

PAULA SANTANA BARBOSA

**PROCEDIMENTOS PARA CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO DE  
CANA-DE-AÇÚCAR: ESTUDOS PARA OTIMIZAÇÃO E PADRONIZAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

B238p  
2018  
Barbosa, Paula Santana, 1990-  
    Procedimentos para caracterização química do bagaço de  
cana-de-açúcar : estudos para otimização e padronização / Paula  
Santana Barbosa. – Viçosa, MG, 2018.  
    ix, 60 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Reinaldo Francisco Teófilo.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f. 49-60.

1. Extração (Química). 2. Bagaço de cana. 3. Lignina.  
4. Madeira - Química. 5. Biomassa florestal. 6. Carboidratos.  
7. Cromatografia a líquido. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Química. Program de Pós-Graduação em  
Engenharia Química. II. Título.

CDD 22. ed. 543.84

PAULA SANTANA BARBOSA

**PROCEDIMENTOS PARA CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO DE  
CANA-DE-AÇÚCAR: ESTUDOS PARA OTIMIZAÇÃO E PADRONIZAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 26 de fevereiro de 2018.

---

Fernando José Borges Gomes

---

Márcio Henrique Pereira Barbosa  
(Coorientador)

---

Reinaldo Francisco Teófilo  
(Orientador)

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por sempre iluminar e guiar meu caminho. Por me dar perseverança para conquistar mais esta vitória.

À minha mãe, Marília, pelo amor incondicional, carinho e paciência. Por me incentivar e me apoiar. Muito obrigada mãe por ser meu exemplo.

À minha irmã, Camila, por todo apoio, carinho e ajuda.

Aos meus familiares pelo constante apoio e pela torcida.

Ao meu namorado Bruno pelo convívio saudável, companheirismo, paciência, carinho, incentivo e ajuda.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Química e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química pelas oportunidades dadas.

Ao Laboratório de Instrumentação e Quimiometria (LINQ) e ao Laboratório de Biotecnologia e Melhoramento Vegetal (LBMV) pelo suporte, pelas amizades e ajuda, durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Capes pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao professor Reinaldo Francisco Teófilo pela orientação sempre presente, pela confiança, compreensão e ensinamentos durante todo este período de convivência. Por ter contribuído muito para o meu crescimento profissional.

Ao professor Márcio Henrique Pereira Barbosa pela coorientação, por ter disponibilizado a estrutura física para realização deste trabalho e por ser sempre solícito quando precisei de apoio.

Ao Centro de Pesquisa e Melhoramento de Cana-de-açúcar (CECA) e a toda equipe envolvida na disponibilização, corte e processamento preliminar realizado nos materiais utilizados neste estudo, em especial, ao Marcos Roberto Soares.

Aos amigos que contribuíram com incentivo, apoio e companheirismo durante esta jornada.

A todos aqueles que colaboraram, direta ou indiretamente, na elaboração deste trabalho.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	v
LISTA DE TABELAS .....	vi
RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	ix
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS .....	3
2.1. Objetivo geral .....	3
2.2. Objetivos específicos .....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	4
3.1. Cana-de-açúcar .....	4
3.1.1. Bagaço de cana .....	6
3.2. Procedimentos para análise de biomassa .....	6
3.3. Determinação de extrativos e cinzas .....	8
3.4. Determinação de lignina .....	9
3.5. Análise de carboidratos da biomassa lignocelulósica .....	10
3.5.1. Celulose .....	11
3.5.2. Hemicelulose .....	12
3.6. Planejamento experimental .....	14
3.6.1. Planejamento fatorial completo .....	14
3.6.2. Planejamento Composto Central (CCD) .....	15
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	16
4.1. Preparo da amostra de bagaço de cana-de-açúcar .....	16
4.1.1. Determinação do teor de umidade .....	17
4.2. Remoção e determinação de extrativos .....	18
4.3. Determinação de Lignina .....	19
4.3.1. Lignina insolúvel (Klason) .....	20
4.3.1.1. Determinação de sílica na lignina insolúvel .....	21
4.3.2. Lignina solúvel .....	21

