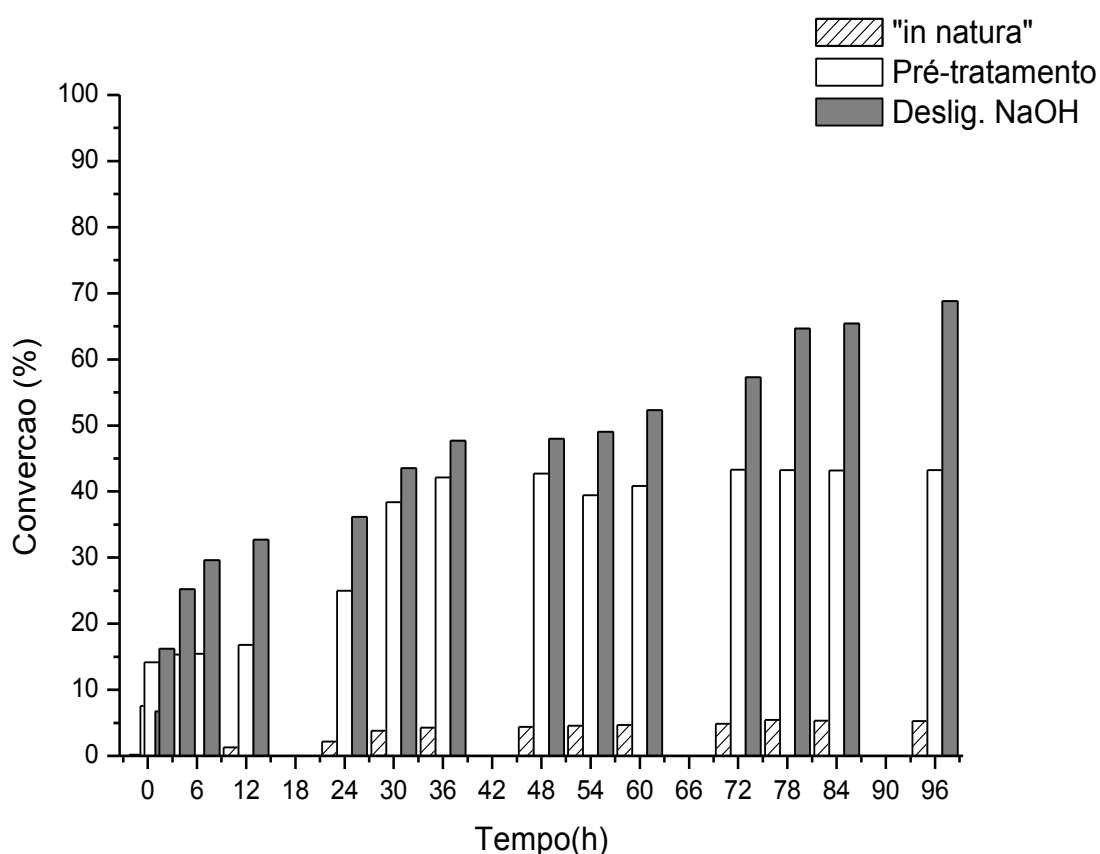
Os cavacos submetidos a pré-tratamento hidrotérmico e à deslignificação apresentaram aumento nos perfis de glicose e diminuição para celobiose. Isso é devido à mudança na estrutura química da madeira (MOSIER et al., 2005), deixando a celulose mais exposta a atuação das celulasas que promovem a quebra das ligações da celulose até glicose (BINOD, 2011). A celobiose liberada da biomassa submetida a pré-tratamento hidrotérmico apresentou máximo de concentração em $4,69 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ nas primeiras 8 h. A partir de 12 h, a concentração de celobiose foi sendo reduzida, chegando a $0,33 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ no tempo final de hidrólise, em 96 h. A concentração de glicose liberada alcançou $2,94 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ em 72 h.

As biomassas deslignificadas apresentaram maiores concentrações de celobiose $6,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ quando comparados aos pré-tratados e o “in natura”, nas primeiras 8 h. A concentração de glicose liberada aumentou com o tempo de hidrólise, alcançando $3,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ em 72 h. Essa melhor sacarificação está relacionada com a maior exposição da celulose e diminuição da barreira formada por lignina e hemicelulose (ALVIRA, 2010).

Neste sentido, Guo et al. (2009) também observaram que durante a hidrólise enzimática de diferentes materiais lignocelulósicos pré-tratados com H_2SO_4 1%, 2% e 4% ($\text{m}\cdot\text{m}^{-1}$) a 130°C por 15 min. Em condições de hidrólise enzimática: tampão acetato de sódio 50 mM; temperatura 50°C ; pH 5,0; rotação de 100 rpm; relação sólido:líquido 2% ($\text{m}\cdot\text{v}^{-1}$); por 72 h e concentração enzimática de $6,5 \text{ FPU}\cdot\text{g}^{-1}$ de celulasas CP (Genencor International, USA). A concentração de celobiose alcançou um valor máximo em cerca de 4-8 horas, sendo que a mesma foi reduzida à medida em que o tempo hidrolítico aumentou. Em contrapartida a glicose apresentou aumento e concentrações máximas em torno de 72 h de hidrólise.

Na Figura 32 e no Apêndice H (Figura H.2.3) encontram-se os perfis de conversão enzimática de celulose em glicose para as biomassas. Para o cálculo de conversão utilizou-se a Equação 9.

Figura 32. Conversões de celulose em glicose obtidos na hidrólise enzimática utilizando-se enzimas comerciais Celluclast® 1,5L e Novozym® 188 para os cavacos de eucalipto.



FONTE: Autor, (2015).

O perfil de conversão de celulose em glicose encontra-se apresentando na Figura 32, onde ocorreu um aumento contínuo da conversão, chegando a 65% no tempo de 72 h de hidrólise nos cavacos deslignificados. Lima et al. (2013) encontraram conversão de 65% após 48 h de hidrólise enzimática de madeira de *Eucalyptus urograndis* submetida a pré-tratamento com HCl 1% (v·v⁻¹) e a deslignificação alcalina com NaOH 4% (m·v⁻¹) relação sólido:líquido 1:10, temperatura de 120 °C por 1h. A biomassa foi submetida a hidrólise enzimática nas seguintes condições: tampão citrato de sódio 50 mM; temperatura 50 °C; pH 5,0; rotação de 200 rpm; relação sólido:líquido 5% (m·v⁻¹) ; concentração enzimática de 25 FPU·g⁻¹ (accellerase 1500 (Genencor,

Denmark)), suplementada com 12,5 BGU de beta-glicosidase de *Aspergillus niger* (Novozyme 188; Novozymes, Denmark).

Romaní et al. (2014), estudando o efeito do pré-tratamento hidrotérmico a 210 °C por 1 h em madeira de *Eucalyptus globulus*, obteve conversão de celulose em glicose de 81,5% nas seguintes condições de hidrólise enzimática: tampão citrato de sódio 50 mM; temperatura 48,5 °C; pH 4,85; relação sólido:líquido 8:1 ($\text{m}\cdot\text{v}^{-1}$); concentração enzimática de 22,5 $\text{FPU}\cdot\text{g}^{-1}$ (CTec2), suplementada com 500 $\text{UI}\cdot\text{g}^{-1}$ (HTec2).

Emmel et al. (2003), avaliando o efeito da atuação de celulasas, obteve conversão de 90% em madeira de *Eucalyptus grandis* pré-tratada com H_2SO_4 0,175% ($\text{m}\cdot\text{m}^{-1}$) a 210 °C por 2 min nas seguintes condições: tampão citrato de sódio 50 mM; temperatura 45 °C; pH 4,8; rotação de 145 rpm; relação sólido:líquido 2% ($\text{m}\cdot\text{v}^{-1}$); por 48 h concentração enzimática de 25 $\text{FPU}\cdot\text{g}^{-1}$ (Celluclast 1.5 L).

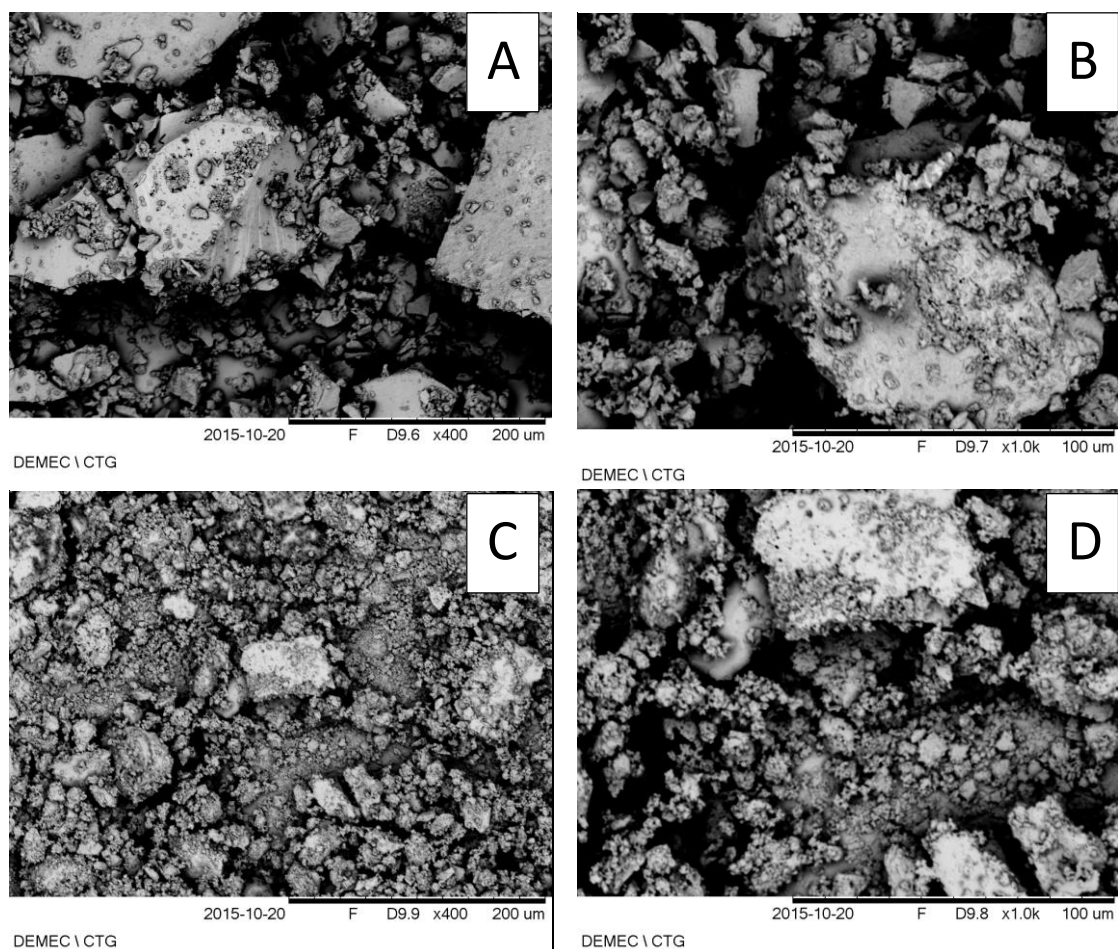
Sun et al. (2014), submetendo *Eucalyptus urophilla* a pré-tratamento hidrotérmico (180 °C por 30 min), combinado a deslignificação alcalina com NaOH 2% ($\text{m}\cdot\text{v}^{-1}$) a 90°C por 2,5 h, obtiveram conversão de celulose em glicose de 66,3%, nas condições: tampão acetato de sódio 50 mM; temperatura 45 °C; pH 4,8; rotação de 150 rpm; relação sólido:líquido 2% ($\text{m}\cdot\text{v}^{-1}$); por 72 h concentração enzimática de 17 $\text{FPU}\cdot\text{g}^{-1}$ de celulasas e 34 $\text{IU}\cdot\text{g}^{-1}$ de beta-glicosidase.

5.4. CARACTERIZAÇÃO DA LIGNINA

5.4.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das ligninas

As fotomicrografias da lignina “in natura” e acetilada são apresentadas na Figura 33. As imagens mostra que houve uma modificação significativa no tamanho e na superfície das partículas. Após a acetilação (Figuras 33C e 33D), a lignina apresentou partículas menores, mais aglomeradas e superfície mais áspera quando comparadas a lignina “in natura” (Figuras 33A e 33B).

Figura 33. Fotomicrográfas da lignina “in natura” (A, B) e lignina acetilada (C, D) nas ampliações 400x e 1000x, respectivamente.

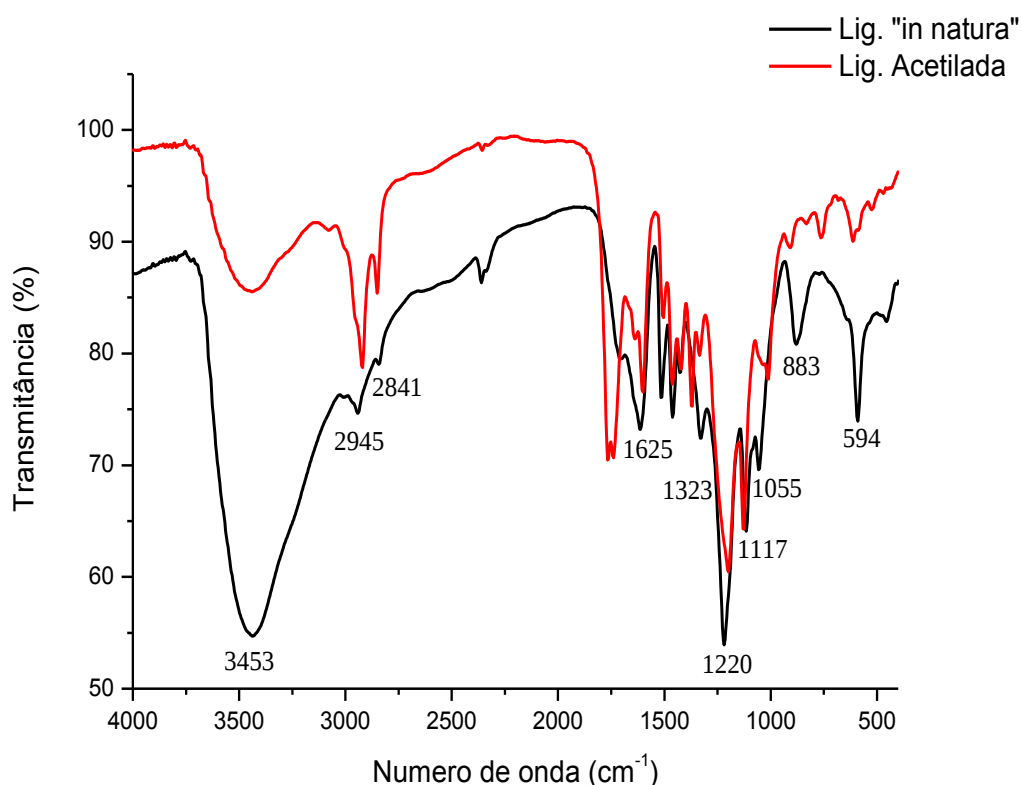


FONTE: Autor, (2015).

5.4.2. Espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier FT-IR

A Figura 34 e o Apêndice I (Figuras I.2 e I.3) mostram os espectros de FT-IR para as ligninas “in natura” e acetilada respectivamente. Os espectros de FT-IR da lignina foram analisados de acordo com os dados obtidos por Gabov (2014), Lin e Dence (1992), Sarkanen e Ludwig (1971), Adaganti et al., (2014) e segundo Ibarra e colaboradores (2005).

Figura 34. Espectroscopia de FT-IR das ligninas “in natura” e acetilada.



FONTE: Autor, (2015).

O espectro da lignina “in natura” apresentou uma banda larga em 3453 cm^{-1} correspondente ao estiramento do grupo OH. Na lignina acetilada esse sinal é bastante reduzido evidenciando que, a reação de acetilação converteu os grupos OH em OCOCH_3 . A banda em 2945 cm^{-1} corresponde ao estiramento C-H de alifáticos. A banda em 2841 cm^{-1} é relacionada a região de absorção do estiramento C-H de metila e/ou metileno, observa-se uma maior intensidade desse sinal no espectro da lignina acetilada, isto é, devido ao aumento da oxidação de lignina e a quantidade do grupo acetila. A absorção compreendida na região $1150\text{--}1170\text{ cm}^{-1}$ representa absorções características de C-O de grupos ésteres conjugados comuns em ligninas.

As bandas entre $1510\text{--}1610\text{ cm}^{-1}$, representam as vibrações do anel aromático das unidades guaiacila e siringila a razão entre suas intensidades (1,3/1 de G/S) (SARKANEN e LUDWIG, 1971). Em regiões abaixo de 1400 cm^{-1} as bandas apresentam maior complexidade devido a contribuição de vários modos de vibração, apresentando também vibrações específicas das diferentes unidades de monolignóis (LIN e DENCE, 1992). Na lignina “in natura” o sinal de 1323 cm^{-1} foi maior que o de 1220 cm^{-1} segundo Ibarra e

colaboradores (2005) a intensidade desses sinais para a lignina de eucalipto, correspondem às vibrações C-O dos anéis G e S, respectivamente é indicativo da maior quantidade desses grupos. Essa característica indica que a lignina isolada contém maiores proporções de unidades guaiacila que siringila (SARKANEN e LUDWIG, 1971).

Em 1117 e 1215 cm^{-1} , segundo Gabov e colaboradores, (2014) são características das vibrações de deformações C-H fora do plano dos anéis siringila e guaiacila substituído na posição 5, além das deformações C-H de aromáticas no plano das unidades siringila. O sinal em 883 cm^{-1} de acordo com Lin e Dence (1992), corresponde a deformação C-H de aromáticos vicinais fora do plano, esta banda representa as posições 5 e 6 das unidades guaiacila e posições das unidades p-hidroxifenila. Em 594 cm^{-1} está evidenciado o comportamento aromático das unidades fundamentais da lignina (ADAGANTI et al., 2014). Dessa maneira, como era de se esperar, a lignina contém as três subunidades (SGH). A Tabela 5 mostra outras bandas identificadas e as suas atribuições, de acordo com os trabalhos de Gabov et al., 2014 e Lin e Dence, 1992.

Tabela 5. Atribuições das bandas de absorção na região do infravermelho de grupos funcionais presentes em ligninas.

Faixa de Absorção (cm^{-1})	Atribuição
3490-3400	Estiramento OH
3000-2960	Estiramento C-H de aromático
3000-2840	Estiramento C-H de metila e/ou metileno
1735-1700	Estiramento C=O de cetonas não conjugada, carbonila em grupos ésteres e ácidos carboxílicos
1675-1650	Arilcetonas (C=O) conjugada
1593	C=O; S>G
1515-1505	Vibrações do anel aromático C=C para G>S
1470-1460	Deformação C-H (assimétrica) de grupos $-\text{CH}_2-$ e CH_3
1430-1415	Vibração C-C do anel aromático
1330	Vibração do anel siringílico com contribuição de estiramento C=O e de estruturas condensadas
1220	Vibração do anel guaiacílico com contribuição de estiramento de C-O e C-C em associação com estiramento de C=O
1085-1030	Deformações C-O de álcoois primários mais estiramento C-O não conjugado; Deformação C-H aromática no plano (G>S)
915-815	Deformação C-H aromática para fora do plano
840	Deformação de C-H de aromáticos vicinais fora do plano, nas posições 5 e 6 de unidades guaiacilas e nas posições 2, e 3; e 6 de unidades p-hidroxifenila
594	Deformação da estrutura do anel aromático das cadeias laterais, grupos substituídos e cadeias laterais

FONTE: Adaptado de Gabov et al. (2014) e Lin e Dence, (1992).

5.4.3. Espectroscopia de Ressonância Nuclear Magnética

A Tabela 6, e o Apêndice J (Figuras J.4, J.5 e J.6) apresentam o espectro de RMN ^{13}C assim como os tipos de carbono presentes na lignina acetilada, observados por Saliba, et al. (2001), Rutkowska, et al. (2008) e Namane; Sithole e Ramjugernath (2015).

Tabela 6. Atribuições dos sinais no espectro de RMN de ^{13}C .

Região do Espectro (ppm)	Tipos de Carbonos
200-220	Carbonilas
170-185	Carboxilas
100-160	Aromáticos
60-90	C-O alifáticos
50-57	Grupos Metoxílicos
5-40	Alifáticos

FONTE: adaptado de Saliba, et al. (2001), Rutkowska, et al. (2008) e Namane; Sithole e Ramjugernath (2015) Pimenta, Vital e Fujiwara (1997).

A maioria dos sinais obtidos para lignina acetilada neste trabalho, foram também previamente observados por Saliba, et al. (2001), Rutkowska, et al. (2008) e Namane; Sithole e Ramjugernath (2015) e WEN et al. (2013). Os sinais para os grupos γ - metil, α e β -metileno das cadeias laterais n-propil da lignina aparecem no espectro entre 13-40 ppm. Em 20,3-31,8 ppm podem ser atribuídos a grupos metil terminal, grupos metilenos de anéis alifáticos e grupos metilenos em longas cadeias alquílicas. Na região entre 46-53 ppm atribuída a C- β em unidades β - β e C- β em unidades β -5. Os grupos metoxila em unidades do tipo Siringila (S) e guaiacila (G), são atribuídos em torno de 56,1 ppm. Os sinais entre 76 a 78 ppm de referentes ao solvente CDCl_3 . Entre 106,2-107,7 ppm atribuído a C-2/C-6 em Siringila com α -CO, sinais entre 123,0-123,3 ppm C5 unidades guaiacílicas acetiladas (C α -OAc e -OR) e C β em unidades guaiacílicas acetiladas. O sinal em 121,8 ppm referente a C-1 e C-6 em Ar-C (=O) C-C. Em 124,6-124,7 ppm sinais atribuídos a Ácido p-cumárico e em 169,1-169,7 ppm e entre 170-173 ppm sinais atribuídos a CO em acetila aromática e a CO em acetila alifática.

As ligninas possuem alto peso molecular. Em solução, apresentam alta viscosidade e suas moléculas possuem pouca mobilidade (LIN e DENCE, 1992). Devido a essas características, apresenta sinais de ^1H RMN com baixa resolução. Embora alguns desses não estejam completamente resolvidos, a integração das regiões no espectro é utilizada para estimar o grau de substituição do anel aromático e os teores dos grupos funcionais hidroxilas alifáticas, aromáticas, metoxilas, entre outras (SALIBA, et al.,

2001). O Apêndice J (Figuras J.1, J.2 e J.3) e a Tabela 7 apresentam o espectro de ^1H RMN e as atribuições para lignina acetilada. A maioria dos sinais obtidos para lignina foram também previamente observados por Jahan, et al. (2012), Ventrone, et al. (2014) e Namane; Sithole e Ramjugernath (2015), ao caracterizarem ligninas.