4.3.3. Lignina total .....	22
4.5. Determinação de cinzas na biomassa .....	25
4.6. Validação do procedimento para outras variedades .....	26
4.7. Cálculo do balanço de massa total.....	26
4.8. Cálculos e análises estatísticas .....	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	27
5.1. Secagem da amostra .....	27
5.2. Determinação de extrativos .....	27
5.3. Teor de lignina solúvel e insolúvel.....	34
5.4. Determinação do teor de cinzas total no bagaço de cana-de-açúcar .....	37
5.5. Determinação de carboidratos estruturais na biomassa.....	38
5.5.1. Otimização do método .....	38
5.5.2. Separação dos carboidratos nos hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar.	40
5.6. Balanço de massa total .....	45
6. CONCLUSÕES .....	48
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	49

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Produção de cana-de-açúcar por região e por estado (CONAB, 2017b).....	4
<b>Figura 2.</b> Evolução da área, produtividade e produção de cana-de-açúcar ao longo dos anos (CONAB, 2017b).....	5
<b>Figura 3.</b> Precursores primários da lignina (FENGEL; WEGENER, 1989).....	9
<b>Figura 4.</b> Estrutura da celulose (FENGEL; WEGENER, 1989).....	11
<b>Figura 5.</b> Estrutura química dos componentes das hemiceluloses (D'ALMEIDA, 1988). .....	13
<b>Figura 6.</b> Superfície de resposta que relaciona o teor de extrativos em função do tempo de extração em água (t.a) e em etanol (t.e). ....	31
<b>Figura 7.</b> Cromatogramas na coluna HPX-87P antes da otimização do método: A: Detector ELSD; B: Detector PDA; 1: GLI; 2: XIL; 3: GAL; 4: ARA; 5: MAN; 6: HMF e 7: FUR.....	38
<b>Figura 8.</b> Gráfico de Pareto do planejamento fatorial mostrando a influência dos fatores estudados. ....	39
<b>Figura 9.</b> Cromatogramas obtidos usando a coluna HPX-87P na condição otimizada (Ensaio 2). A: Detector ELDS; B: Detector PDA; 1: GLI; 2: XIL; 3: GAL; 4: ARA; 5: MAN; 6: HMF e 7: FUR.....	40
<b>Figura 10.</b> Cromatogramas típicos de dois hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar obtidos no HPLC-ELSD usando a coluna HPX-87P. A: amostra BMT45 (RB867515 seca a 45 °C) e B: BMA45 (RB127045). Picos: 1. CEL; 2. GLI; 3. XIL e 4. ARA.....	41
<b>Figura 11.</b> Cromatogramas típicos obtidos na coluna HPX-87H de uma solução padrão contendo a mistura GLI, XIL, ARA, GAL, MAN, HMF e FUR. Cromatograma A: separação dos carboidratos da mistura GLI, XIL, ARA, GAL, MAN no ELSD; cromatograma B: separação dos furânicos HMF e FUR no detector PDA. ....	42
<b>Figura 12.</b> Cromatogramas típicos obtidos na coluna HPX-87H dos hidrolisados das amostras A: BMA15 e B: BMA45. Picos: 1. GLI, 2. XIL e 3. ARA. ....	43