Tabela 7. Atribuições dos sinais no espectro de RMN de ^1H da lignina acetilada de *Eucalyptus urograndis*.

δ (ppm)	Atribuição: Tipo de próton
9,70- 7,70	Prótons aromáticos orto a grupos carbonílicos Prótons formila em subestruturas do tipo cinamaldeído e benzaldeído
7,70-7,53	Prótons localizados orto a um grupo carbonílico em unidades benzaldeídicas
7,20-6,75	Prótons aromáticos em unidades guaiacílicas
6,75-6,40	Prótons aromáticos em unidades siringílicas
6,20-5,90	H α em unidades β -O-4 prótons vinílicos
5,90-5,30	H α em unidades β -5 de fenilculmarinas; H α de subestruturas α -O-4
5,25-4,2	H β em β -O-4 (forma erito); H α em pino- e siringorresinol H β em β -O-4 (forma tréo); prótons metilénicos em álcoois cinamílicos H γ em várias estruturas
3,5 - 4,0	Prótons metoxílicos
2,60-2,29	Acetatos aromáticos
2,29-1,70	Acetatos alifáticos
1,70-0,80	Região de prótons alifáticos não oxigenados

FONTE: Autor, (2015).

Os sinais com deslocamento químico na região de hidrogênios aromáticos, em torno de 7,00 ppm são atribuídos aos prótons do anel aromático dos alcoóis (p-cumarílico, coniferílico e sinapílico) bem como a prótons vinílicos. Os sinais em 6,7-6,8 ppm e 7,0 ppm são atribuídos aos prótons aromáticos em unidades propanosiringila e propanoguaiacila, respectivamente (JAHAN, et al., 2012).

Os prótons de cadeia lateral proveniente de unidades siringílicas na região 6,60 ppm. O mesmo foi observado com relação aos sinais na região 6,0-6,2 ppm que são de prótons vinílicos. Os hidrogênios ligados aos carbonos α e β apresentam sinais em 5,1 e 4,7 ppm, respectivamente. Os sinais em 4,2 e 4,4 ppm são representados pelos H γ de várias unidades da lignina. Observa-se em 3,65 ppm um sinal característico dos prótons da metoxila (VENTORIM, et al., 2014).

Sinais entre 3,1-3,20 ppm são característicos do H- β , em estruturas β — β . Os sinais em 1,60 ppm e em 2,60 ppm são originários de hidroxilas alifáticas e fenólicas, respectivamente. Os sinais <1,7 ppm são relacionados aos grupos CH_3 e CH_2 em cadeias alifáticas saturadas. O espectro de ^1H RMN também forneceu evidências da presença de

algumas subunidades de lignina (5-5'; β -O-4'; α -O-4') (NAMANE; SITHOLE e RAMJUGERNATH, 2015)

A lignina de *Eucalyptus urograndis* apresentou maior quantidade de grupos guaiacila em relação ao grupo siringila, corroborando assim com os dados obtidos pelo FT-IR.

5.4.4. Análise elementar da lignina “in natura” e acetilada

Na tabela 8, estão representados os resultados encontrados para a análise elementar da lignina “in natura” e acetilada de *Eucalyptus urograndis* (teores de carbono, hidrogênio, nitrogênio e oxigênio), os valores corroboram com aqueles obtidos por Silva et al. (2012) para ligninas de *Simarouba versicolor* e *Eucalyptus urograndis*.

Tabela 8. Dados da análise elementar de lignina da madeira de *Eucalyptus urograndis*.

Amostra	%C	%H	%N	%O
Lignina “in natura”	47,95 $\pm$ 0,35	6,20 $\pm$ 0,14	0,050 $\pm$ 0,07	45,85 $\pm$ 0,35
Lignina acetilada	52,50 $\pm$ 0,30	6,46 $\pm$ 0,04	0,045 $\pm$ 0,0	42,10 $\pm$ 0,36

FONTE: Autor, (2015).

A fórmula mínima da macromolécula foi obtida utilizando as equações 9, 10 e 11, com os resultados do percentual de metoxilas proveniente do espectro de RMN de ^1H e da análise elementar. A percentagem de metoxila foi determinada pela integração da área total, que corresponde a 100 unidades arbitrárias e está relacionada a 6,46 prótons. A integração da região das metoxilas no RMN de ^1H (δH 3,5-4,0) apresentou área de 18 unidades arbitrárias, sendo assim, o percentual de metoxilas representa 18% do total. Observa-se que a quantidade de grupos metoxilas está coerente com os dados encontrados para madeiras de folhosas que é de 18 a 22% (SALIBA, et al., 2001).

A expressão para a fórmula mínima C_9 da lignina foi a seguinte: $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{O}_{4,8}(\text{OCH}_3)_{1,37}$. Segundo Piló-Veloso et al. (1993), ligninas contendo menos que um mol de metoxilas por unidade C_9 (OCH_3/C_9) são do tipo guaiacila, quando essa relação for $> 1,0$ as ligninas são do tipo guaiacila-siringila. Portanto, a lignina *Eucalyptus urograndis* apresentou uma relação de 1,37(OCH_3/C_9) o que implica dizer que esta lignina é do tipo guaiacila-siringila.

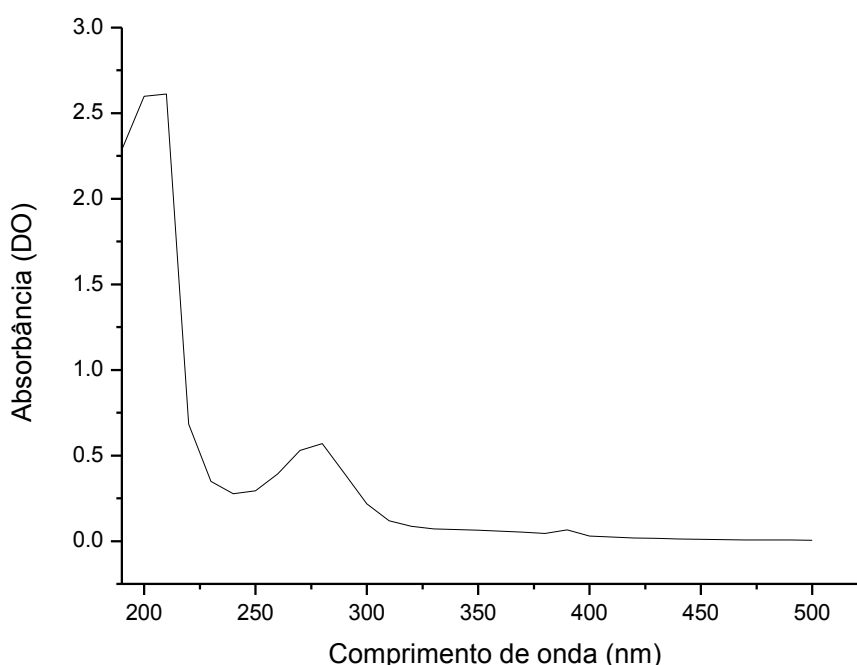
Verificou-se, ainda, que a relação entre esses grupos é proporcionalmente diferente, isto é, uma relação simples permite calcular a porcentagem de unidades

guaiacila, a partir do teor de metoxila (SALIBA, et al., 2001). O percentual de guaiacila na madeira é de 63%.

5.4.5. Espectroscopia de UV/Vis lignina de eucalipto “in natura”

A espectroscopia de UV/Vis é comumente utilizada para análise de lignina e isso é devido à sua natureza aromática (YUAN, HE, et al., 2009). A Figura 35 e o Apêndice K (Tabela K.2) mostram o espectro na região de absorção entre 190- 500 nm e os valores de absorbância da lignina “in natura”.

Figura 35. Espectro de UV/Vis da lignina de *Eucalyptus urograndis* “in natura”.

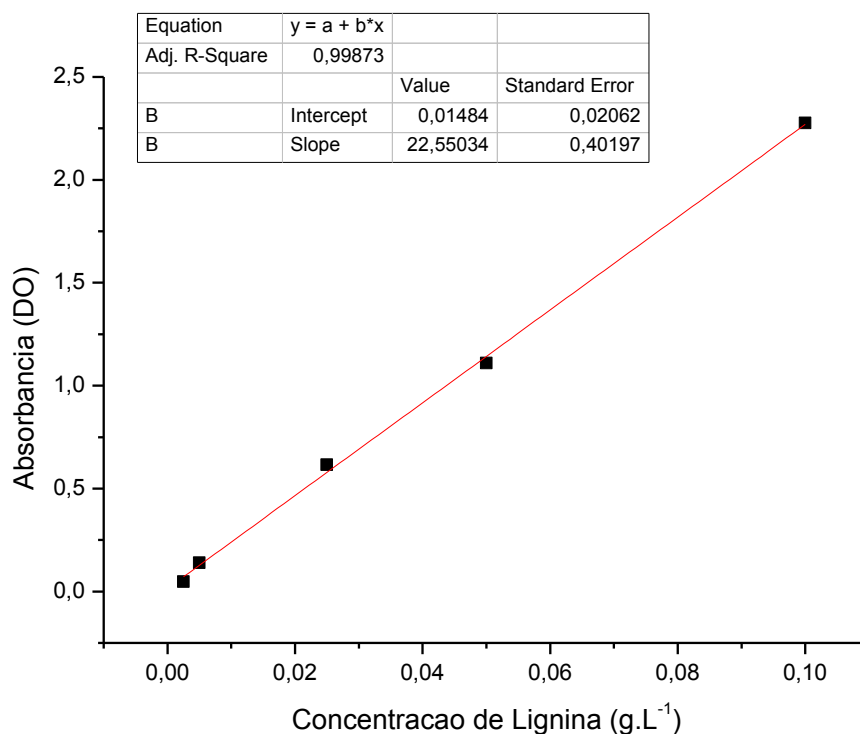


FONTE: Autor, (2015).

Os resultados obtidos na Figura 35, corroboram com aqueles obtidos por Varanasi e colaboradores (2012), Zhou, Taylor, Polle, (2011) e Lin e Dence (1992) estudando ligninas. O pico de máxima absorção geralmente encontrado em torno de 280 nm, correspondente à transição eletrônica $\pi \rightarrow \pi^*$ no anel aromático, típico de ligninas. Esse deslocamento batocrômico evidencia alto teor de unidades G. As ligninas do tipo S apresentam máximos de absorção na região de 268-276 nm. A absorção que ocorre a 310–320 nm é indicativa da presença de unidades do tipo H e em

320 nm ocorre a absorção das unidades $-\text{CH}=\text{CHCOOH}$. A lignina de *Eucalyptus urograndis* apresentou pico máximo entorno de 281 nm. A Figura 36 e o apêndice K (Tabela K.1.) mostram a curva de absorbância por concentração da lignina afim de determinar a absorvidade da lignina.

Figura 36. Curva analítica absorbância x concentração de lignina de *Eucalyptus urograndis* “in natura”.



FONTE: Autor, (2015).

O valor obtido para a absorvidade foi de $22,55 \text{ L} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Varanasi e colaboradores (2012) e Zhou, Taylor, Polle, (2011) obtiveram para *Eucalyptus globulus* valores de $20,09 \text{ L} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Essa diferença está associada ao grau de condensação e substituição dessas ligninas. De acordo com Lin e Dence (1992) quanto maior for a quantidade de anéis substituídos maior absorvidade em 280 nm.

6. CONCLUSÃO

Através do presente trabalho pôde-se confirmar que:

- O processo de pré-tratamento hidrotérmico seguido de deslignificação alcalina se mostrou bastante eficiente, apresentando taxas de remoção de hemicelulose e lignina elevadas, tendo como resultado uma celulose mais pura. Essa alta eficiência durante o processo garantiu taxas de conversão enzimática da fração celulósica em glicose mais alta.
- As análises morfológica e estrutural dos cavacos de eucalipto comprovaram que ao decorrer do processo ocorreu aumento no índice de cristalinidade da celulose e modificação estrutural da biomassa.
- O hidrolisado hemicelulósico apresentou alta concentração de moléculas de interesse industrial, podendo ser utilizado para a obtenção de bioprodutos, como por exemplo o etanol.
- As análises de caracterização química da lignina, permitiram verificar que a molécula é do tipo HGS, com predominância das unidades G. Os resultados obtidos indicam que se trata de uma lignina bastante condensada.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realizar Ressonância Nuclear Magnética de ^{13}C CP/MAS (estado sólido) nos cavacos de eucalipto “in natura”, submetidos a pré-tratamento hidrotérmico e a deslignificação alcalina, afim de detectar e quantificar mudanças estruturas ocorridas durante o processo.
- Produção de enzimas a partir do hidrolisado, obtido na etapa de pré-tratamento hidrotérmico, principalmente enzimas xilanolíticas.
- Utilização da celulignina e da biomassa deslignificada para produção de enzimas de interesse industrial, principalmente celulasas.
- Caracterização química dos extrativos obtidos em ciclohexano:etanol, com a finalidade de utilizar essas moléculas, para obtenção de produtos de alto valor agregado.

8. REFERENCIAS

ADAGANTI, S. Y.; KULKARNI, B. M.; DESAI, G. P.; SHANMUKHAPPA, S. Isolation and characterization of lignin obtained from *Calliandra calothyrsus shrub* using FT-IR spectroscopy. **International Journal of Current Engineering and Technology**, v.4, n.2, 2014.

AGROTECA TANABI. Disponível em: http://www.agrotecatanabi.com.br/Vendasmudas_eucalipto.html005>. Acesso em: 04 de Abril de 2015.

ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. **Clonagem e Doenças do Eucalipto**. Viçosa: UFV, p. 442, 2004

ALLEN, S. G.; SCHULMAN, D.; LICHWA, J.; ANTAL JR.; LASER, M.; LYND, R. A. Comparison between hot liquid water and steam fractionation of corn fiber. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.40, p. 2934-2941, 2001.

ALLEN, S.G.; KAM, L.C.; ZEMANN, A.J.; ANTAL, M.J. Fractionation of sugar cane with hot compressed liquid water. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 35, p. 2709-2715, 1996.

ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4851-4861, 2010.

AMS. **Associação mineira de silvicultura**. Estatísticas. Disponível em: <http://www.silviminas.com.br>>. Acesso em: 04 de Abril de 2015.

ATTALA, R.H.; The structure of native cellulose. In: Proceedings of Tricel Simposion on *Trichoderma reesei* Cellulases and others Hydrolases. Helsinquia: **Fundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research**, v. 8, p. 281-290, 1993.

BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**, v. 52 p. 858–875, 2011.

BALLESTEROS, M; OLIVA, J.M.; NEGRO, M. J.; MANZANARES, P; BALLESTEROS, I. Ethanol from lignocellulose materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. **Process Biochemistry**, v.39, p.1843-1848, 2004.

BARROSO, D. G.; CARNEIRO, J. G. A.; NOVAES, A. B.; LELES, P. S. S. Efeitos do recipiente sobre o desempenho pós-plantio de *Eucalyptus camaldulensis* Dehn e *E. urophylla* S.T. Blake. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 24, n. 3, p. 291-296, 2000.

BASTOS, V.D. **Etanol, Alcoolquímica e Biorrefinarias**. BNDES Setorial, Rio de Janeiro, n.25, p. 5-38, 2007.

BERGERON, C.; CARRIER, D.J.; RAMASWAMY, S., Biorefinery Co-Products: Phytochemicals, Primary Metabolites and Value-Added Biomass Processing, **John Wiley & Sons**, p. 287-310, 2012.

BHAT, K. M.; BHAT, K. V.; DHAMODARAN, T. K. Wood density and fibre length of *Eucalyptus grandis* grown in Kerala, India. **Wood and Fibre Science**, v. 22, n. 1, p. 54-61, 1990.

BINOD, P.; JANU, K. U.; SINDHU, R.; PANDEY, A. Hydrolysis of lignocellulosic biomass for bioethanol production. **Biofuels: alternative feedstocks and conversion processes**, p. 229-250, 2011.

BOBLETER, O. Hydrothermal degradation of polymers derived from plants. **Progress in Polymer Science**, v. 19, p. 797-841, 1994.

BRACELPA. **Associação Brasileira de Celulose e Papel**. Disponível em: <<http://www.bracelpa.org.br>>. Acesso em: 10 set, 2015.

BRETT, C.; WALDRON, K.W. **Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls**. Hyman, London Unwin, p. 75-111, 1990.

CANETTIERI, E. V., ALMEIDA E SILVA, J. B.; FELIPE, M. G. A. Obtenção biotecnológica de xilitol a partir de cavacos de eucalipto. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 3, p. 323-331, 2002.

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

CAO, Y.; TAN, H. Effects of cellulose on the modification of cellulose. **Carbohydrate Research** v. 337, p. 19291-19296, 2002.

CARA, C.; RUIZ, E.; BALLESTEROS, I.; NEGRO, M.J; CASTRO, E. Enhanced enzymatic hydrolysis of olive tree wood by steam explosion and alkaline peroxide delignification. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 423-429, 2006.

CGEE- CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS. **Química Verde no Brasil: 2010-2030**, 2010.

CHAVES, L. **Os 12 países que mais produzem celulose no mundo**, 2012. Disponível em: <http://www.painelflorestal.com.br/noticias/celulose-e-papel/os-12-maiores-produtores-de-celulose-do-mundo> . Acesso em: 11 nov. 2015.

CHRISTOPHER LP; YAO B; JI Y. Lignin biodegradation with laccase-mediator systems. **Frontiers in Energy Research**, v. 2, p. 12, 2014.

CONVERSE, A. O.; WARE, W. On the reactivity of cellulosic substrates in enzymatic hydrolysis. In **IEA, BIOFOR- WORKSHOP ON APLICATIONS OF BIOTECHNOLOGY IN BIOENERGY SISTEMS**, 1994. Ottawa. Canadá.

COSTA, E.M. A madeira do eucalipto na indústria moveleira. Curitiba: **Anais do IV SEMADER**, 1996.

DE JONG, E., VAN REA, R., VAN TUIL, R.; ELBERSEN, W. Biorefineries for the chemical industry—An Dutch point of view. **Biorefineries-Industrial Processes and Products: Status Quo and Future Directions**, p. 85-111, 2006.

DONALDSON, L. A. Review: Lignification and lignin topochemistry - A ultrastructural view. **Phytochemistry**, n 57,p. 859-873, 2001.

DRIEMEIER, C.; PIMENTA, M. T.; ROCHA, G. J.; OLIVEIRA, M. M.; MELLO, D. B.; MAZIERO, P.; GONCALVES, A. R. Evolution of cellulose crystals during prehydrolysis and soda delignification of sugarcane lignocellulose. **Cellulose**, v. 18, n. 6, p. 1509-1519, 2011.

DUTZ, M. A.; SHARMA, S. Green growth, technology and innovation. **World Bank Policy Research Working Paper**, n. 5932, 2012.

EMMEL, A.; MATHIAS, A. L.; WYPYCH, F.; RAMOS, L. P. Fractionation of *Eucalyptus grandis* chips by dilute acid-catalysed steam explosion. **Bioresource Technology**, v. 86, n. 2, p. 105-115, 2003.

FENGEL, D.; WEGENER. Wood, chemistry, ultrastructure, reactions. New York: **Waster de Gruyter**, p. 613, 1984.

FERNANDO, S.; ADHIKARI, S.; CHANDRAPAL, C.; MURALI, N. Biorefineries: current status, challenges, and future direction. **Energy & Fuels**, v. 20, n. 4, p. 1727-1737, 2006.

FIBRIA, <<http://www.fibria.com.br/institucional/quem-somos/>>Acesso em: 20 set, 2015.

FREUDENBERG, K.; NEISH, A.C. **The constitution and biosynthesis of lignin**. Berlin: Springer-Verlag, p. 129, 1968.

GABOV, K.; GOSSELINK, R. J.; SMEDS, A. I.; FARDIM, P. Characterization of lignin extracted from birch wood by a modified hydrotropic process. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 44, p. 10759-10767, 2014.

GARROTE, G.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJO, J. C. Interpretation of deacetylation and hemicellulose hydrolysis during hydrothermal treatments on the basis of the severity factor. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 1067-1073, 2002.

GOMIDE, J.; FANTUZZI, H.; REGAZZI, A. Análise de critérios de qualidade da madeira de eucalipto para produção de celulose kraft. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 34, n. 2, p. 339-344, abr. 2010.

GONZALEZ, R.; TREASURE, T.; WRIGHT, J.; SALONI, D.; PHILLIPS, R.; ABT, R.; JAMEEL, H. Exploring the potential of eucalyptus for energy production in the Southern United States: financial analysis of delivered biomass. Part I. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 2, p. 755-766, 2011.

GOUVEIA, E. R.; NASCIMENTO, R. T.; SOUTO-MAIOR, A. M.; ROCHA, G. J. M. Validação de Metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1500-1503, 2009.

GRAY, K. A.; ZHAO, L.; EMPTAGE, M. Bioethanol. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, p. 141-146, 2006.

GUO, G.; HSU, D.; CHEN, W.; CHEN, W.; HWANG, W. Characterization of enzymatic saccharification for acid-pretreated lignocellulosic materials with different lignin composition. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, p. 80 – 87, 2009.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Biouresource Technology**, v. 100, p.10-18, 2009.

IBPBB. INSTITUTO BRASILEIRO PELLETS BIOMASSA BRIQUETES. Disponível em: <<http://abibbrasil.wix.com/institutobrpellets#!licor-negro/c1b wa>>. Acesso em: 06 set. 2015.

IBARRA, D.; JOSÉ, C., GUTIÉRREZ, A.; RODRÍGUEZ, I. M.; ROMERO, J.; MARTÍNEZ, M. J.; MARTÍNEZ, Á. T. Chemical characterization of residual lignins from eucalypt paper pulps. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 74, n. 1, p. 116-122, 2005.

JAHAN, M. S.; LIU, Z.; WANG, H.; SAEED, A.; NI, Y. Isolation and characterization of lignin from prehydrolysis liquor of kraft-based dissolving pulp production. **Cellulose Chemistry and Technology**, v. 46, n. 3-4, p. 261-267, 2012.

JUNIOR, L.C.D.S.F; MIRANDA, C.S; JOSE, N.M. Prospecção tecnológica sobre as composições de derivados de celulose e celulose na área medicina. **Cadernos de Prospecção**, v.6, n.2, p.181, 2014.

KAMM, B.; GRUBER, P.R.; KAMM, M. Biorefineries – Industrial Processes and Products. **Wiley-VCH**, ISBN: 3-527-31027-4, Weinheim, Germany, 2006.

KOBAYASHI, H.; FUKUOKA, A. Synthesis and utilization of sugar compounds derived from lignocellulosic biomass. **Green Chemistry**, v.15, n. 7, p. 1740-1763, 2013.

LENZ, B.L. Application of nuclear magnetic resonance spectroscopy to characterization of lignin. **Tappi**, v.13, p. 363-369, 1968.

LIGNIN SYSTEMS: Lignin Biosynthesis. Disponível em: <https://brcwebportal.cos.ncsu.edu/lignin/Lignin_Biosynthesis> . Acesso em: 06 set. 2015.

LIMA, A. F.; ASSUMPÇÃO, R. M. V. Pré-hidrólise da madeira: influência de algumas variáveis. **O Papel**, São Paulo, v. 43, n. 8, p. 39-50, 1982.

LIMA, M. A.; LAVORENTE, G. B.; DA SILVA, H. K.; BRAGATTO, J.; REZENDE, C. A.; BERNARDINELLI, O. D.; POLIKARPOV, I. Effects of pretreatment on morphology, chemical composition and enzymatic digestibility of eucalyptus bark: a potentially valuable source of fermentable sugars for biofuel production - part 1. **Biotechnol Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 75, 2013.

LIN, S. Y.; DENCE, C. W. **Methods in lignin chemistry**. Springer, 1992.

MARTINS, I. S.; CRUZ, C. D.; ROCHA, M. D. G.; REGAZZI, A. J. J.; PIRES, I. E. Comparação entre os processos de seleção entre e dentro e o de seleção combinada, em progênes de *Eucalyptus grandis*. **Cerne**, v. 11, n. 1, p. 16-24, 2005.

MOKFIENSKI-AL, A.; GOMIDE, J. L.; COLODETTE, J. L.; OLIVEIRA, R. C. Importância da densidade e do teor de carboidratos totais da madeira de eucalipto no desempenho da linha de fibra. **In: Colóquio internacional sobre celulose kraft de eucalipto**. Viçosa. p.15-38, 2003.

MORAIS, S.A.L.; NASCIMENTO, E.A.; MELO, D.C. Chemical analysis of *Pinus oocarpa* wood. Part I. Quantification of macromolecular components and volatile extractives. **Revista Árvore**, v. 29, n. 3, p. 461-470, 2005.

MORI, F. A; MENDES, L. M; TRUGILHO, P.F; CARDOSO, M.G. Utilização de eucaliptos e madeiras nativas no armazenamento da aguardente de cana de açúcar. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 3, p. 396-400, 2003.

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

NAMANE, M., SITHOLE, B. B., & RAMJUGERNATH, D. Centrifugal washing and recovery as an improved method for obtaining lignin precipitated from South African kraft mill black liquor. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 74, p. 571-576, 2015.

NUNES, C. A., LIMA, C. F., BARBOSA, L. C. A., COLODETTE, J. L., & FIDÊNCIO, P. H. Determinação de constituintes químicos em madeira de eucalipto por Pi-CG/EM e calibração multivariada: Comparação entre redes neurais artificiais e máquinas de vetor suporte. **Química Nova**, v. 34, n. 2, p. 279-283, 2011.

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

ÖHGREN, K.; BURA, R.; SADDLER, J.; ZACCHI, G. Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2503-2510, 2007.

ONDREY, G. The path to biorefineries. **Chemical Engineering**, v. 113 n.4, 2006.

OVEREND, R. P.; CHORNET, E.; GASCOIGNE, J. A. Fractionation of lignocellulosics by steam-aqueous pretreatments. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 321, n. 1561, p. 523-536, 1987.

PAN, X.; XIE, D.; GILKES, N.; GREGG, D.J.; SADDLER, J.N. Strategies to enhance the enzymatic hydrolysis of pretreated softwood with high residual lignin content. In: **Twenty-Sixth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals**. Humana Press, p. 1069-1079, 2005.

PEREIRA, N.; COUTO, M. A. P. G.; SANTA A. L. M. M. Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery. **Series on Biotechnology**, v. 2, p. 2-45, 2008.

PEREZ, D. D. S.; CURVELO, A. A. S.; DEL R, J. C. Selective acetone-water delignification of *Eucalyptus urograndis*: an alternative towards the biorefinery approach. **The Open Agriculture Journal**, v. 4, n. 2, p. 145-152, 2010.

PILÓ V. D.; NASCIMENTO, E.A.; MORAIS, S.A.L. Isolamento e análise estrutural de ligninas. **Química Nova**, v. 16, p. 435-448, 1993.

PIMENTA, A. S.; VITAL, B. R.; FUJIWARA, F. Y. Alcatrão ou creosoto de eucalipto na produção de adesivos fenólicos para colagem de madeira. **Química Nova**, v. 20, n. 4, p. 365, 1997.

PINTO, D. S.; RESENDE, R. T.; MESQUITA, A. G. G.; ROSADO, A. M.; CRUZ, C. D. Seleção precoce para características de crescimento em testes clonais de *Eucalyptus urophylla*. **Scintia Forestali**, v. 42, n. 102, p. 251-257, jun. 2014.

PITARELO, A. P. Avaliação da Susceptibilidade do Bagaço e da Palha de Cana-de-açúcar à Bioconversão via Pré-tratamento a Vapor e Hidrólise Enzimática. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, p. 142, 2007.

PORTAL DO REFLORESTAMENTO: Disponível em: <http://www.portaldoreflorestamento.com.br> >. Acesso em: 05 out. 2015.

PURE LIGNIN. Disponível em: <http://purelignin.com/lignin> >. Acesso em: 05 out. 2015.

QI, B.; CHEN, X.; SHEN, F.; SU, Y.; WAN, Y. Optimization of enzymatic hydrolysis of wheat straw pretreated by alkaline peroxide using response surface methodology. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 48, n. 15, p. 7346-7353, 2009.

QUILHÓ, L. F. T. L., Produção de Bioetanol a partir de Materiais Lenho-celulósicos de Sorgo Sacarino. **Dissertação de mestrado**, Faculdade de Ciência e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2011.

RAGAUSKAS, A. J.; BECKHAM, G. T.; BIDDY, M. J.; CHANDRA, R.; CHEN, F.; DAVIS, M. F.; WYMAN, C. E. Lignin valorization: improving lignin processing in the biorefinery. **Science**, v. 344, n. 6185, p. 1246843, 2014.

RAGAUSKAS, A. J.; WILLIAMS, C. K.; DAVISON, B. H.; BRITOVSEK, G.; CAIRNEY, J.; ECKERT, C. A.; FREDERICK Jr, W. J.; HALLETT, J. P.; LEAK, D. J.; LIOTTA, C. L.; MIELENZ, J. R.; MURPHY, R.; TEMPLER, R.; TSCHAPLINSKI, T. The Path Forward for Biofuels and Biomaterials. **Science**, v. 311, p. 484-489, 2006.

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

ROCHA, G. J. M. Deslignificação de Bagaço de Cana de Açúcar Assistida por Oxigênio, **Tese de Doutorado**. São Carlos, SP: Universidade Federal de São Carlos, 2000.

ROCHA, G. J. M.; NASCIMENTO, V. M.; SILVA, V. F. N. Enzymatic bioremediation of effluent from sugarcane bagasse soda delignification process. **Waste and Biomass Valorization**, v. 5, n. 6, p. 919-929, 2014.

ROCHA, G. J. M.; MARTIN, C.; SILVA, V. F. N.; OLIVAREZ, E. G.; GONÇALVES, A. R. Mass balance of pilot-scale pretreatment of sugarcane bagasse by steam explosion followed by alkaline delignification. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 447-452, 2012.

ROCHA, G. J. M.; MARTIN, C.; SOARES, I. B.; SOUTO-MAIOR, A. M.; BAUDEL, H. M.; ABREU, C. A. M. Dilute mixed-acid pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 663-670, 2011.

RODRIGUES, J.A.R. Do engenho à biorrefinaria. A indústria de açúcar como empreendimento industrial para a geração de produtos bioquímicos e biocombustíveis. **Química Nova**, Campinas, 2011.

ROGALINSKI, T.; INGRAM, T.; BRUNNER, G. Hydrolysis of lignocellulosic biomass in water under elevated temperatures and pressures. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.47, p.54-63, 2008.

ROMANÍ, A.; RUIZ, H. A.; PEREIRA, F. B.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Integrated approach for effective bioethanol production using whole slurry from autohydrolyzed Eucalyptus globulus wood at high-solid loadings. **Fuel**, v. 135, p. 482-491, 2014.

RUTKOWSKA, E. W.; WOLLBOLDT, P.; ZUCKERSTAETTER, G.; WEBER, H. K.; SIXTA, H. Characterization of structural changes in lignin during continuous batch kraft cooking of *Eucalyptus globulus*. **BioResources**, v. 4, n. 1, p. 172-193, 2008.

SALIBA, E. O. S.; RODRIGUEZ, N. M.; MORAIS, S. D.; PILÓ-VELOSO, D. Ligninas: métodos de obtenção e caracterização química. **Ciência rural**, v. 31, n. 5, p. 917-928, 2001.

SÁNCHEZ, O. J.; CARDONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v.99, p.5270–5295, 2008.

SANDERS, J. P. M.; CLARCK, J. H.; HARMSSEN, G. J.; HEERES, H. J.; HEIJNEN, J. J.; KERSTEN, S. R. A.; VAN SWAAIJ, W. P. M.; MOULIJN, J. A. Process intensification in the future production of base chemicals from biomass. **Chemical Engineering and Processing**, v. 51, p. 117-136, 2012.

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

SANTOS, M. F. R. F. Elaboração da Technology Roadmap para Biorrefinaria de Produtos da Lignina no Brasil. **Tese de Doutorado**. Escola de Química Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2011.

SARKANEN, K. V; LUDWIG, C. H.; Lignins: Occurrence, formation, structure and reactions. New York, John Wiley, 916, 1971.

SARKAR, N.; GHOSH, S. K.; BANNERJEE, S.; AIKAT, K. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**, v, 37, p. 19-27, 2012.

SARKO, A. Recent X-ray crystallographic studies of celluloses. In: YOUNG, R. A; ROWELL, R. M. Eds. **CELLULOSE - STRUCTURE, MODIFICATION AND HYDROLYSIS**, John Wiley, New York, USA, p. 29-50, 1986.

SCANDINAVIAN PULP, PAPER AND BOARD. SCAN-C40:94: Wood chips for pulp production. **Stockholm, Sweden**, p. 4 1994.

SCHUCHARDT, U.; RIBEIRO, M.L.; GONÇALVES, A. R. A indústria petroquímica no próximo século: como substituir o petróleo como matéria-prima. **Química nova**, v. 24, n.2, p. 247-251, 2001.

SELVENDRAN, R.R. **The chemistry of plant cells walls**. In: **Birch**. G.G.; PARKER, K.J. (Ed.). Dietary fiber. London; New York: Applied Sciences p, 95-147, 1983.

SHARMA, J. Development of Biotechnological Tools for the Genetic Improvement of selected elite clones of *Eucalyptus tereticornis* Sm. **Dissertation** Thapar Institute of Engineering and Technology, 2006.

SHI, J.; EBRIK, M.; WYMAN, C. Sugar yields from dilute sulfuric acid and sulfur dioxide pretreatments and subsequent enzymatic hydrolysis of switch grass. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 8930-8938, 2011.

SILVA, A. L. B. B. **Princípios Básicos de Ressonância Magnética Nuclear do Estado Sólido**. São Carlos, USP, p. 50, 2005.

SILVA, T. C. F.; GOMIDE, J. L.; SANTOS, R. B. Evaluation of Chemical Composition and Lignin Structural Features of *Simarouba Versicolor* Wood On Its Pulping Performance. **BioResources**, v. 7, n. 3, p. 3910-3920, 2012.

SILVEIRA, R. L. V. A. Evaluation of the nutritional status of Eucalyptus: visual and foliar diagnosis and their interpretation. In: GONÇÁLVEZ, J. L. M.; BENEDETTI, V. (Ed.). **Forest nutrition and fertilization**. Piracicaba: IPEF p, 85-111, 2004.

SJOSTROM, E. **Wood Chemistry: Fundamentals and applications**. London: Academic Press, 1981.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. **Laboratory Analytical Procedure (LAP)**. Issue Date: 4/25/2008. Technical Report NREL/TP – 510-42618.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D. Determination of Sugars, Byproducts, and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples. **Laboratory Analytical Procedure (LAP)**. Issue Date: 12/08/2006. Technical Report NREL/TP – 510-42623.

SLUITER, A.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. Determination of Extractives in Biomass. **Laboratory Analytical Procedure (LAP)**. Issue Date: 7/17/2005. Technical Report NREL/TP – 510-42619.

SOUTO, F; CALADO, V; PEREIRA J, Nei. Fibras de carbono a partir de lignina: uma revisão da literatura. **Matéria (Rio J.)**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 1, p. 100-114, 2015.

STREFFER, F. **Method for digesting a biomass comprising lignin together with cellulose and/or hemicellulose**. U.S. Patent n. 8,895,290, 2014.

SUN, S. N.; CAO, X. F.; SUN, S. L.; XU, F.; SONG, X. L.; JONES, G. L. Improving the enzymatic hydrolysis of thermo-mechanical fiber from *Eucalyptus urophylla* by a combination of hydrothermal pretreatment and alkali fractionation. **Biotechnol Biofuels**, v. 7, p. 116, 2014.

SUZANO PAPEL E CELULOSE. <<http://www.suzanoblog.com.br/category/inovacao-2/>> Acesso em: 20 set, 2015.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, p. 1621-1651, 2008.

TALEBNIA, F.; KARAKASHEV, D.; ANGELIDAKI, I. Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4744-4753, 2010.

TRUGILHO, P. F. Classificação de clones de *Eucalyptus* sp visando a produção de polpa celulósica. **Revista Arvore** Viçosa, v.28, n.6, p.895-899, 2004.

UNEP – United Nations Environment Programme. Global trends in renewable energy investment. United Nations Environment Programme and Bloomberg New Energy Finance, 2011.

VARANASI, P.; SINGH, P.; ARORA, R.; ADAMS, P. D.; AUER, M.; SIMMONS, B. A.; SINGH, S .Understanding changes in lignin of *Panicum virgatum* and *Eucalyptus globulus* as a function of ionic liquid pretreatment. **Bioresource technology**, v. 126, p. 156-161, 2012.

VASCONCELOS, S. M.; SANTOS, A. M. P. ; ABREU, C. A. M. ; SOUTO-MAIOR, A. M. . Efeito de Surfactante na Hidrólise de Bagaço de Cana-de-Açúcar por Celulases de *Trichoderma reesei* RUT C-30. In: **XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2009, Natal. XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos**, v. Único. p. 1-6, , 2009..

VASCONCELOS, S.M; SANTOS A.M.P; ROCHA, G. J. M.; SOUTO-MAIOR, A. M. Diluted phosphoric acid pretreatment for production of fermentable sugars in a sugarcane-based biorefinery. **Bioresoucer technology**, n. 135, p 46-52, 2013.

VAZ JR., S. As biorrefinarias como oportunidade de agregar valor à biomassa. **Agroenergia em Revista**, Brasília - DF, v. 4, p. 11-12, 2012.

VENCOVSKY, R. **Genética quantitativa**. In: KERR, W.E. (Org). Melhoramento e genética. São Paulo: Melhoramento, p.17-38, 1969.

VENTORIM, G.; ALVES, E. F.; PENNA, L. S.; FRANCIS, R. C. Effect of s/g ratio on kraft pulping and ecf bleaching of some poplars and eucalyptus. **Cellulose Chemistry and Technology**, v. 48, n. 3-4, p. 365-373, 2014.

VILA, C.; ROMERO, J.; FRANCISCO, J.L.; GARROTE, G.; PARAJÓ, J.C., Extracting value from eucalyptus wood before kraft pulping: Effects of hemicelluloses solubilization on pulp properties, **Bioresource Technology**, v. 102, p. 5251-5254, 2011.

VISHTAL, A.; KRASLAWSKI, A. Challenges in industrial applications of technical lignins. **Bioresource**, v. 6, n. 3, p. 3547-3568, 2011.

WEN, J. L.; SUN, S. L.; XUE, B. L.; SUN, R. C. Recent advances in characterization of lignin polymer by solution-state nuclear magnetic resonance (NMR) methodology. **Materials**, v. 6, n. 1, p. 359-391, 2013.

WOOD, T. M.; SADDLER, J. N. Increasing the availability of cellulose in biomass materials. **Methods in Enzymology** v.160, p. 3-11, 1998.

XIAO, L. P.; LIN, Z.; PENG, W. X.; YUAN, T. Q.; XU, F.; LI, N. C.; SUN, R. C. Unraveling the structural characteristics of lignin in hydrothermal pretreated fibers and manufactured binderless boards from *Eucalyptus grandis*. **Sustainable Chemical Processes**, v. 2, p. 9-21, 2014.

XU, F.; YU, J.; TESSO, T.; DOWELL, F.; WANG, D. Qualitative and quantitative analysis of lignocellulosic biomass using infrared techniques: a mini-review. **Applied Energy**, v. 104, p. 801-809, 2013.

YU, Q.; ZHUANG, X.; YUAN, Z.; WANG, Q.; QI, W.; WANG, W.; XU, H. Two-step liquid hot water pretreatment of *Eucalyptus grandis* to enhance sugar recovery and enzymatic digestibility of cellulose. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4895-4899, 2010.

YU, Y.; LOU, X.; WU, H. Some recent advances in hydrolysis of biomass in hot-compressed water and its comparisons with other hydrolysis Methods. **Energy & Fuels**, v.22, p.46–60, 2008.

YUAN, T.I; HE, J; XU, F; SUN, R. C. Fractional and physico-chemical analysis of degraded lignins from black liquor or Eucalyptus pellita KP-AQ pulping. **Polymer degradation and stability**, v. 94, p. 1142-1150, 2009.

ZHANG, L.; LIU, Y.; NIU, X.; LIU, Y.; LIAO, W. Effects of acid and alkali treated lignocellulosic materials on cellulase/xylanase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30 and corresponding enzymatic hydrolysis. **Biomass and Bioenergy**, v. 37, p. 16-24, 2012.

ZHANG, Y. H. P. Percival. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 35, n. 5, p. 367-375, 2008.

ZHAO, X. B.; WAND, L.; LIU, D. H. Peracetic acid pretreatment of sugarcane bagasse for enzymatic hydrolysis: a continued work. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology** v. 83, p.950-956, 2006.

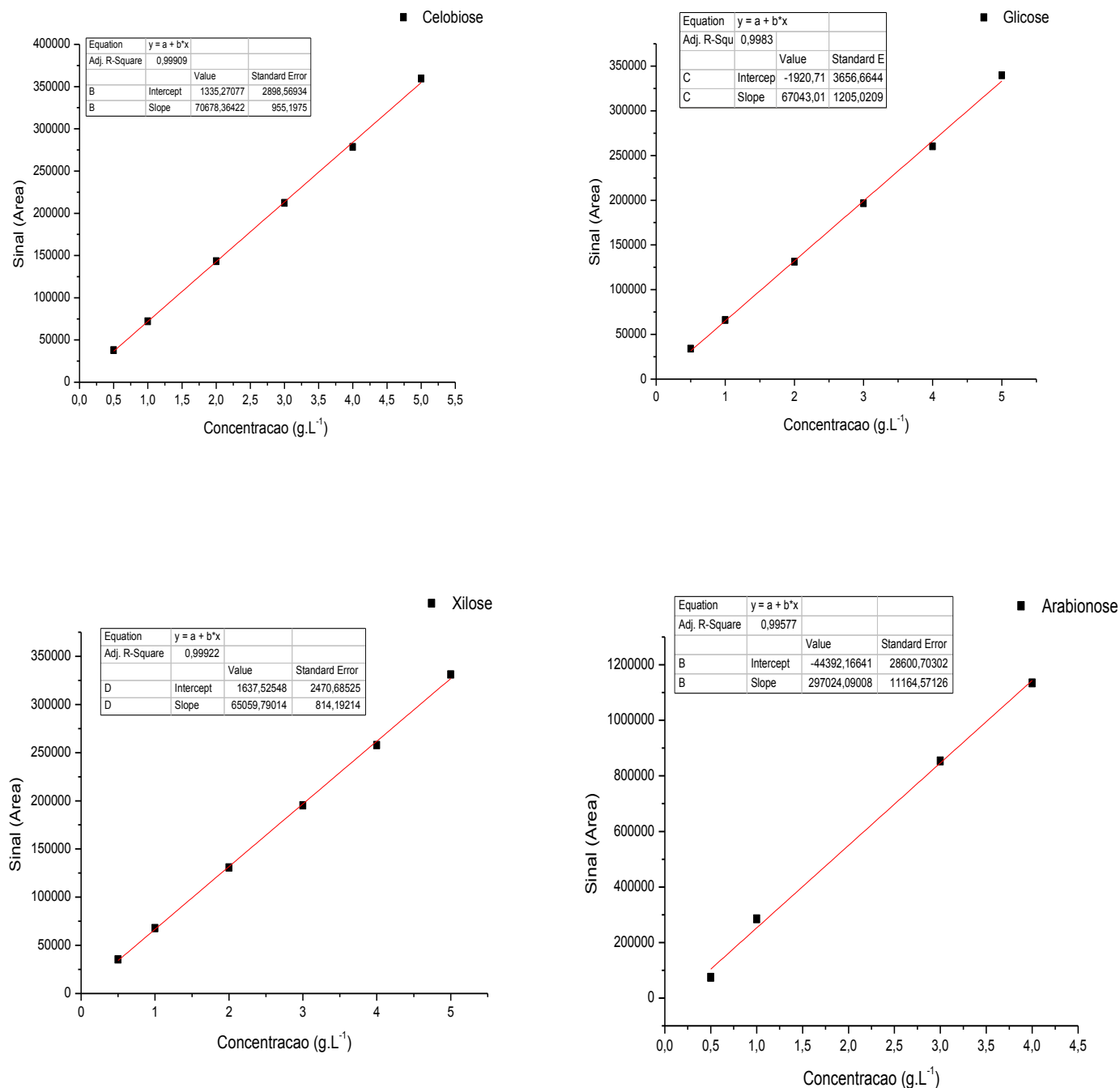
ZHENG, Y.; PAN, Z.; ZHANG, R., Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production, **Int J Agri&Biol Eng**, v. 2, n. 3, p. 51-68, 2009.