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Diferentes procedimentos analíticos para análise de biomassa.....	7
<b>Tabela 2.</b> Caracterização dos diferentes genótipos de cana-de-açúcar .....	16
<b>Tabela 3.</b> Variáveis e níveis utilizados no planejamento fatorial completo 2 <sup>2</sup> para o estudo da fase móvel.....	23
<b>Tabela 4.</b> Teores de umidade das amostras secas na condição de ar livre e em estufa. .	27
<b>Tabela 5.</b> Variáveis e níveis utilizados nos planejamentos fatoriais completos 2 <sup>2</sup> com ponto central (triagem 1 e 2) para o estudo do tempo de extração com água (t.a) e com etanol (t.e) na remoção de extrativos da biomassa.....	28
<b>Tabela 6.</b> Coeficientes da regressão linear no planejamento executado na triagem 2. .	29
<b>Tabela 7.</b> Variáveis, níveis e resposta do CCD para a otimização da determinação do extrativos. ....	30
<b>Tabela 8.</b> Avaliação dos coeficientes estimados para o planejamento CCD. ....	30
<b>Tabela 9.</b> ANOVA do modelo construído para o planejamento CCD. ....	31
<b>Tabela 10.</b> Teor de extrativos das amostras de bagaço de cana-de-açúcar da variedade RB867515 nas três condições de secagem.....	32
<b>Tabela 11.</b> Aplicação dos procedimentos desenvolvido para determinação do teor de extrativos do bagaço de diferentes genótipos de cana-de-açúcar.....	33
<b>Tabela 12.</b> Teor de extrativos presentes no bagaço de cana-de-açúcar encontrados na literatura. ....	34
<b>Tabela 13.</b> Teor de lignina insolúvel e solúvel de bagaço de cana-de-açúcar da variedade RB867515 em três condições de secagem. ....	35
<b>Tabela 14.</b> Teores de lignina obtidos para o bagaço de cana-de-açúcar livre de extrativos. ....	36
<b>Tabela 15.</b> Valores obtidos por diferentes autores na quantificação do teor de lignina no bagaço de cana-de-açúcar. ....	36
<b>Tabela 16.</b> Teor de cinzas para diferentes variedades de bagaço de cana-de-açúcar.....	37
<b>Tabela 17.</b> Teor de cinzas presentes no bagaço de cana-de-açúcar por diversos autores. ....	37
<b>Tabela 18.</b> Variáveis e níveis utilizados para o estudo da influência do tempo de início da adição de acetoneitrila e sua concentração na resposta.....	39

<b>Tabela 19.</b> Modelos de calibração para os carboidratos separados na coluna HPX-87H. .....	43
<b>Tabela 20.</b> Teor de carboidratos e polissacarídeos presentes no hidrolisado do bagaço da cana-de-açúcar de amostras secas e sem de extrativos. ....	44
<b>Tabela 21.</b> Variação nos teores de carboidratos presentes no hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar.....	45
<b>Tabela 22.</b> Constituintes químicos do bagaço de cana-de-açúcar, base biomassa seca com extrativos. ....	46
<b>Tabela 23.</b> Teores de grupos acetil e ácidos urônicos presentes no bagaço de cana-de- açúcar encontrados na literatura. ....	47

## RESUMO

BARBOSA, Paula Santana, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2018. **Procedimentos para caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar: estudos para otimização e padronização.** Orientador: Reinaldo Francisco Teófilo. Coorientadores: Márcio Henrique Pereira Barbosa e Luiz Alexandre Peternelli.

Um estudo dos procedimentos para caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar é apresentado. O objetivo é quantificar com confiabilidade e economia de consumíveis e energia os componentes majoritários presentes neste tipo de biomassa. A caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar é necessária para tomada de decisão em programas de melhoramento genético e para indicação da melhor utilização deste resíduo. Neste trabalho, procedimentos genéricos empregados para a biomassa de diversas espécies, lenhosas ou não, foram ajustados especificamente para a biomassa de cana-de-açúcar. Os procedimentos para determinação de extrativos, lignina solúvel e insolúvel, carboidratos e cinzas foram aplicados para cinco variedades diferentes de cana-de-açúcar. Para a análise de extrativos o tempo de extração foi otimizado com auxílio de planejamentos experimentais. A condição ótima para biomassa de cana-de-açúcar com até 20% de extrativos foi de 11,5 h de extração em água seguida por 9 h em etanol. As porcentagens de extrativos das variedades estudadas variaram de 8,67 a 19,49%. Os procedimentos para determinação de cinzas, lignina insolúvel e solúvel seguiram aqueles já descritos na literatura e as porcentagens encontradas variaram respectivamente de 2,13 a 3,63%; 18,28 a 23,33% e 1,82 a 2,49%. Para análise de carboidratos, um método de separação por cromatografia líquida foi desenvolvido e otimizado para redução do tempo de retenção dos compostos furânicos gerados na hidrólise ácida. A condição ótima indicou uma eluição isocrática da fase móvel com solução aquosa contendo 15% de acetoneitrila. Este procedimento reduziu em cerca de 30% o tempo de retenção dos compostos furânicos sem afetar o tempo de retenção dos carboidratos. As porcentagens de glicanas, xilanas e arabinanas na biomassa livre de extrativos, variaram respectivamente de 32,74 a 35,75%; 21,40 a 23,44% e 6,48 a 6,82%. Galactana e manana não foram detectadas. Os resultados de todos os procedimentos apresentaram excelente precisão com desvio padrão relativo variando de 0,54 a 9,02% e valores similares à literatura. Os balanços de massa totais considerando como base a biomassa com extrativos, apresentaram valores entre 89,7 a 92,8%. Estes resultados foram considerados aceitáveis em relação à literatura, visto que as determinações dos grupos acetil e ácidos urônicos não foram realizadas.