ZHOU, G.; TAYLOR, G.; POLLE, A. FT-IR-ATR-based prediction and modelling of lignin and energy contents reveals independent intra-specific variation of these traits in bioenergy poplars. **Plant Methods**, v. 7, n. 9, p. 9-19, 2011.

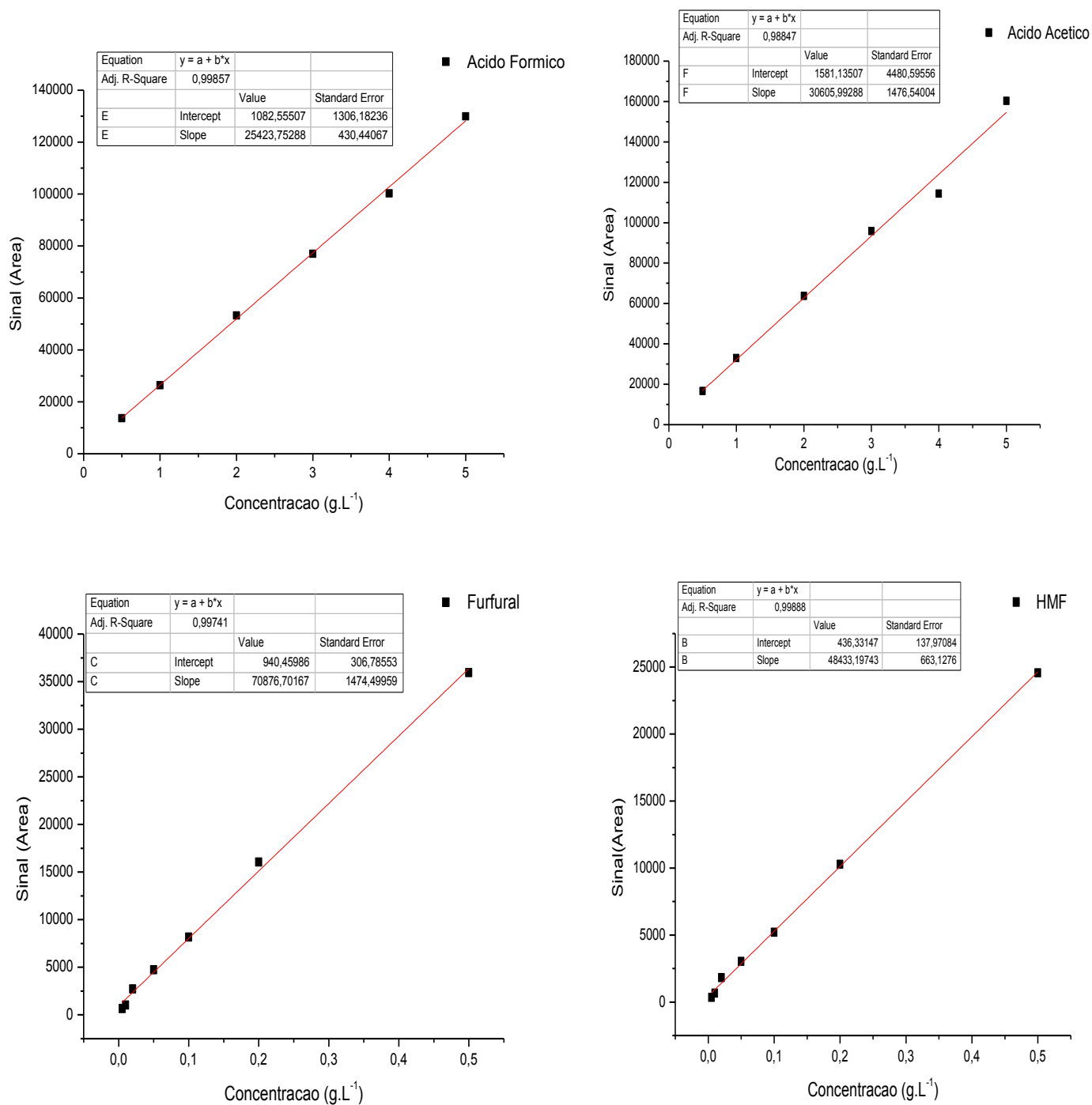
ZOBEL, B. J.; BUIJTENEN, J. P. **Wood Variation: It's Causes and Control**. Berlin: Springer Verlag, p. 363, 1989.

APÊNDICE A: CURVAS ANALÍTICAS E CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR CLAE PARA OS AÇÚCARES, ÁCIDOS ORGÂNICOS E PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

Figura A.1 Curva analítica de celobiose, glicose, xilose e arabionose



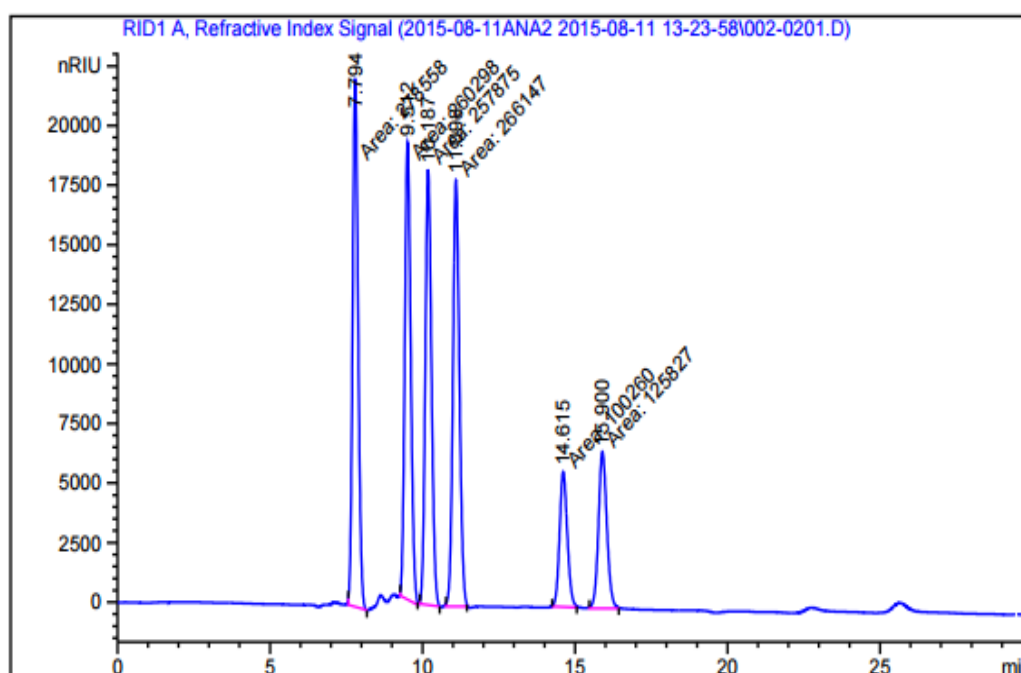
Fonte: Autor, 2015

Figura A.2 Curvas analítica de ácido fórmico, ácido acético, HMF e furfural.

Fonte: Autor, 2015

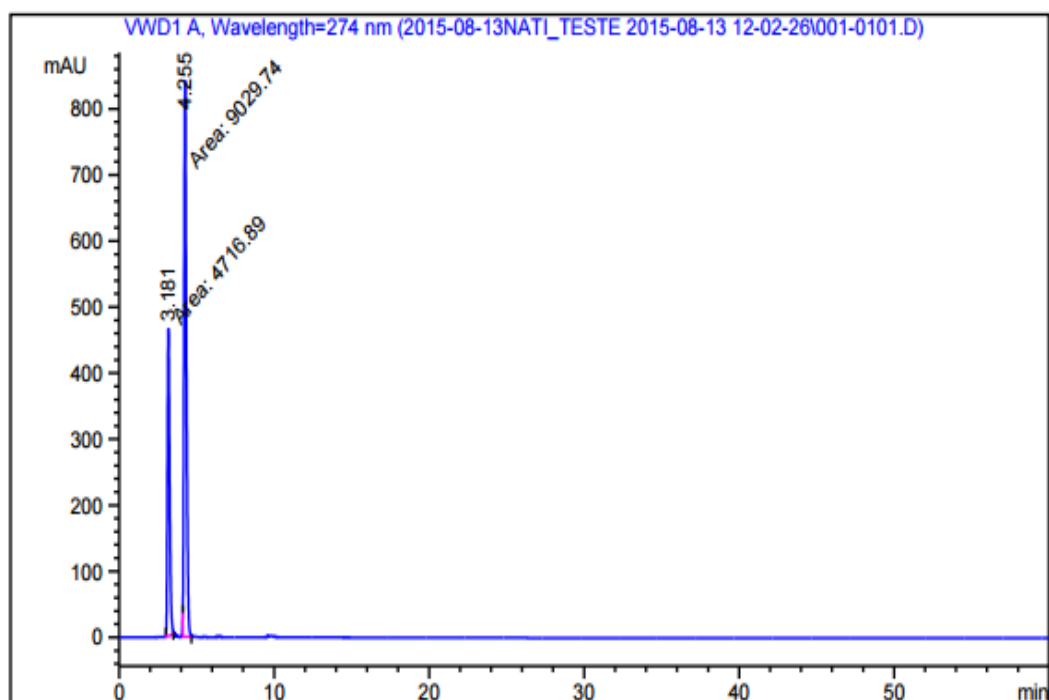
Cromatogramas obtidos para os açúcares, ácidos orgânicos e produtos de degradação são mostrados nas Figuras A.3 e A.4.

Figura A.3. Cromatogramas de açúcares e produtos de degradação: celobiose, glicose, xilose, arabionose, ácido fórmico e ácido acético respectivamente.



Fonte: Autor, 2015

Figura A.4. Cromatogramas de HMF e Furfural respectivamente.



Fonte: Autor, 2015

APÊNDICE B: RESULTADOS DA CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS CAVACOS DE EUCALIPTO “IN NATURA”

Tabela B.1. Peso seco e umidade.

Massas (g)	Medida	Medida	Medida	Medida		
Peso do alumínio	0,6393	0,6762	0,6453	0,5939		
Massa úmida	2,0017	2,0009	2,0002	2,007		
Peso do conjunto úmido	2,641	2,6771	2,6455	2,6009		
Peso do conjunto seco	2,4423	2,4523	2,4481	2,4123		
Massa seca (g)	1,803	1,7761	1,8028	1,8184	Média	Desvio pad.
% Umidade	9,93	11,23	9,87	9,40	9,90	0,789

Tabela B.2. Determinação de cinzas totais.

Código da amostra	Massa inicial (g)	Umidade (%)	Massa seca (g)	Massa de cinzas (g)	Cinzas (%)		
CN1	2,3161	9,9	2,0868061	0,0093	0,445	Media	Desvio
CN2	2,3235	9,9	2,0934735	0,0096	0,458	0,453	0,0091
CN3	2,3556	9,9	2,1223956	0,0095	0,447		
CN4	2,4356	9,9	2,1944756	0,0102	0,464		

Tabela B. 3. Determinação de Extrativos

Código da Amostra	Massa inicial (g)	Umidade (%)	Massa seca (g)	M. sem Extrativos (g)	Extrativos (%)	Fator	Média	Desvio
S1	5,0005	9,9	4,5055	4,24	5,31	0,951	4,92	0,422
S2	5,0007	9,9	4,5056	4,27	4,71			
S3	5,008	9,9	4,5122	4,3	4,24			
S4	5,0012	9,9	4,5061	4,25	5,12			

Tabela B.4. Determinação de lignina solúvel, insolúvel e total.

LIGNINA INSOLÚVEL								
Código da amostra	Massa papel de filtro (g)	Massas (papel, lignina e cinzas)	Massa de lignina + cinzas (g)	Massa de cinzas de lignina (g)	Massa de lig insolúvel (g)	Massa da amostra seca (g)	% lignina	Média
CN1	2,3161	2,974	0,6579	0,0026	0,6553	2,0018	32,74	26,32
CN2	2,3235	2,848	0,5245	0,0031	0,5214	2,002	26,04	Desvio
CN3	2,3563	2,857	0,5007	0,0035	0,4972	2,0015	24,84	1,63
CN4	2,3476	2,912	0,5644	0,0027	0,5617	2,001	28,07	
LIGNINA SOLÚVEL								
Código da amostra	Absorbância (280nm)	Diluição	Absorbância PD (280 nm)	Massa de lignina solúvel (g)	% Lignina solúvel	Media		
CN1	0,59219	20	4,59087	0,303352279	7,576987689	7,59		
CN2	0,57154	20	4,383	0,294763486	7,361725425	Desvio		
CN3	0,6013	20	4,384005	0,319642431	7,985071962	padrão		
CN4	0,58605	20	4,44288	0,304406984	7,60523121	0,259133698		

Tabela B. 5. Parâmetros de hidrólise ácida H₂SO₄ 72%.

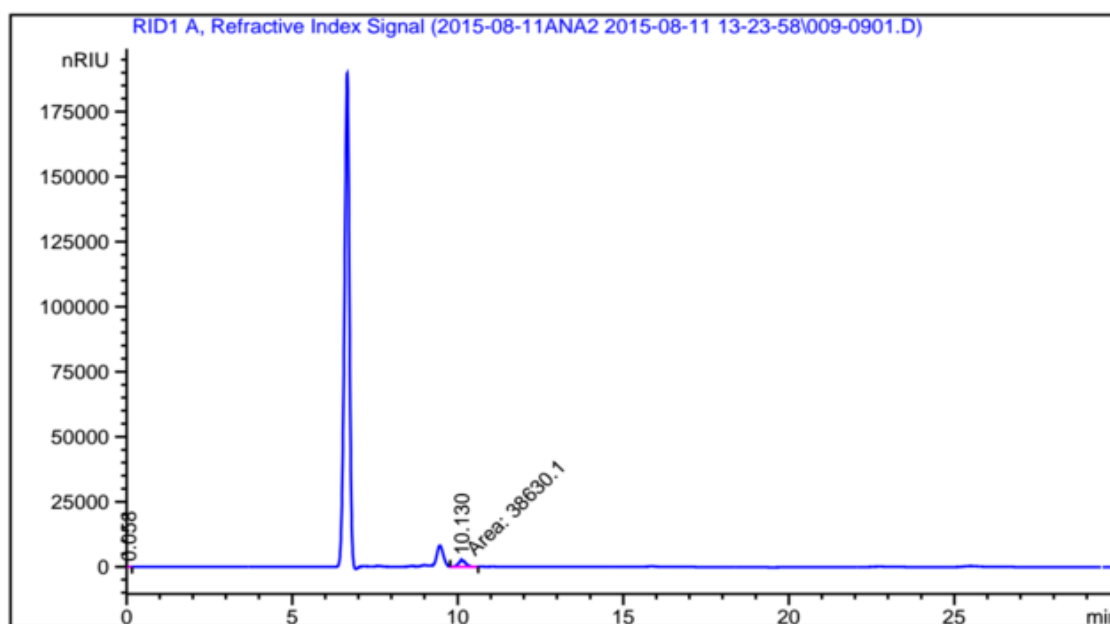
Código da Amostra	Massa inicial (g)	Umidade %	Massa seca (g)	Volume (L)	Media	Desvio pad.
CN1	2,0018	9,9	1,8036	0,5	1,8033515	0,000280132
CN2	2,002	9,9	1,8038	0,5		
CN3	2,0015	9,9	1,8034	0,5		
CN4	2,0013	9,9	1,8032	0,5		

Tabela B.6. Determinação dos açúcares, ácidos orgânicos, produtos de degradação, balanço do material juntamente com a composição percentual das macromoléculas.

Fatores de conversão	CELULOSE				HEMICELULOSE			
	0,9	0,95	3,52	1,29	0,88	0,90	0,72	1,37
Código da Amostra	Glicose (g·L ⁻¹)	Celobiose (g·L ⁻¹)	Ácido Fórmico (g·L ⁻¹)	HMF (g·L ⁻¹)	Xilose (g·L ⁻¹)	Arabinose (g·L ⁻¹)	Ácido acético (g·L ⁻¹)	Furfural (g·L ⁻¹)
CN1	1,634	nd	nd	0,00446	0,5633	nd	nd	0,0278
CN2	1,635	nd	nd	0,00444	0,567	nd	nd	0,0264
CN3	1,627	nd	nd	0,00432	0,565	nd	nd	0,0265
CN4	1,63	nd	nd	0,00445	0,568	nd	nd	0,0268
Código da Amostra	%	%	%	%				
	Glicose	HMF	Xilose	Furfural				
CN1	40,768	0,159	13,742	1,056				
CN2	40,789	0,159	13,831	1,003				
CN3	40,599	0,155	13,785	1,007				
CN4	40,678	0,159	13,860	1,018				
Media	40,723	0,159	13,808	1,012				
Desvio								
Padrao	0,087	0,002	0,052	0,024				
Código da Amostra	Lignina (%)	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Extrativos (%)	Cinzas Totais (%)			
CN1	40,31	40,93	14,80	5,31	0,45			
CN2	33,41	40,95	14,83	4,71	0,46			
CN3	32,83	40,75	14,79	5,31	0,45			
CN4	35,68	40,84	14,88	4,71	0,46			
Média	34,54	40,88	14,82	4,24	0,45			
Desvio								
Padrão	3,40	0,09	0,04	0,35	0,01			

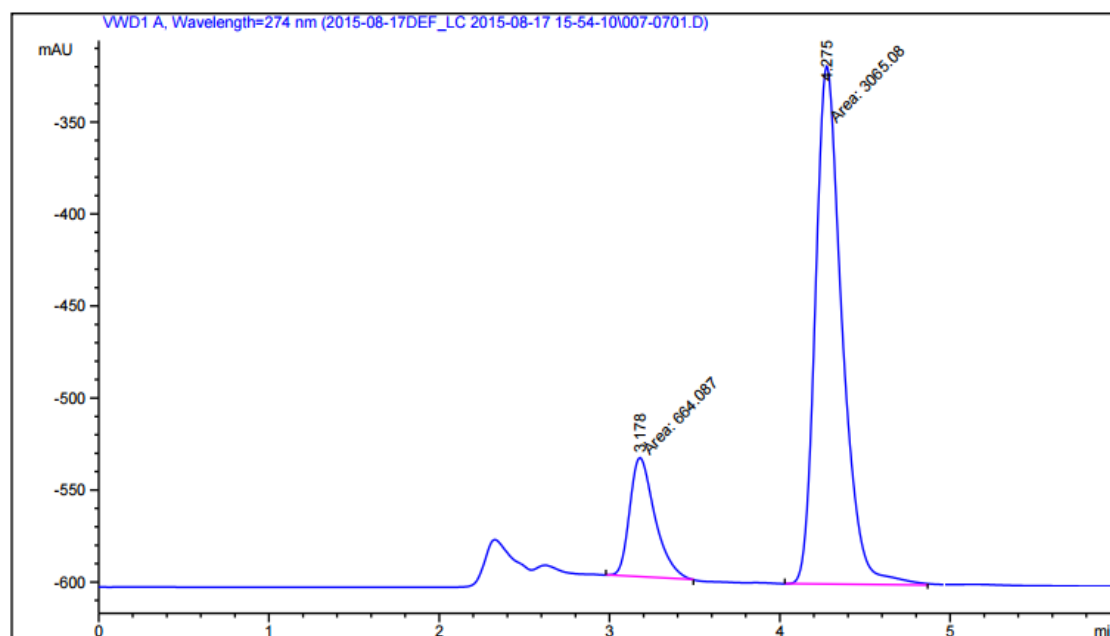
As Figuras B1 e B2 mostram os cromatogramas da caracterização das análises açúcares, ácidos orgânicos, produtos de degradação obtidos a partir da hidrólise ácida.

Figura B.1. Cromatograma para amostra “in natura” Açúcares.



Fonte: Autor, 2015

Figura B.2. Cromatograma para amostra “in natura” produtos de degradação HMF e furfural.



Fonte: Autor, 2015

APÊNDICE C: RESULTADOS DA CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS CAVACOS DE EUCALIPTO SUBMETIDOS A PRÉ-TRATAMENTO HIDROTÉRMICO

Tabela C.1. Peso seco e umidade.

Massa (g)	Medida 1	Medida 2		
Peso do alumínio	0,2878	0,3434		
Massa úmida	2,0051	2,00		
Peso do conjunto úmido	2,2929	2,3434	Média %U	Desvio padrão
Peso do conjunto seco	2,2538	2,2986	2,10	0,205
Massa seca	1,966	1,9552		
% Umidade	1,95	2,24		

Tabela C.2. Determinação de cinzas totais.

Código da amostra	Massa inicial (g)	Umidade (%)	Massa seca (g)	Massa de cinzas (g)	% Cinzas		
PT1	2,0022	2,10	1,960253635	0,0025	0,127	Média	Desvio
PT2	2,003	2,10	1,961036875	0,0028	0,142	0,135	0,0108

Tabela C.3. Parâmetros de Hidrólise ácida.

Código da Amostra	Massa inicial (g)	Umidade (%)	Massa seca (g)	Volume (L)	Média	Desvio padrão
PT1	2,0058	2,10	1,9638	0,5	1,9623	0,002
PT2	2,0028	2,10	1,9608	0,5		

Tabela C.4. Determinação de lignina solúvel, insolúvel e total.

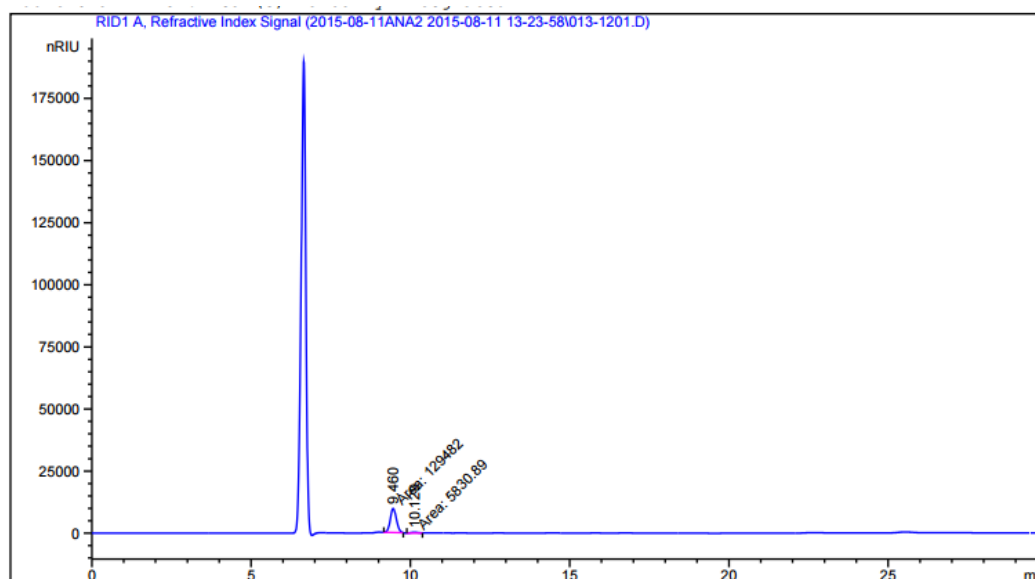
LIGNINA INSOLUVEL									
Código da amostra	Massa papel de filtro (g)	Massas (papel, lignina e cinzas)	Massa de lignina + cinzas (g)	Massa de cinzas de lignina (g)	Massa de lig insolúvel (g)	Massa da amostra seca (g)	Lignina (%)	Média	Desvio padrão
PT1	2,3605	3,2035	0,843	0,0052	0,8378	2,0059	41,77	42,52	1,072
PT2	2,365	3,258	0,893	0,0057	0,8873	2,05	43,28		
LIGNINA SOLUVEL									
Código da amostra	Absorbância (280nm)	Diluição	Absorbância PD (280 nm)	Massa de lignina solúvel (g)	% Lignina solúvel	Media	Desvio padrão		
PT1	0,26503	20	0,7638	0,1896	4,726	4,45	0,378		
PT2	0,23735	20	0,741	0,1674	4,179				

Tabela C.5. Determinação dos açúcares, ácidos orgânicos, produtos de degradação, balanço do material juntamente com a composição percentual das macromoléculas.

Fatores de conversão	CELULOSE				HEMICELULOSE			
	0,9	0,95	3,52	1,29	0,88	0,90	0,72	1,37
Código da Amostra	Glicose (g·L ⁻¹)	Celobiose (g·L ⁻¹)	Ácido Fórmico (g·L ⁻¹)	HMF (g·L ⁻¹)	Xilose (g·L ⁻¹)	Arabinose (g·L ⁻¹)	Ácido acético (g·L ⁻¹)	Furfural (g·L ⁻¹)
PT1	1,994	nd	nd	0,0067	0,0718	nd	nd	nd
PT2	1,995	nd	nd	0,0065	0,0719	nd	nd	nd
Código da Amostra	Glicose (%)	HMF (%)	Xilose (%)	Furfural (%)				
PT1	45,693	0,220	1,609	nd				
PT2	45,784	0,214	1,613	nd				
Media	45,693	0,220	1,609	nd				
Desvio Padrão	45,784	0,214	1,613	nd				
Código da Amostra	Lignina (%)	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Extrativos (%)	Cinzas Totais (%)			
PT1	46,49	45,91	1,6087	-	0,13			
PT2	47,46	46,00	1,6134	-	0,14			
Média	46,98	45,96	1,61	-	0,14			
Desvio Padrão	0,68	0,06	0,0033		0,08			

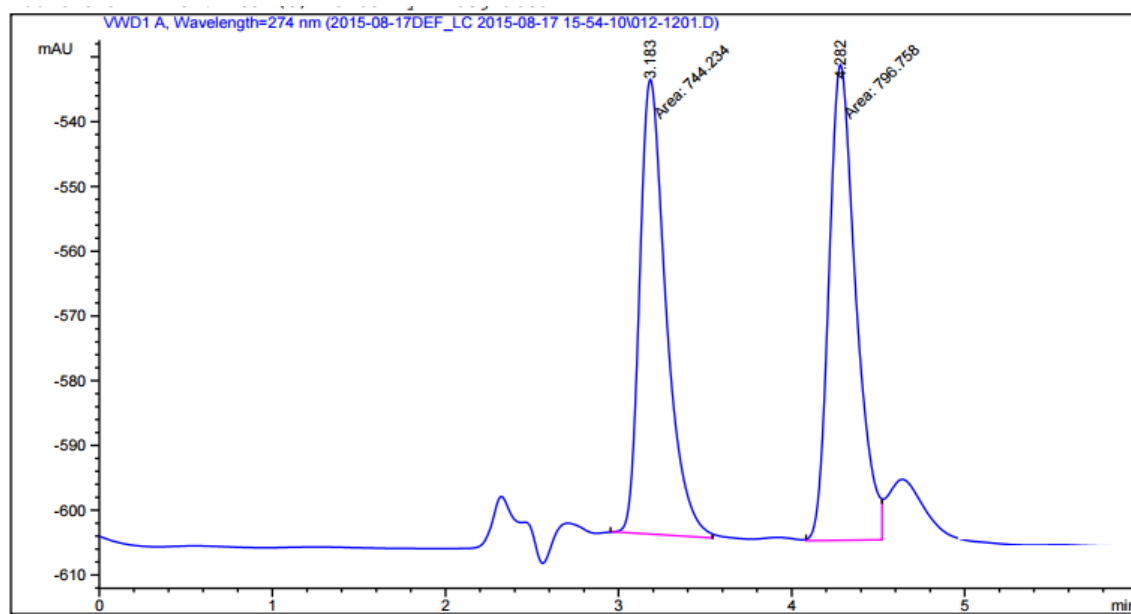
As Figuras C1 e C2 mostram os cromatogramas da caracterização das análises açúcares, ácidos orgânicos, produtos de degradação obtidos a partir da hidrólise ácida.

Figura C.1. Cromatograma para amostra submetida a pré-tratamento hidrotérmico açúcares.



Fonte: Autor, 2015

Figura C.2. Cromatograma para amostra submetida a pré-tratamento hidrotérmico produtos de degradação HMF e Furfural.



Fonte: Autor, (2015).

APÊNDICE D: RESULTADOS DA CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS CAVACOS DE EUCALIPTO SUBMETIDOS A DESLIGNIFICAÇÃO ALCALINA

Tabela D.1. Peso seco e umidade.

	Amostra 1	Amostra 2		
Peso do alumínio	0,2589	0,2701		
Massa úmida (g)	2,0028	2,0023	Média	Desvio padrão
Peso do conjunto úmido (g)	2,2617	2,2724	9,76	1,192
Peso do conjunto seco (12h) (g)	2,0832	2,0602		
Massa seca (g)	1,8243	1,7901		
% Umidade	8,91	10,60		

Tabela D.2. Determinação de cinzas totais.

Código da amostra	Massa inicial (g)	Umidade (%)	Massa seca (g)	Massa de cinzas (g)	Cinzas (%)		
DESL1	2,001	6,51	1,802901	0,0019	0,105385709	Media	Desvio
DESL2	2,0018	6,51	1,8036218	0,002	0,110887992	0,105	0,0039

Tabela D.3. Determinação de lignina solúvel, insolúvel e total.

LIGNINA INSOLÚVEL									
Código da amostra	Massa papel de filtro (g)	Massas (papel, lignina e cinzas)	Massa de lignina + cinzas (g)	Massa de cinzas de Lignina (g)	Massa de lig insolúvel (g)	Massa da amostra seca (g)	Lignina (%)	Média	Desvio padrão
DESL1	2,336	2,6071	0,2711	0,0041	0,267	2,008	13,30	13,15	0,04
DESL2	2,3245	2,6286	0,3041	0,043	0,2611	2,0076	13,01		
LIGNINA SOLÚVEL									
Código da amostra	Absorbância (280nm)	Diluição	Absorbância PD (280 nm)	Massa de lignina solúvel (g)	Lignina solúvel (%)	Média	Desvio. Padrão		
DESL1	0,242	20	1,20	0,151	3,78	3,81	0,0		
DESL2	0,242	20	1,16	0,154	3,84				

Tabela D.4. Parâmetros de hidrolise ácida H₂SO₄ 72%.

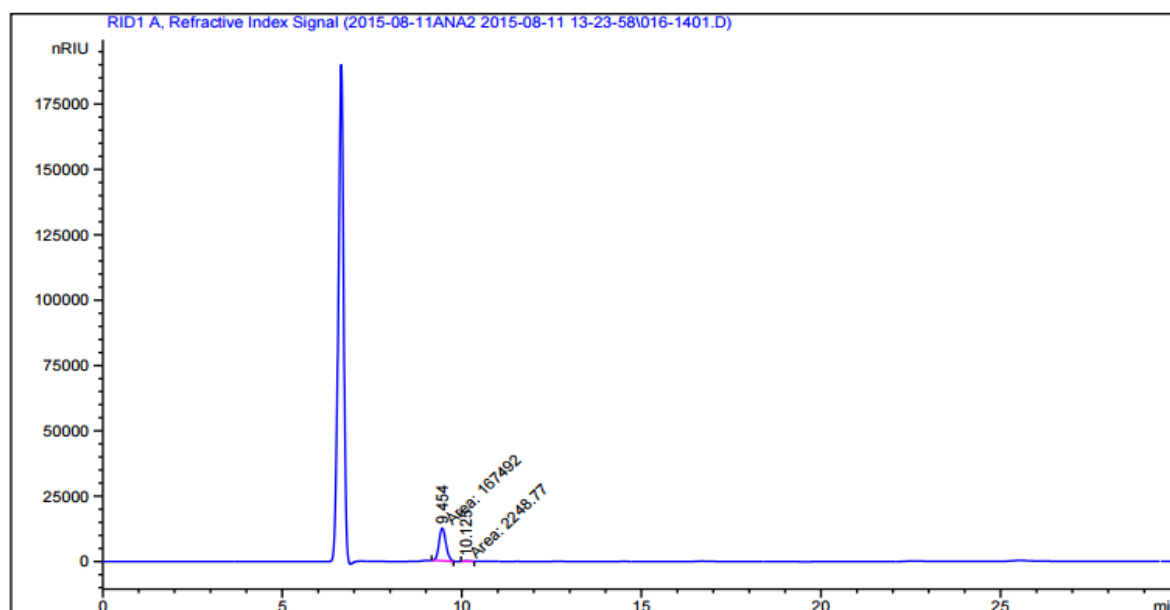
Código da Amostra	Massa inicial (g)	Umidade (%)	Massa seca (g)	Volume (L)	Média	Desvio padrão
DESL1	2,0081	9,76	1,8122	0,5	1,8121	0,000191438
DESL2	2,0078	9,76	1,8119	0,5		

Tabela D.5. Determinação dos açúcares, ácidos orgânicos, produtos de degradação, balanço do material juntamente com a composição percentual das macromoléculas.

	Celulose			Hemicelulose						
Fatores de conversão	0,9		0,95	3,52	1,29	0,88		0,90	0,72	1,37
Código da Amostra	Glicose (g·L ⁻¹)	Celobiose (g·L ⁻¹)	Ácido Fórmico (g·L ⁻¹)	HMF (g·L ⁻¹)	Xilose (g·L ⁻¹)	Arabinose (g·L ⁻¹)	Ácido acético (g·L ⁻¹)	Furfural (g·L ⁻¹)		
DESL1	2,979	nd	nd	0,0006	0,021	nd	nd	nd		
DESL2	3,098	nd	nd	0,0007	0,024	nd	nd	nd		
Código da Amostra	% glicose	% HMF	% Xilose	% Furfural						
DESL1	73,973	0,021	0,510	nd						
DESL2	76,940	0,025	0,583	nd						
Média	75,457	0,023	0,546	nd						
Desvio										
Padrao	2,098	0,003	0,052	nd						
Codigo da Amostra	% Lignina	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Extrativos (%)	Cinzas Totais (%)					
DESL1	18,12	73,99	1,02	nd	0,105385709					
DESL2	17,98	76,96	1,17	nd	0,110887992					
Média	18,05	73,99	1,09	nd	0,11					
Desvio										
Padrão	0,10	2,10	0,10	nd	0,0039					

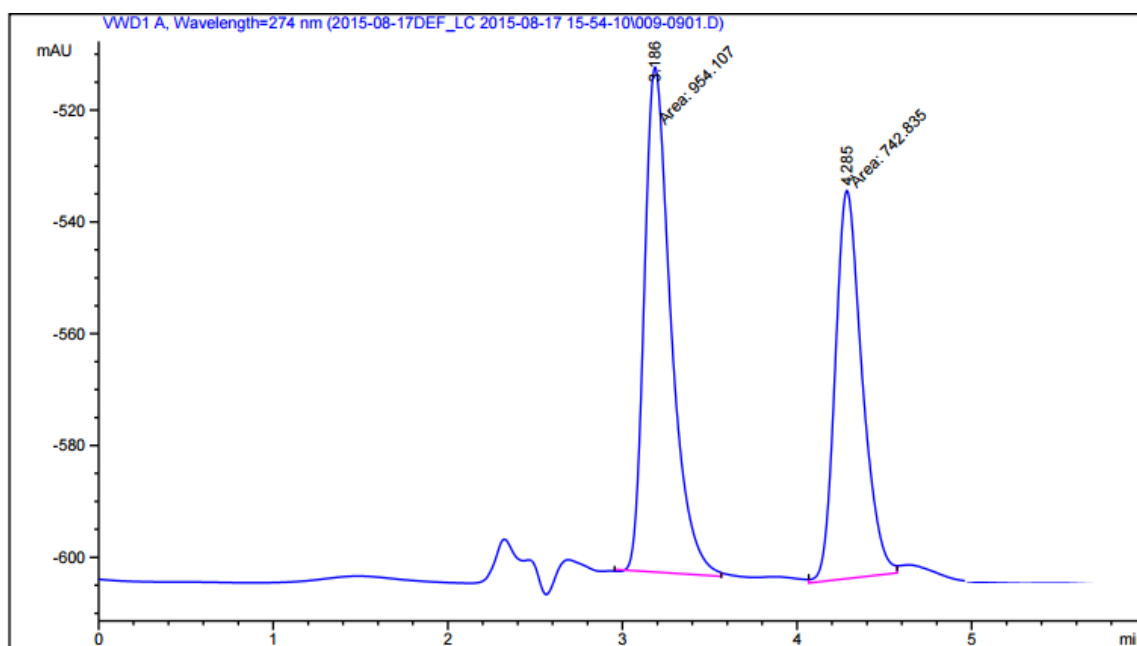
As Figuras D1 e D2 mostram os cromatogramas da caracterização das análises açúcares, ácidos orgânicos, produtos de degradação obtidos a partir da hidrólise ácida.

Figura D.1. Cromatograma para amostra submetida a deslignificação alcalina: açúcares.



Fonte: Autor, (2015).

Figura D.2. Cromatograma para amostra submetida a deslignificação alcalina. Produtos de degradação HMF e Furfural.



Fonte: Autor, (2015).

APÊNDICE E: RAMPA DE CONTROLE DA TEMPERATURA E TEMPO DO PRÉ-TRATAMENTO HIDROTÉRMICO, E PÓS HIDRÓLISE ÁCIDA DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO

Tabela E.1: Rampa de controle da temperatura durante o pré-tratamento hidrotérmico realizado no reator modelo REGMED AU/E-20.

Tempo (min)	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Temperatura (°C)
0	29,8	120	145,4
10	61,9	130	149,5
20	79,4	140	165,2
30	86,7	150	169,7
40	89,5	160	186,2
50	97,4	220	166,3
60	100,1	230	155,5
70	108,8	240	142,8
80	109,5	250	115,2
90	122,3	260	107,2
100	129	270	100,3
110	129,6		

Tabela E.2: Valores obtidos na pós hidrólise com ácido sulfúrico 4% do hidrolisado obtido do pré-tratamento hidrotérmico.

Hidrolisado	Celobiose	Glicose	Xilose	Ácido fórmico	Ácido acético	HMF	Furfural
PHPT1	nd	77365,8	98669,5	10607,4	72113,2	11240,1	24622,1
PHPT2	nd	75532	94227,8	11860,9	66405,8		
Concentração (g.L ⁻¹)	-	2,365	2,983	0,749	4,609	0,451	0,649
Concentração (g.L ⁻¹)	-	2,311	2,846	0,848	4,236	0,446	0,668
Média	-	2,338	2,915	0,799	4,423	0,449	0,659
Desvio padrão	-	0,039	0,097	0,070	0,264	0,004	0,014

APÊNDICE F: ANÁLISE POR DIFRAÇÃO DE RAIOS X – (DRX)

Os difratogramas são representados da seguinte maneira: difratograma para os cavacos “in natura” Figura F.1, difratograma para os cavacos submetidos a pré-tratado Hidrotérmicamente Figura F.2 e difratograma para os cavacos submetidos a deslignificação alcalina Figura F.3, respectivamente.

Através das equações F.1 e F.2 foi possível determinar os valores da largura média dos cristalitos no plano reticulado de maior intensidade e o índice de cristalinidade (IC), respectivamente, para os cavacos de eucalipto in natura, pré-tratado e deslignificado.

$$D_{hkl} = \frac{K\lambda}{\beta \cos\theta} \quad (F.1)$$

Onde:

D - diâmetro médio das partículas

K - constante que depende da forma das partículas (esfera = 0,94)

λ - comprimento de onda da radiação eletromagnética

θ - ângulo de difração

β (2θ) - largura na metade da altura do pico de difração

$$\%IC = \left[\left(\frac{I_{002} - I_{am}}{I_{002}} \right) \right] \cdot 100\% \quad (F.2)$$

Onde: %IC: Índice de cristalinidade

I_{002} : Intensidade no pico cristalino a aproximadamente 2θ

I_{am} : Intensidade relativa a região amorfa

REFERÊNCIA:

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

Figura F.1. Difratoograma dos cavacos “in natura.

Commander Sample ID (Coupled TwoTheta/Theta)

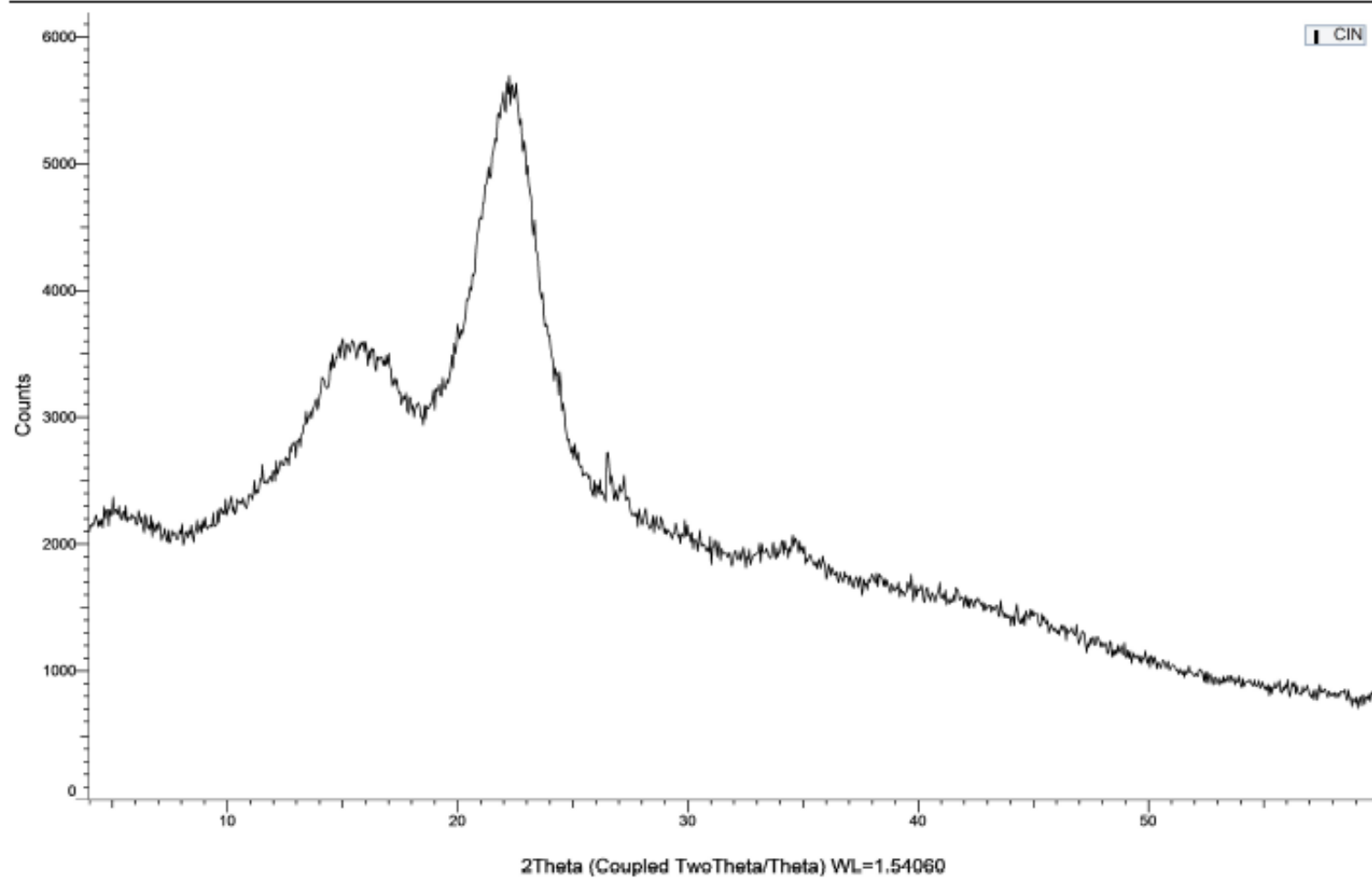


Figura F.2. Difratoograma dos cavacos pré-tratado Hidrotérmicamente.