## ABSTRACT

BARBOSA, Paula Santana, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2018. **Procedures for chemical characterization of sugarcane bagasse: studies for optimization and standardization.** Adviser: Reinaldo Francisco Teófilo. Co-advisers: Márcio Henrique Pereira Barbosa and Luiz Alexandre Peternelli.

A study of the procedures for the chemical characterization of sugarcane bagasse is introduced. The objective is to quantify, with reliability and energy savings and consumables, the main components present in this type of biomass. The chemical characterization of sugarcane bagasse is necessary for decision making in genetic breeding programs and for indication of the best use of this residue. In this work, the generic procedures employed for biomass of several species, wood or not, was specifically adapted for biomass of sugarcane. The procedures for the determination of extractives, soluble and insoluble lignin, carbohydrates and ashes was applied to five different varieties of sugarcane. For analysis of extractives, the time of extraction was to optimize with the aid of experimental design. The optimal condition for biomass of sugarcane with up to 20% of extractives was 11.5 h of extraction in water followed by during 9 h in ethanol. The percentages of extractives of the varieties studied ranged from 8.67 to 19.49%. The procedures for determination of ash, insoluble and soluble lignin followed those already described in the literature and the percentages found varied respectively from 2.13 to 3.63%; 18.28 to 23.33% and 1.82 to 2.49%. For carbohydrate analysis, a method of separation by liquid chromatography was developed and optimized to reduce the retention time of the furanic compounds generated in the acid hydrolysis. The optimal condition indicated an isocratic elution of the mobile phase with aqueous solution containing 15% acetonitrile. This procedure reduced the retention time of the furanic compounds by about 30% without affecting the retention time of the carbohydrates. The percentages of glycans, xylans and arabinans in extractive free biomass ranged respectively from 32.74 to 35.75%; 21.40 to 23.44% and 6.48 to 6.82%. Galactana and manana were not detected. The results of all procedures presented excellent accuracy with relative standard deviation ranging from 0.54 to 9.02% and similar values to the literature. The total mass balances considering biomass with extractives was 89.7 to 92.8%. These results were considered acceptable in relation to the literature, since the determinations of acetyl groups and uronic acids were not performed.

## 1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas têm-se observado um aumento do interesse mundial pelo desenvolvimento na produção de biocombustíveis a partir de fontes renováveis. Os prejuízos ambientais causados pelo aumento da concentração dos gases responsáveis pelo efeito estufa e as fontes finitas de reservas de petróleo têm incentivado a utilização de insumos renováveis e sustentáveis (RAGAUSKAS et al., 2006; KRALOVA; SJOBLUM, 2010; MOE et al., 2012; BEZERRA; RAGAUSKAS, 2016). Devido a essa necessidade, a busca por uma biomassa com uma composição adequada e produzida com viabilidade econômica tem atraído o interesse de governos e empresários (VERMA et al., 2012; PARAJULI et al., 2015; ULLAH et al., 2015; BACOVSKY et al., 2016; CHEN; FU, 2016).