Commander Sample ID (Coupled TwoTheta/Theta)

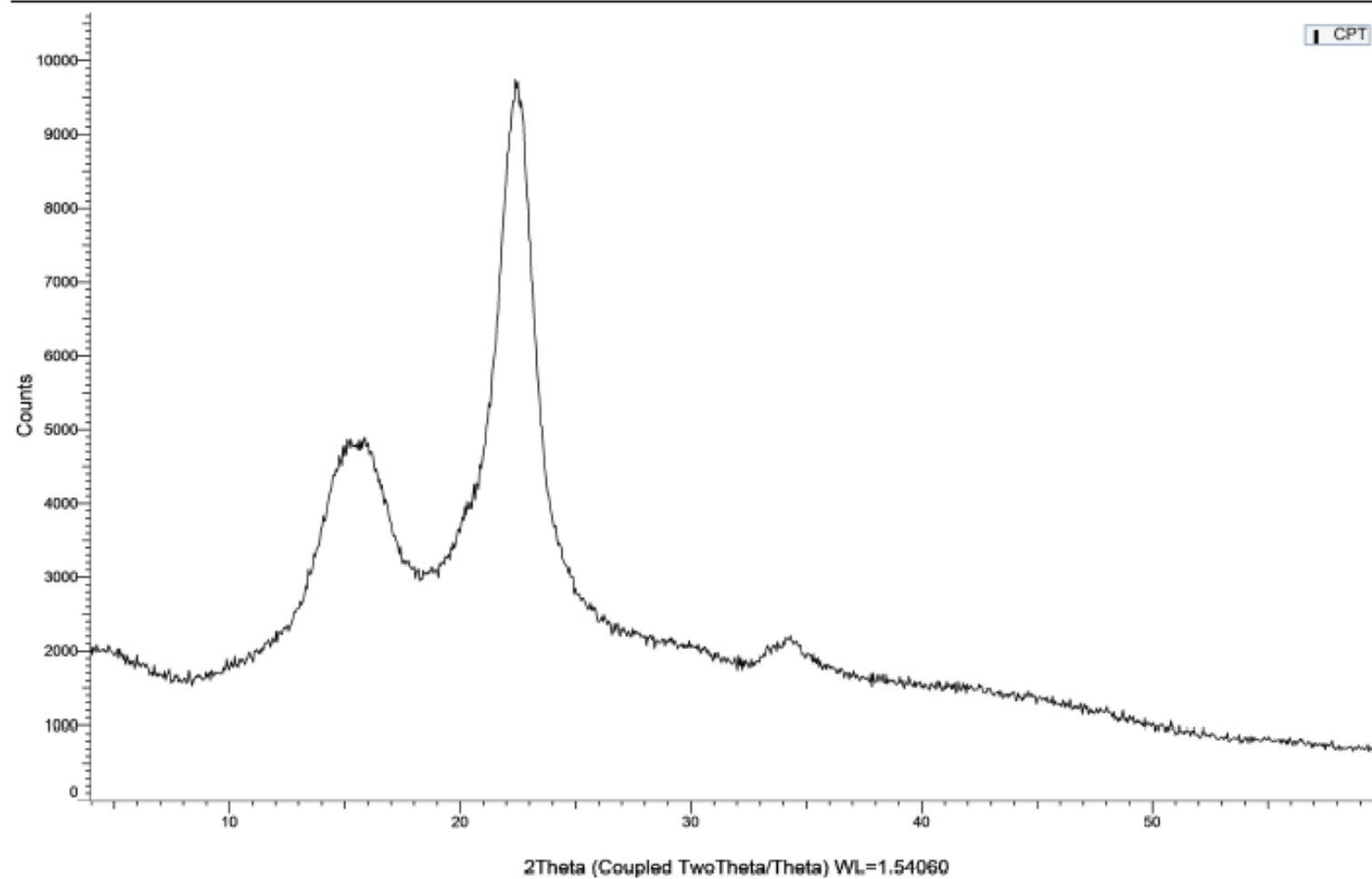
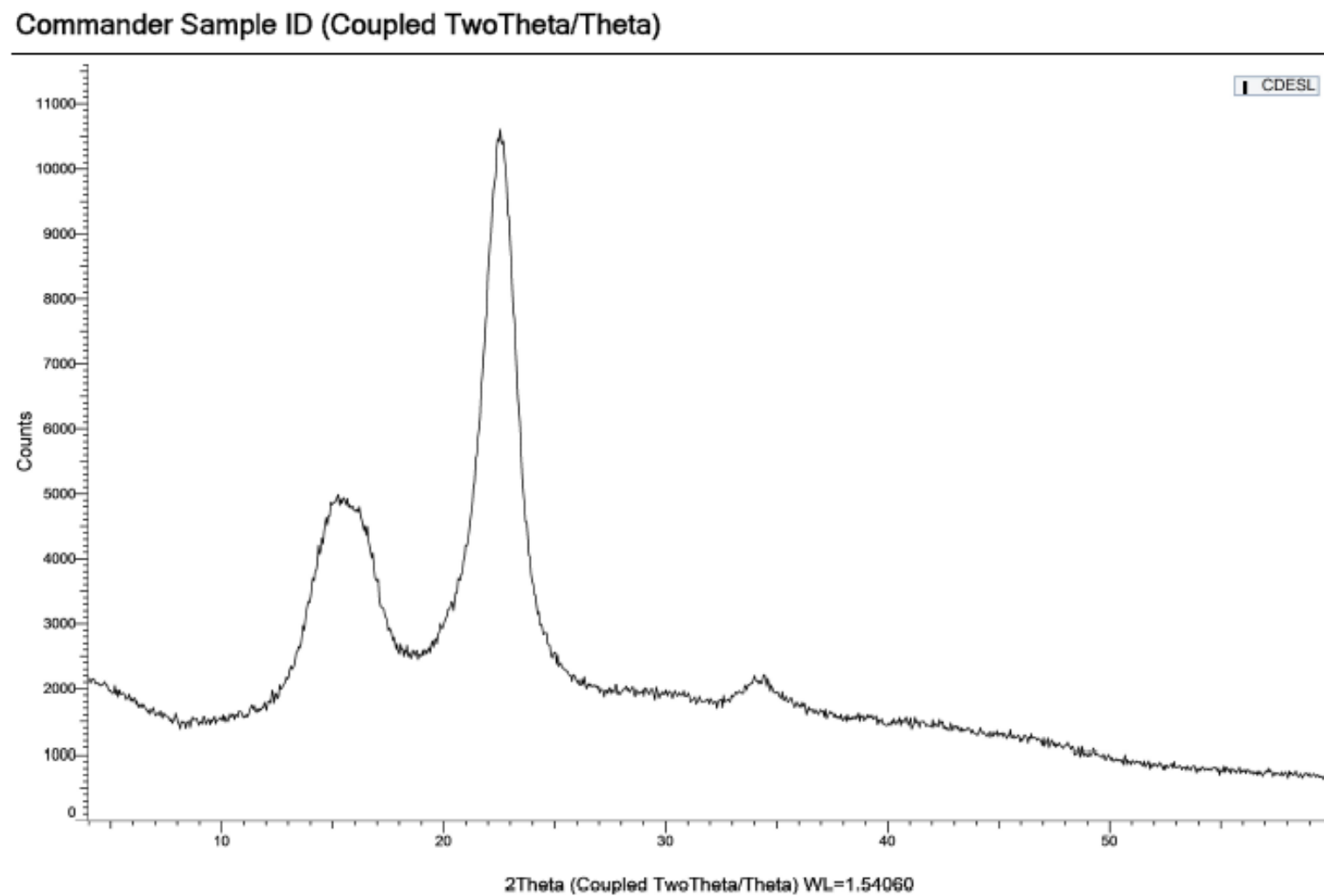


Figura F.3. Difratoograma dos cavacos submetidos a deslignificação alcalina.



APÊNDICE G: ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR) CAVACOS DE EUCALIPTO

Os espectros são representados da seguinte maneira: espectro de infravermelho para os cavacos “in natura” Figura G.1, espectro de infravermelho para os cavacos submetidos a pré-tratado Hidrotérmicamente Figura G.2 e espectro de infravermelho para os cavacos submetidos a deslignificação alcalina Figura G.3, respectivamente.

Figura G.1: Espectro de infravermelho para os cavacos “in natura.

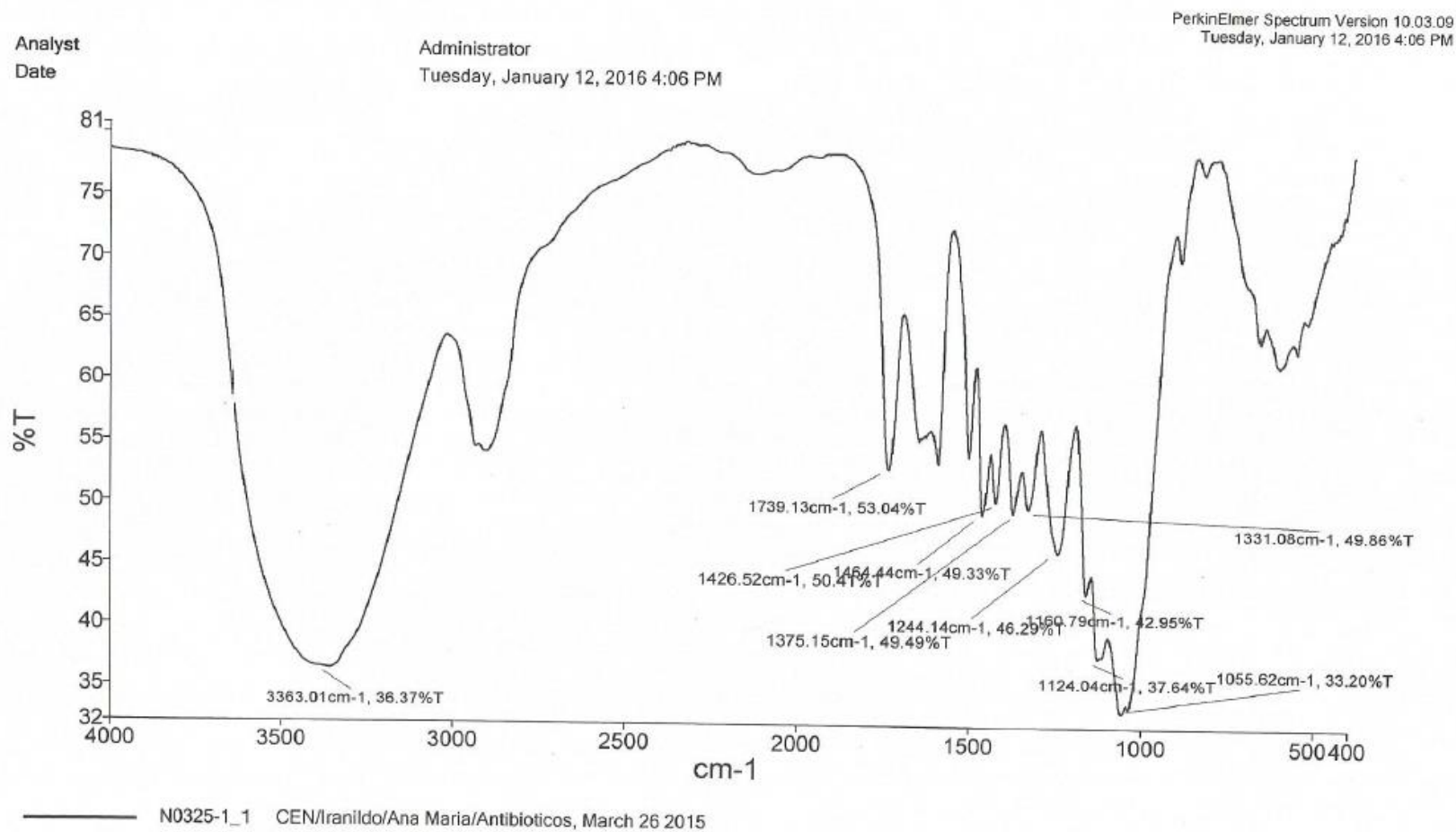


Figura G.2. Espectro de infravermelho para os cavacos submetidos a pré-tratado Hidrotérmicamente .

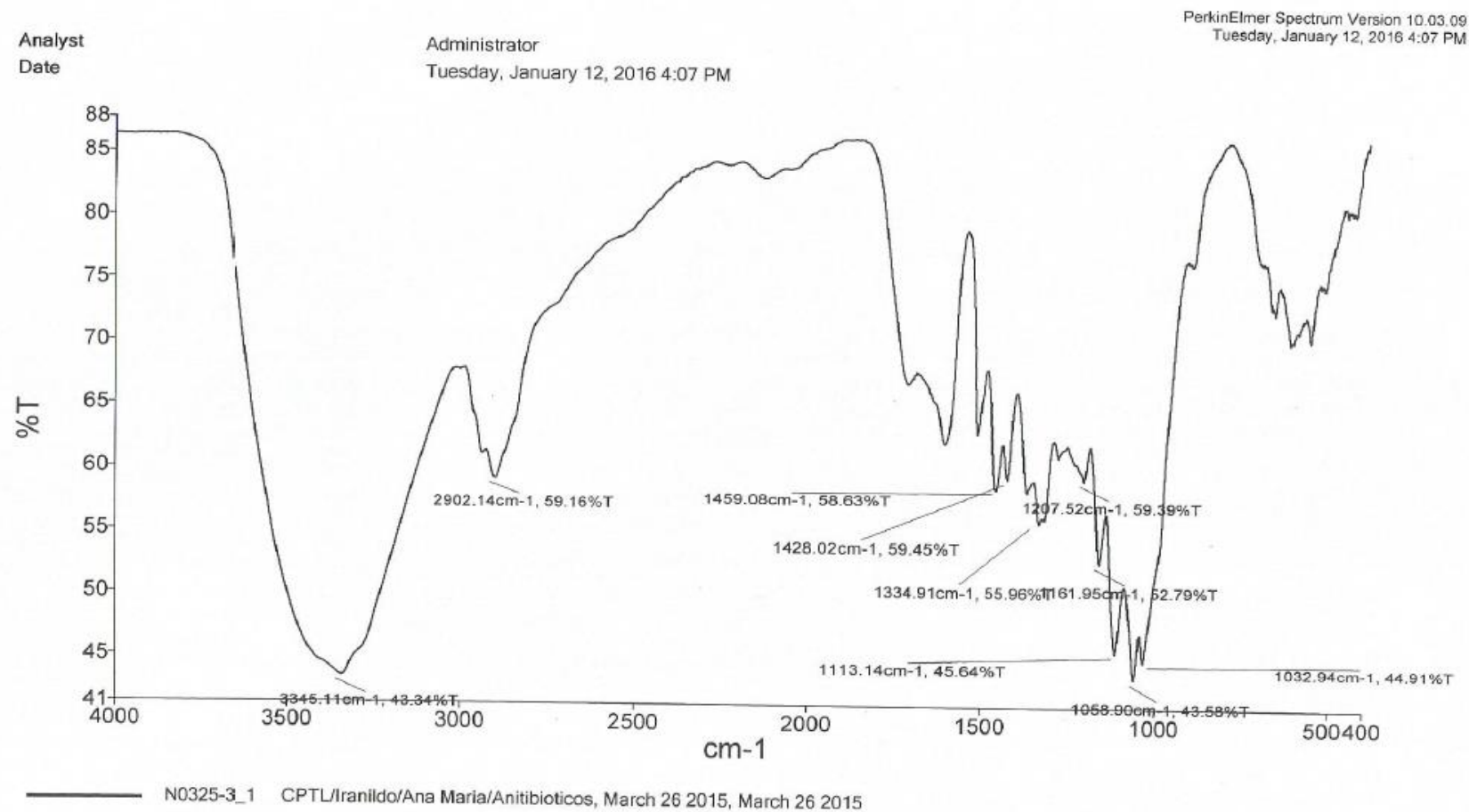
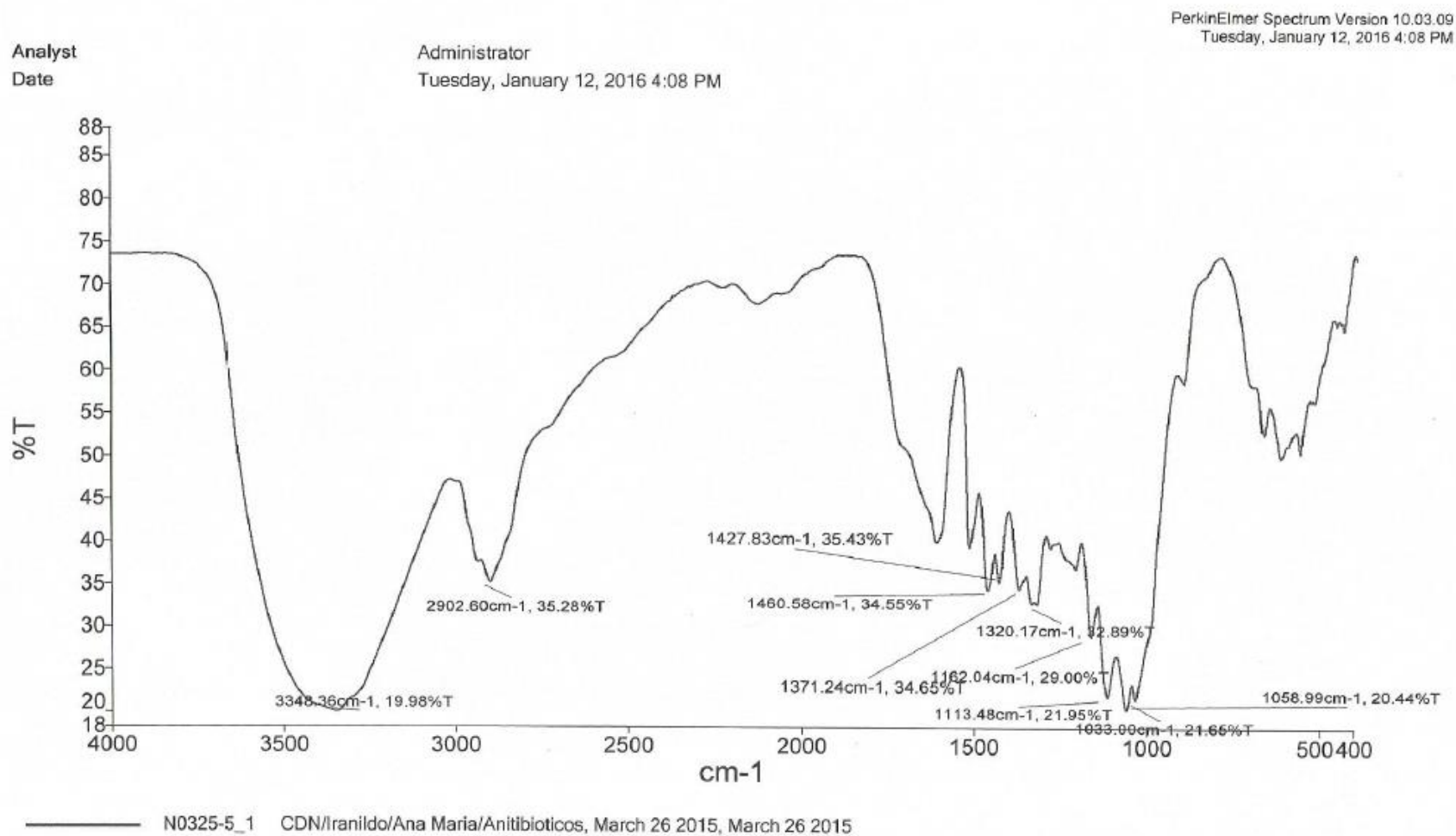


Figura G.3. Espectro de infravermelho para os cavacos submetidos a deslignificação alcalina.

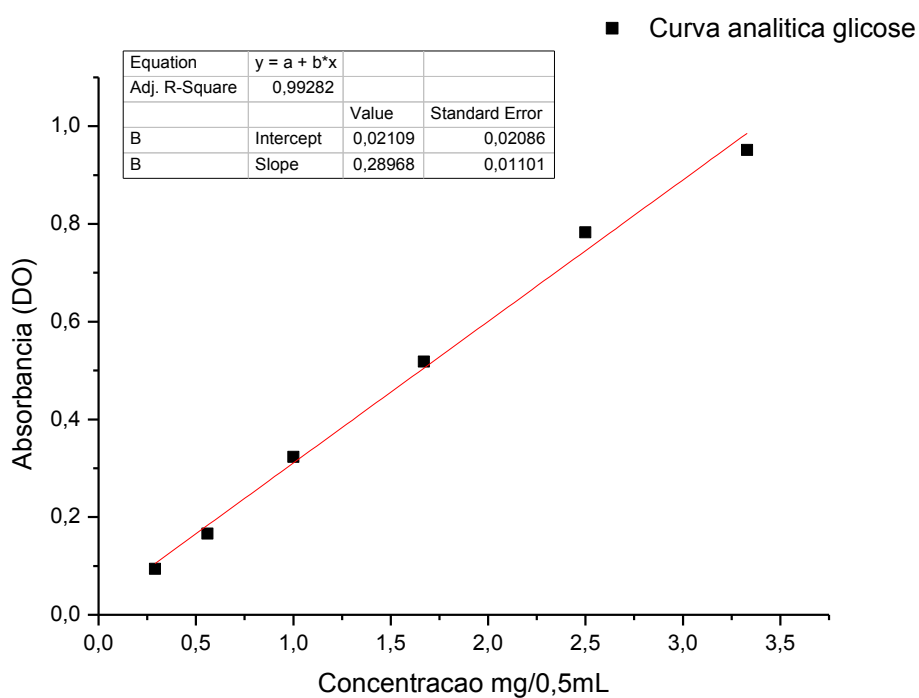


APÊNDICE H: HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

H.1. Padronização da Atividade enzimática das enzimas comerciais.

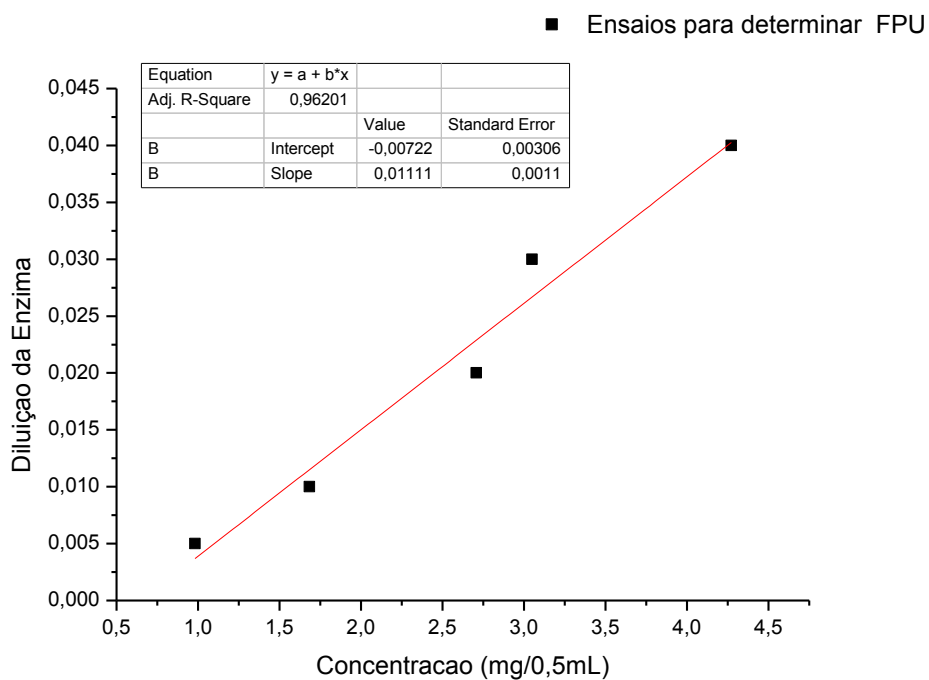
A padronização da enzima para se obter a carga enzimática das enzimas Celluclast® 1,5L e β -glicosidase foram determinadas segundo metodologia proposta por Ghose (1987). As curvas para determinação são mostradas nas figuras H.1, H.2 e H.3.

Figura H.1.1: Curva analítica de glicose



Fonte: Autor, (2015).

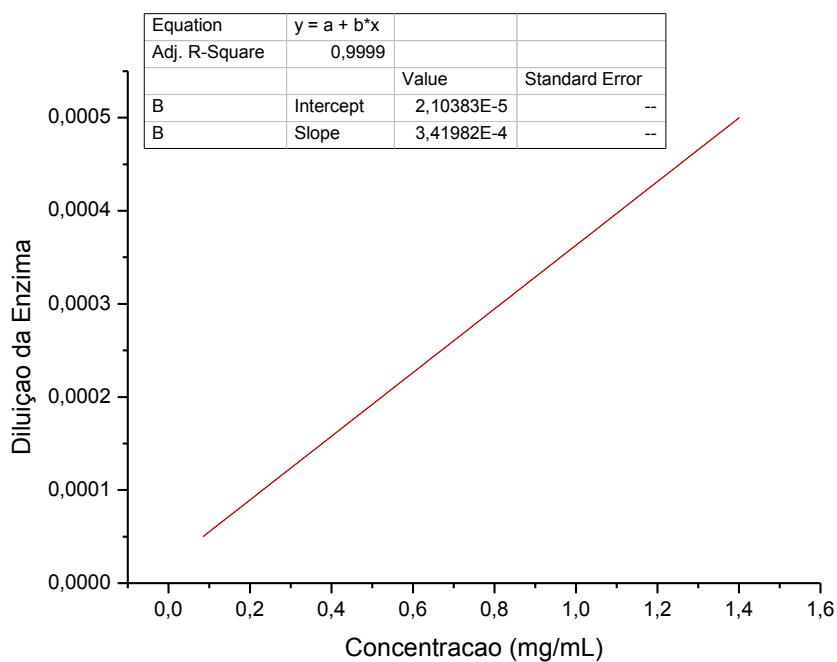
A determinação da atividade em $\text{FPU} \cdot \text{g}^{-1}$ foi reazada de acordo com a Figura H.2.

Figura H.1.2: Curva para determinação da atividade enzimática

Fonte: Autor, (2015).

A atividade obtida para a enzima comercial Celluclast® 1,5L foi **24,7 FPU·g⁻¹**.

A determinação da concentração de glicose liberada pela β -glicosidase (Novozym® 188) foi realizada através da utilização de um kit de análise de glicose (Reagente GOD-POD, Doles).

Figura H.1.3: Curva para determinação da atividade enzimática.

Fonte: Autor, 201

Carga enzimática para a enzima comercial Novozym® 188 foi **289,4** UI·g⁻¹.

H.2. Ensaios de hidrólise enzimática cavacos de eucalipto “in natura”, submetidos a pré-tratamento hidrotérmico e deslignificação alcalina.

Tabela H.2.1: Perfis de concentrações em (g·L⁻¹) de celobiose durante o tempo de ensaio enzimático utilizando-se enzimas comerciais Celluclast® 1,5L e Novozym® 188 nos cavacos de eucalipto “in natura” e os obtidos durante o processo.

Tempo (h)	C. “in natura”	PT. H ₂ O	Deslg. NaOH
0	0,36332	4,96369	5,76756
0,5	0,39759	3,65107	4,78937
3	0,39803	2,64879	6,56196
6	0,26332	2,61471	3,11463
12	0,25904	1,88846	2,92841
24	0,24888	0,91122	1,07833
30	0,24039	0,66842	0,89891
36	0,20291	0,54739	0,99583
48	0,17486	0,5023	0,75388
54	0,0839	0,49143	0,53235
60	0,05228	0,47533	0,92914
72	0,03846	0,46337	0,41813
78	0,02942	0,44848	0,42728
84	0,01995	0,37517	0,37435
96	0,0199	0,33368	0,36265

Tabela H.2.2: Perfis de concentrações em (g·L⁻¹) de glicose, durante o tempo de ensaio enzimático utilizando-se enzimas comerciais Celluclast® 1,5L e Novozym® 188 nos cavacos de eucalipto “in natura” e os obtidos durante o processo.

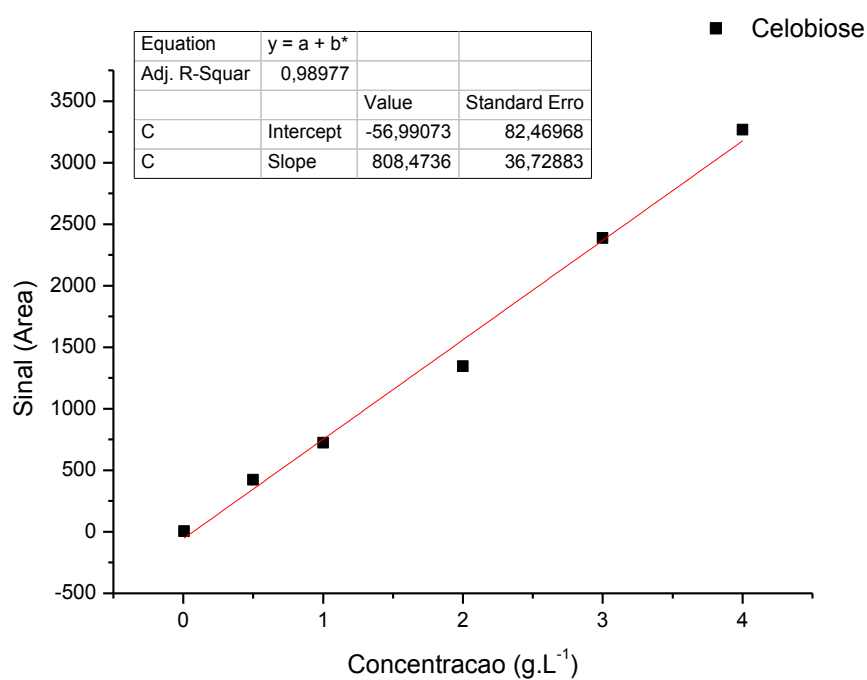
Tempo (h)	C. “in natura”	PT. H ₂ O	Deslg. NaOH
0	0	0,51227	0,390187
0,5	0,0144	0,964898	0,942613
3	0,0576	1,041546	1,46696
6	0,1152	1,050137	1,722107
12	0,1224	1,141965	1,900133
24	0,2016	1,698983	2,100973
30	0,36	2,612786	2,53148
36	0,4008	2,866622	2,77096
48	0,414156	2,906145	2,789053
54	0,429828	2,684616	2,852053
60	0,437136	2,780558	3,042027
72	0,454968	2,947769	3,33088
78	0,510132	2,943534	3,760107
84	0,50256	2,939596	3,802053
96	0,495168	2,942313	3,998667

Tabela H.2.3: Conversões celulose em glicose obtidos na hidrólise enzimática utilizando-se enzimas comerciais Celluclast® 1,5L e Novozym® 188 para os cavacos de eucalipto.

Tempo (h)	C. "in natura" (%)	PT. H ₂ O (%)	Deslg. NaOH (%)
0	0,0	7,5	6,7
5	0,2	14,2	16,2
3	0,6	15,3	25,2
6	1,2	15,4	29,6
12	1,3	16,8	32,7
24	2,1	25,0	36,1
30	3,8	38,4	43,5
36	4,3	42,1	47,7
48	4,4	42,7	48,0
54	4,6	39,5	49,1
60	4,7	40,9	52,3
72	4,8	43,3	57,3
78	5,4	43,3	64,7
84	5,3	43,2	65,4
96	5,3	43,2	68,8

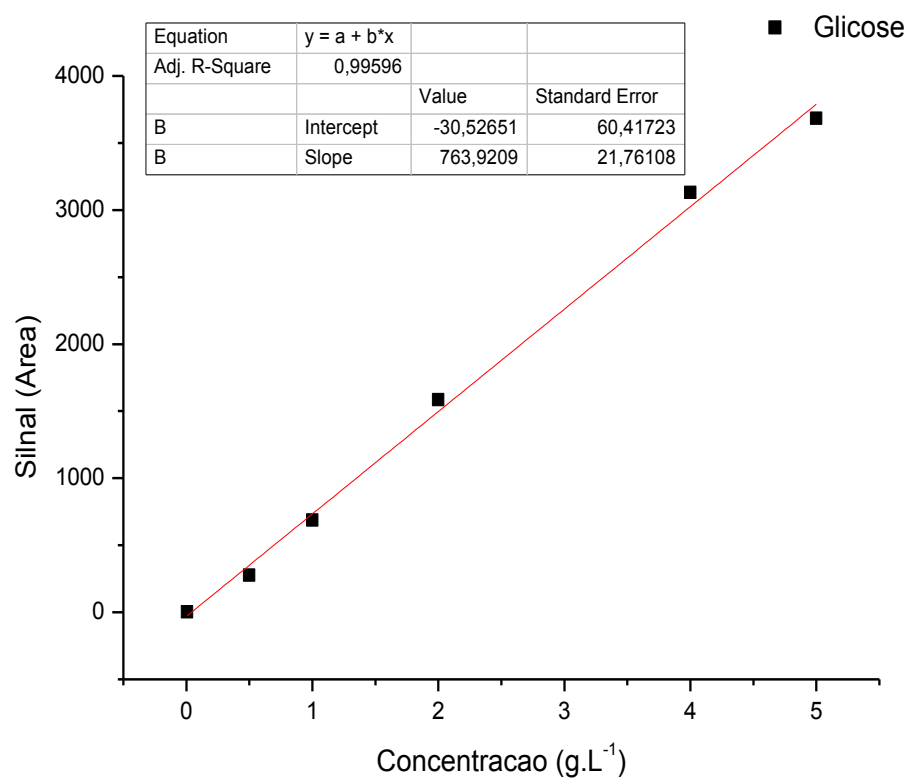
As concentrações foram obtidas por CLAE, utilizando as seguintes curvas analítica como mostra a Figura H.2.1.

Figura H.2.1. Curva analítica para celobiose.



Fonte : Autor, (2015).

Figura H.2.3: Curva analítica para Glicose

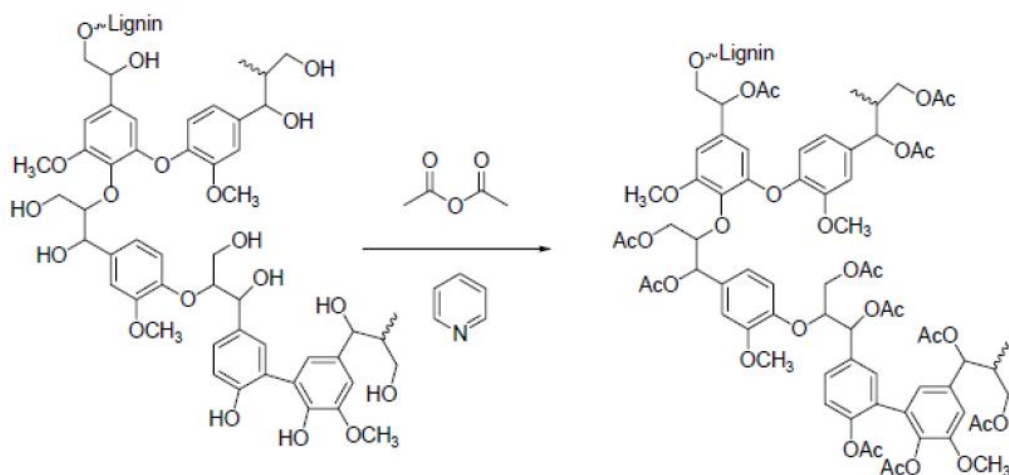


Fonte: Autor, (2015).

APÊNDICE I: ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR)

Reação de acetilação da lignina de acordo com a Figura I.1.

Figura I.1: Reação de acetilação da lignina



Fonte: adaptado de Hoareau, 2006.

Os espectros são representados da seguinte maneira: espectro de infravermelho para a lignina “in natura” Figura I.2 , e espectro de infravermelho para a lignina Acetilada Figura I.3 .

REFERÊNCIA:

HOAREAU, W.; OLIVEIRA, F. B.; GRELIER, S.; SIEGMUND, B.; FROLLINI, E.; CASTELLAN, A. Fiberboards based on sugarcane bagasse lignin and fibers. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 291, n. 7, p. 829-839, 2006.

Figura I.2. Espectro de infravermelho para a lignina “in natura” .

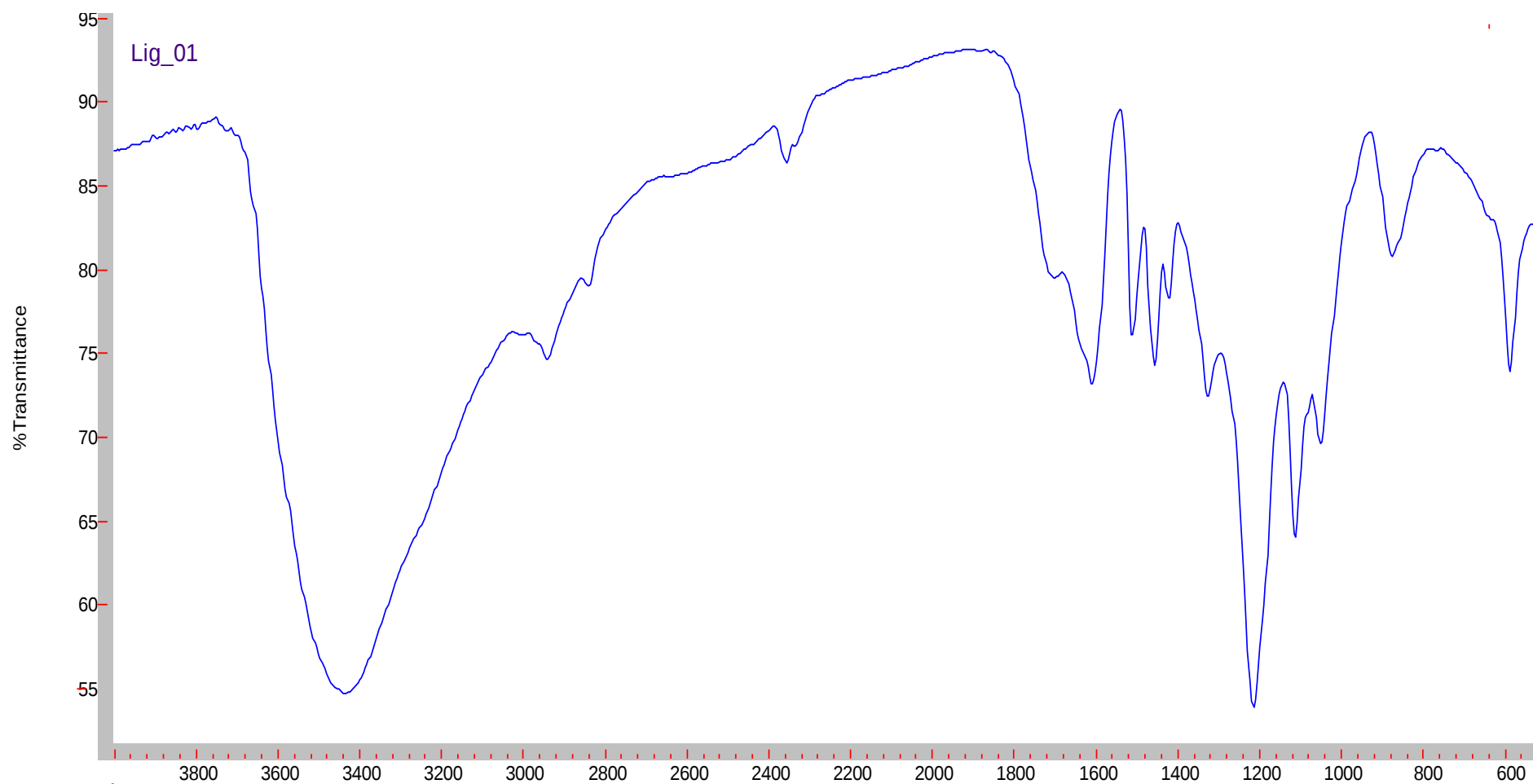
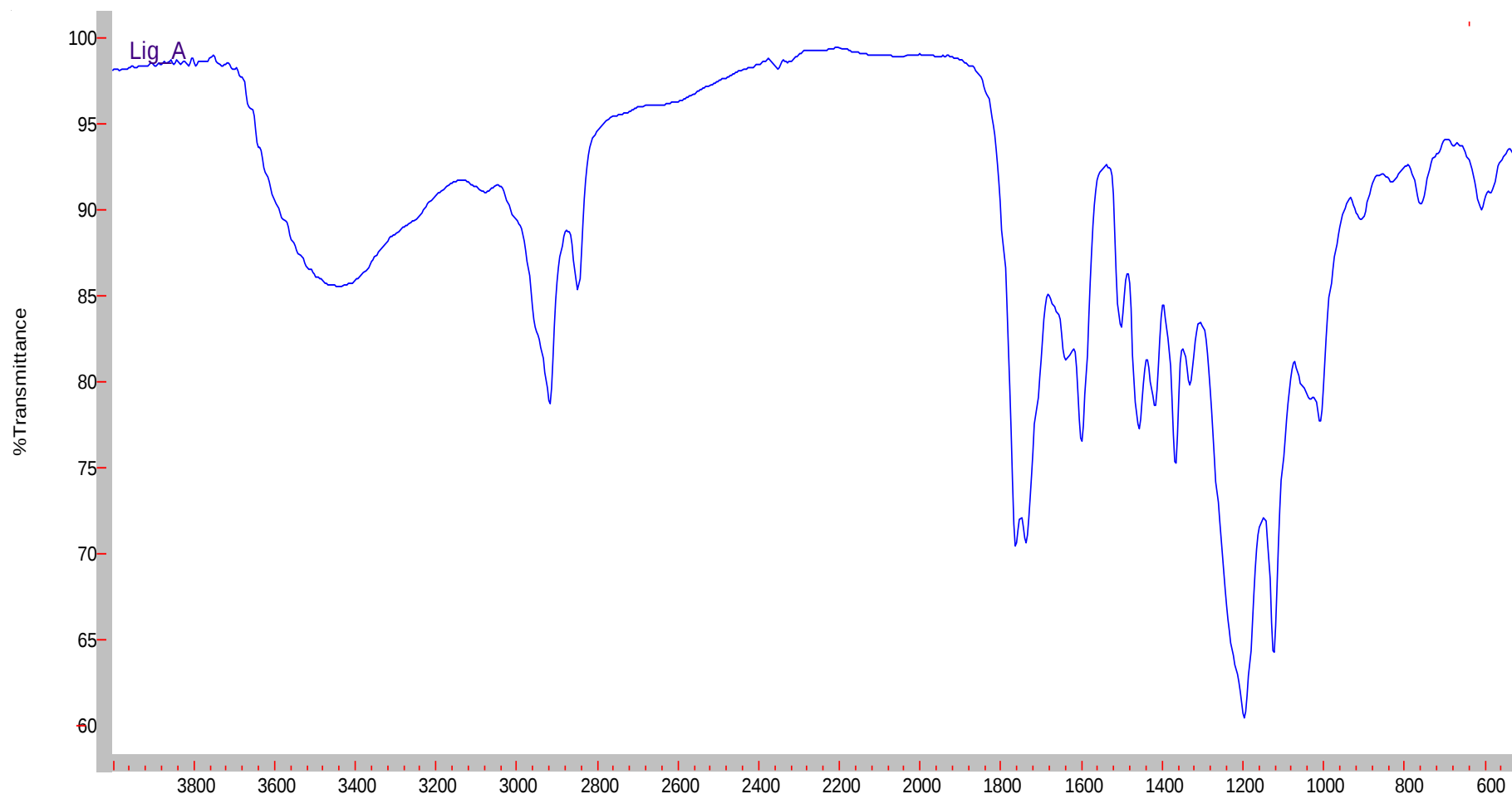


Figura I.3. Espectro de infravermelho para a lignina Acetilada.



APÊNDICE J : ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA NUCLEAR MAGNÉTICA

Os espectros são representados da seguinte maneira: espectro de ressonância magnética da lignina acetilada de prótons ^1H é representado pelas Figuras J.1, J.2 e J.3. os espectros de RMN de ^{13}C é representado pelas figuras J.4, J.5 e J.6, respectivamente.

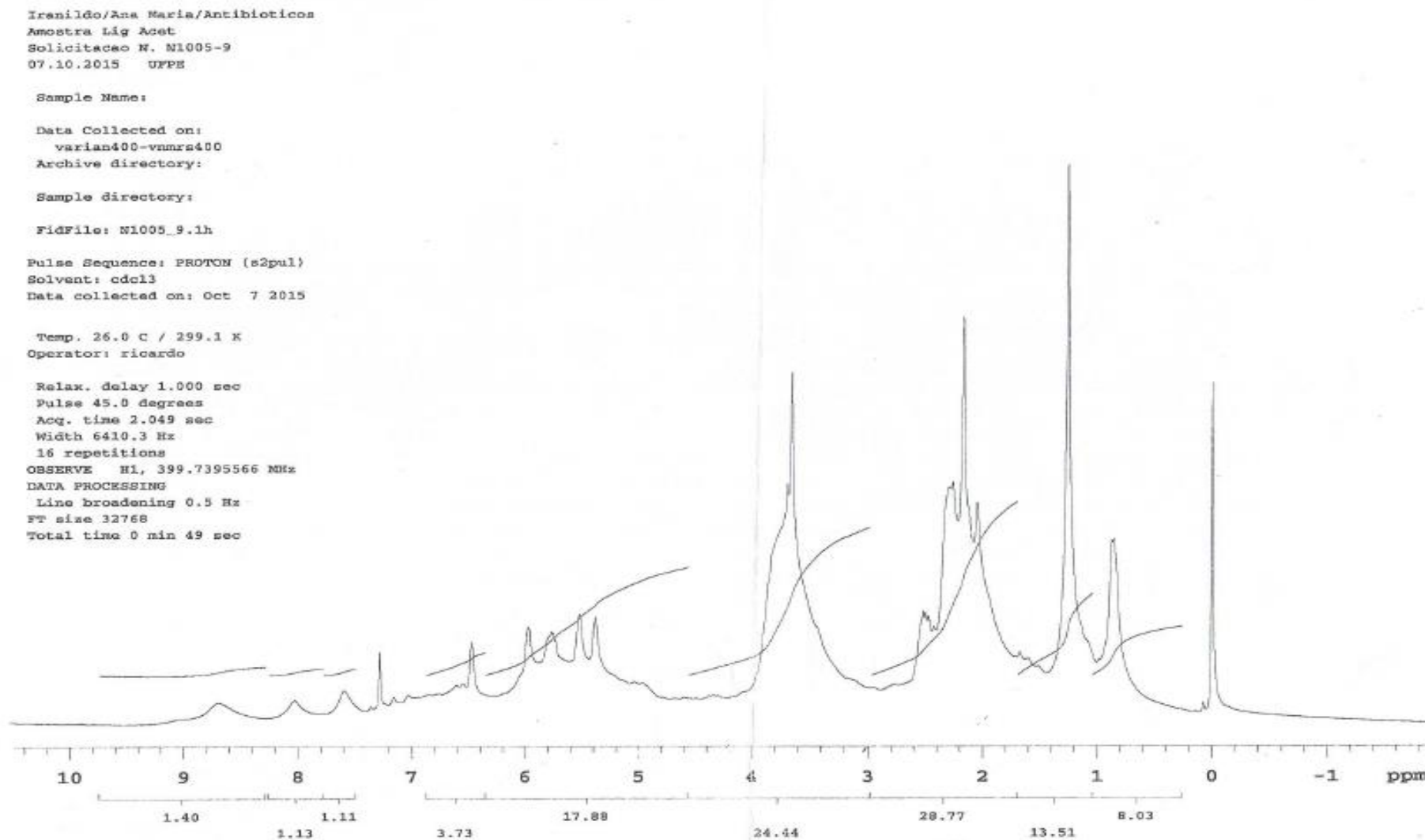
Figura J.1. Ressonância Nuclear Magnética de ^1H na região de (0 a 10) ppm.