Uma das fontes de biomassa mais viável economicamente do ponto de vista das biorrefinarias é a obtida pela cana-de-açúcar devido à sua alta produção, facilidade logística e composição química (OKUNO, 2016). No ano de 2017, foram produzidos aproximadamente 84 t/ha de cana, gerando cerca de 110 a 160 kg/t de bagaço seco (CONAB, 2017b).

A cana-de-açúcar é uma gramínea de origem asiática e apresenta-se como um recurso energético abundante. Sua composição é representada por aproximadamente 73 a 76% de água, 10 a 16% de sólidos solúveis, principalmente sacarose e 11 a 16% de fibras (seca) (CHEN; CHOU, 1993).

Com a intenção de fortalecer o setor sucroalcooleiro, alguns estudos estão direcionados para produção de cana-energia, visando obter uma biomassa com maiores teores de fibra no colmo, ao comparada com a cana convencional. Sendo possível aumentar o potencial produtivo a partir das fibras, com foco na produção de bioeletricidade, biocombustíveis e químicos de segunda geração. A cana-energia pode atingir o dobro do teor de fibras obtido na cana tradicional, gerando quantidades de bagaço muito superiores, até quatro vezes maior por unidade de área plantada (KIM; DAY, 2011; VIATOR; RICHARD, 2012).

A fração fibrosa seca é altamente energética e caracteriza-se por apresentar em sua composição 35,0 a 46,4 % de celulose; 20,6 a 35,8 % de hemiceluloses; 15,7 a 28,6 % de lignina; 1,6 a 57,9% de extrativos e 0,8 a 5,96 % de cinzas (SASAKI et al., 2003; MASARIN et al., 2011; PAULA et al., 2011; PITARELO et al., 2012; CHONG et al., 2013; ANDRADE; COLODETTE, 2014; KUCHELMEISTER; BAUER, 2015; ROCHA et al., 2015; HOANG et al., 2017). Portanto tem potencial para ser convertida em

biocombustíveis por meio de processos bioquímicos (hidrólise ácida ou enzimática) ou termoquímicos (ZHENG et al., 2009; RABELO et al., 2011; CANILHA et al., 2012).

O bagaço de cana-de-açúcar pode ser utilizado para diversos fins como fonte de energia. Destaca-se a queima direta, a obtenção do etanol de segunda geração (E2G), e a produção de hidrocarbonetos (DE OLIVEIRA et al., 2005; BALAT; BALAT, 2009; CATRINCK et al., 2017). Além disso, a composição química da biomassa da cana-de-açúcar pode ser modificada em programas de melhoramento genético, o que torna esta gramínea estrategicamente importante em programas governamentais e industriais. Neste contexto, a caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar é necessária para tomada de decisão em programas de melhoramento genético e para indicação da melhor utilização deste resíduo.

Os procedimentos encontrados na literatura atualmente, são genéricos e indicados para a biomassa de diversas espécies lenhosas, como madeira de eucalipto e pinus (TAPPI, 2012) e não lenhosas como capim, cana-de-açúcar, milho e sorgo (SLUITER et al., 2010).

As análises para caracterização química de biomassa florestal e agrícola estão baseadas principalmente nos procedimentos NREL - *National Renewable Energy Laboratory*, TAPPI - *Technical Association of the Pulp and Paper Industry* e ASTM - *American Society of Testing and materials*. Os procedimentos TAPPI são padronizados para madeiras e polpas. Já a ASTM e o NREL, são aplicáveis para biomassa em geral.

Apesar disso, vários autores utilizam os procedimentos TAPPI para algumas análises de bagaço de cana-de-açúcar, já que não existe um procedimento padrão para cana (ALVES et al., 2010; BATALHA et al., 2015; DE CARVALHO et al., 2015).