Figura J.2. Ressonância Nuclear Magnética de ^1H na região de (0 a 4) ppm.

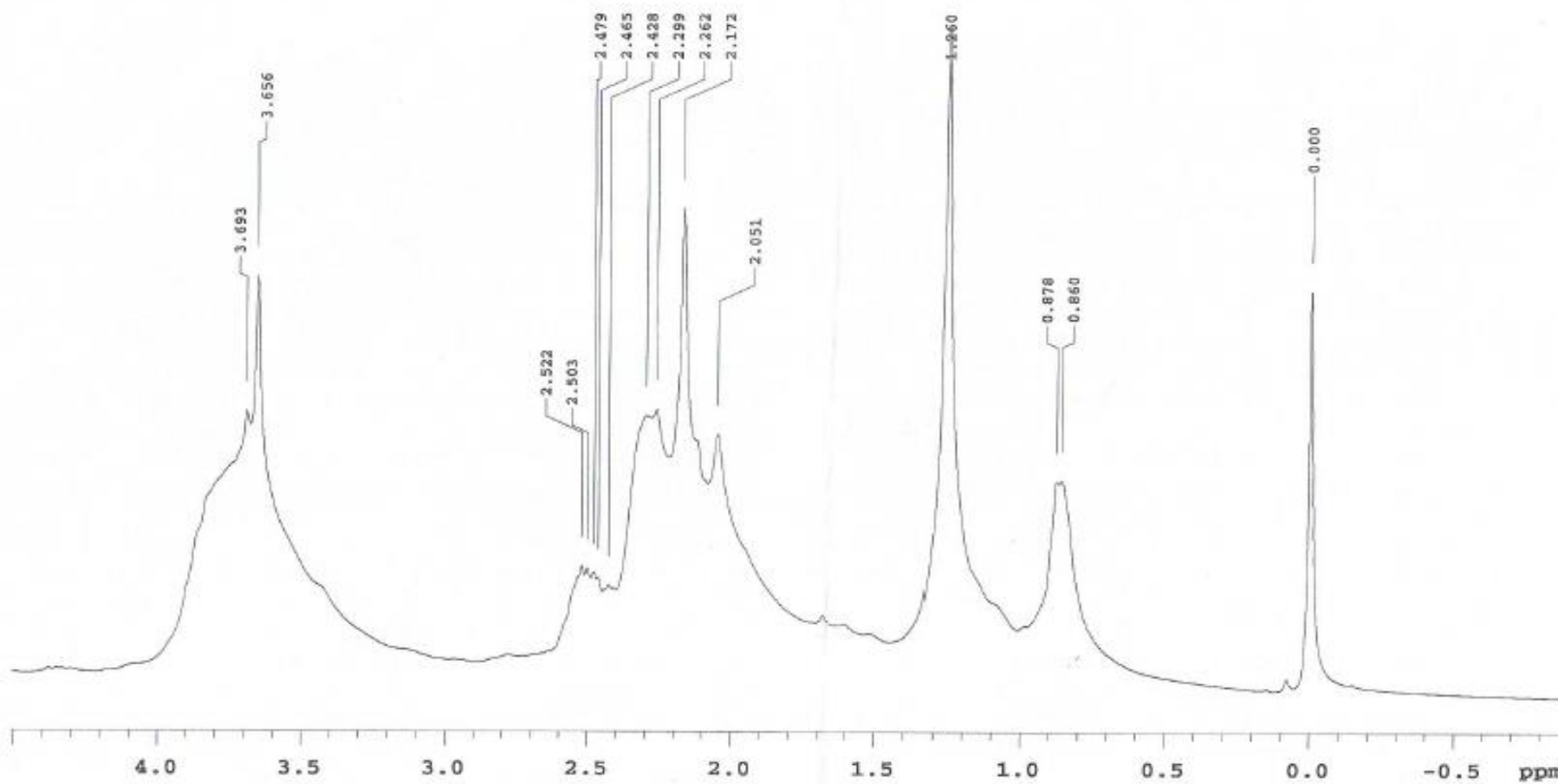


Figura J.3. Ressonância Nuclear Magnética de ^1H na região de (5 a 9) ppm.

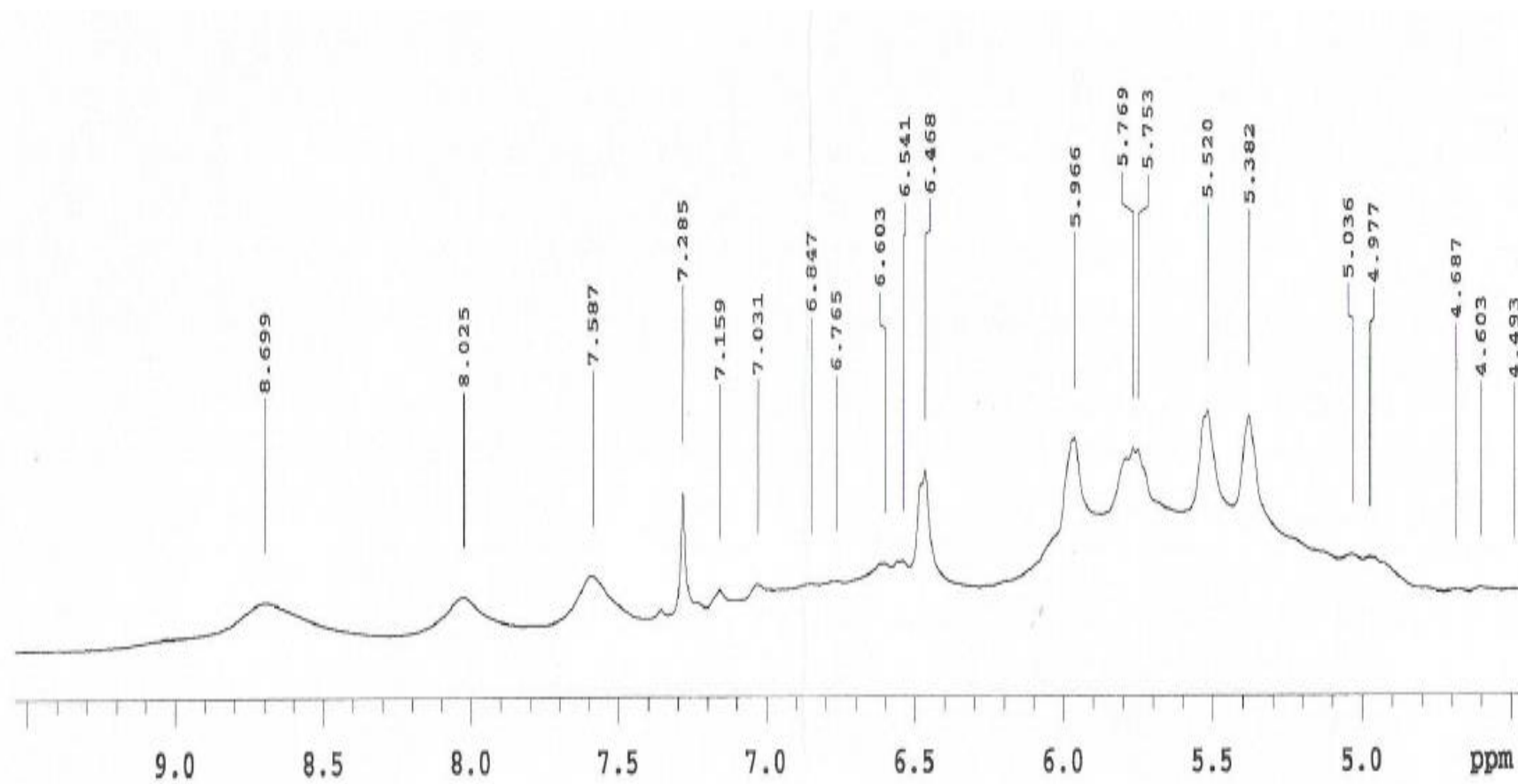


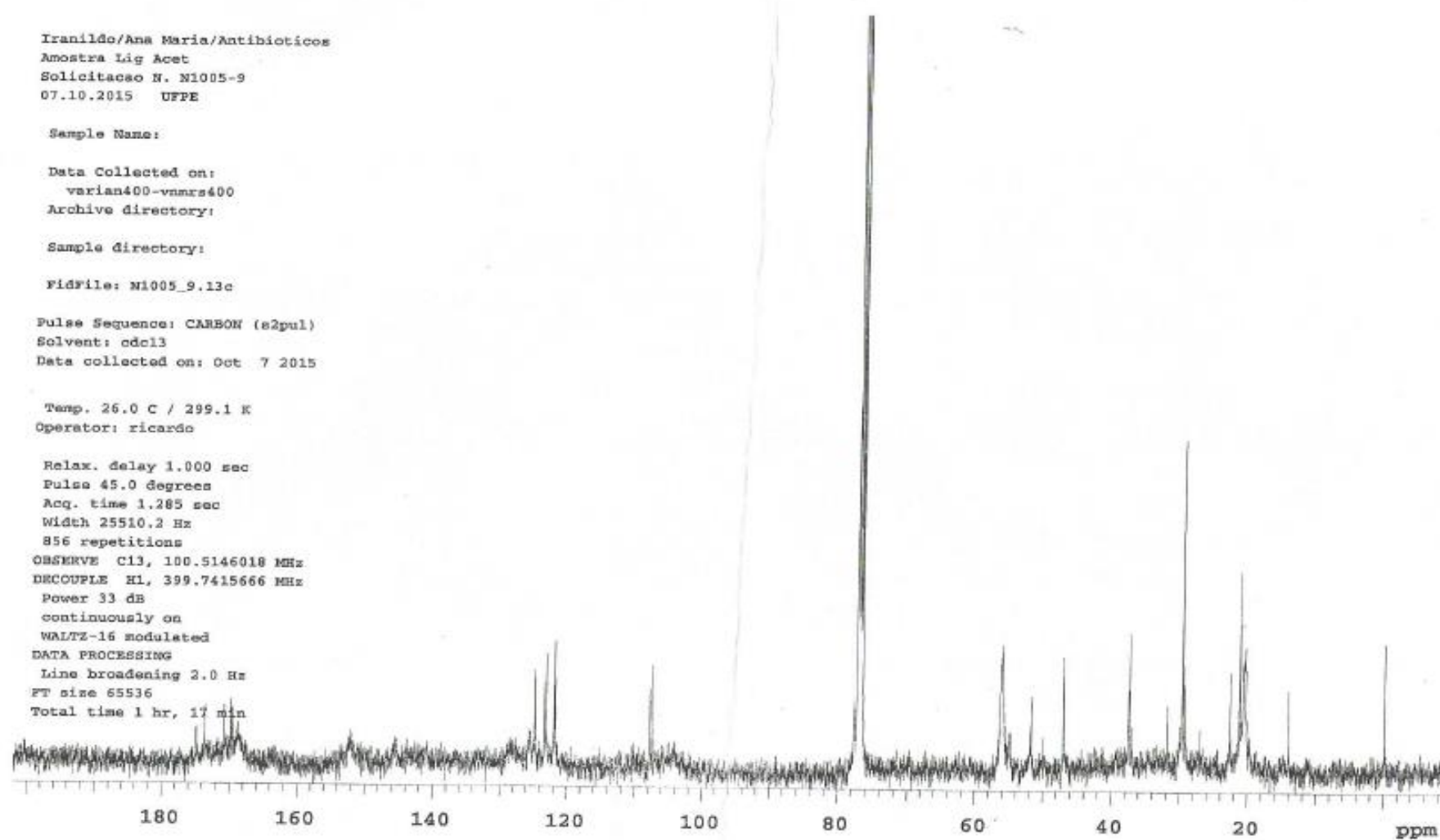
Figura J.4. Ressonância Nuclear Magnética de ^{13}C na região de (0 a 100) ppm.

Figura J.5. Ressonância Nuclear Magnética de ^{13}C na região de (0 a 60) ppm.

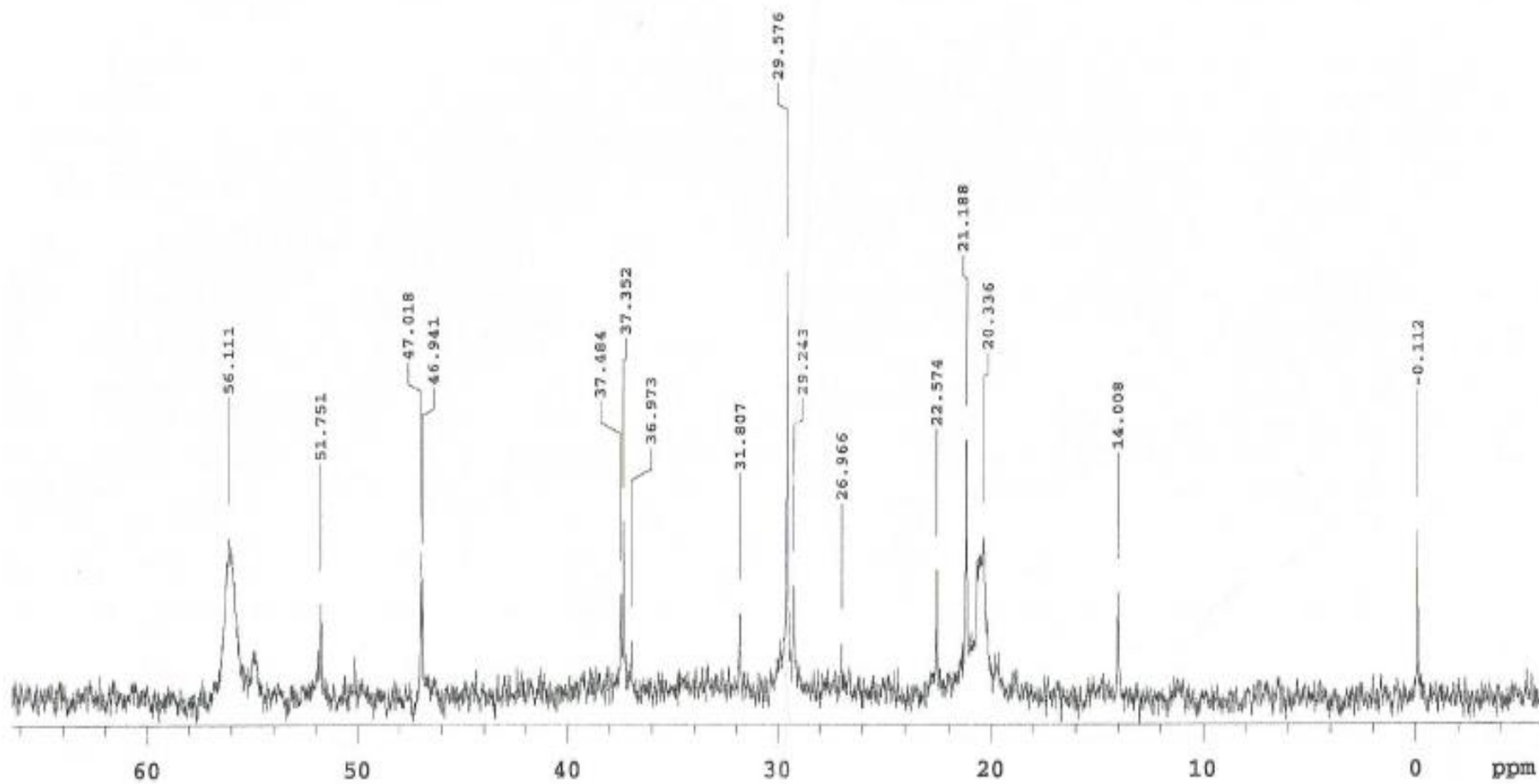
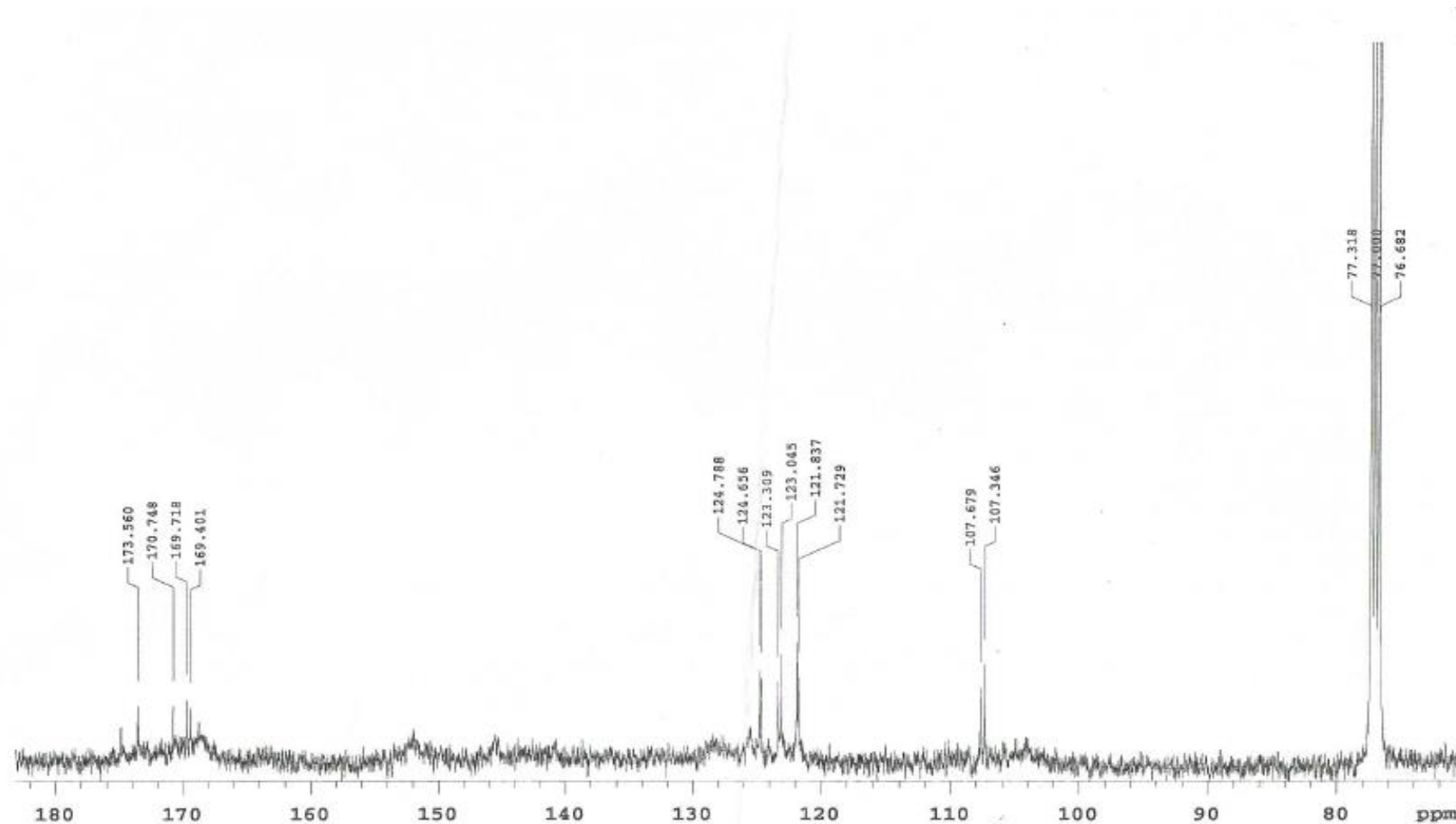


Figura J.5. Ressonância Nuclear Magnética de ^{13}C na região de (60 a 180) ppm



APÊNDICE K: ESPECTROSCOPIA UV/Vis LIGNINA “IN NATURA”

Determinação do coeficiente de extinção

Tabela K.1: Curva de absorbância por concentração de Lignina.

Concentração (g·L ⁻¹)	Absorbância 1	Absorbância 2	Absorbância 3	Media	Desvio padrão
0,0025	0,047629	0,047879	0,047629	0,047629	0,000144338
0,005	0,13952	0,13938	0,13998	0,13952	0,0003139
0,025	0,6156	0,61499	0,61483	0,61499	0,000406325
0,05	1,1102	1,1117	1,1099	1,1102	0,000964365
0,1	2,2767	2,2766	2,272	2,2766	0,002685144

Tabela K.2: Espectro de UV/Vis das soluções de 0,026 g.L⁻¹ das ligninas “in natura”. Valores de comprimento de onda por absorbância

λ (nm)	ABS(DO)	λ (nm)	ABS(DO)
190	2,28753	360	0,05888
200	2,5986	370	0,0522
210	2,61151	380	0,04455
220	0,68286	390	0,06613
230	0,3481	350	0,06363
240	0,27757	400	0,02934
250	0,29476	410	0,02377
260	0,39271	420	0,01906
270	0,5293	430	0,01547
280	0,56881	440	0,0126
290	0,39395	450	0,01053
300	0,21712	460	0,00879
310	0,11839	470	0,00754
320	0,08686	480	0,00646
330	0,07203	490	0,00604
340	0,0675	500	0,00493
350	0,06363	-	-