Esse trabalho se justifica devido à necessidade de definir condições e desenvolver um procedimento de caracterização química da biomassa de cana-de-açúcar, uma vez que não há um método específico para análise de cana-de-açúcar na literatura. Com isso, será possível a quantificação precisa dos principais constituintes presentes no bagaço. Uma quantificação com maior confiabilidade torna possível uma melhor avaliação da matéria-prima e uma melhor aplicabilidade para tal material de acordo com sua composição.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

O objetivo deste trabalho é estudar procedimentos genéricos de caracterização química de biomassas a fim de torná-los específicos para quantificar com confiabilidade e economia, os componentes majoritários presentes no bagaço de cana-de-açúcar.

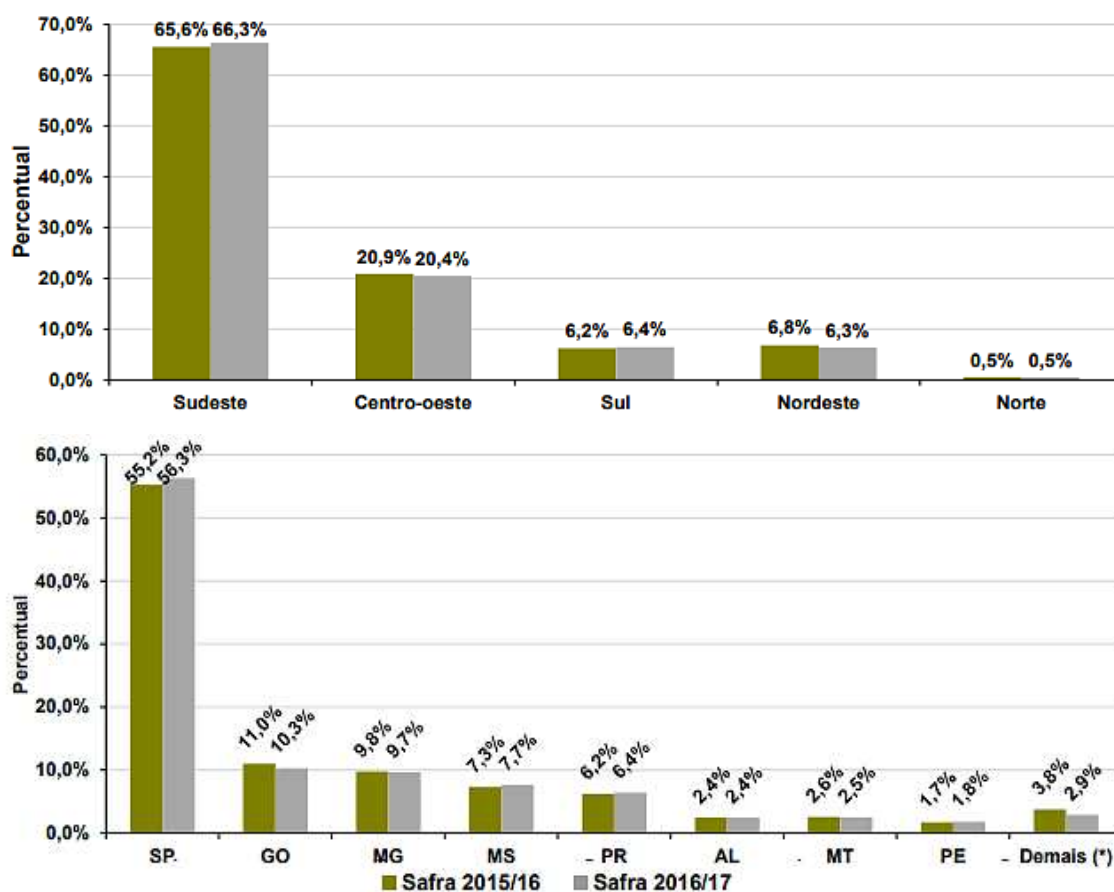
### **2.2. Objetivos específicos**

- Estudar o tempo de extração em água seguida de etanol empregando planejamento experimental;
- Definir uma condição ótima para remoção do extrativo presente no bagaço de cana-de-açúcar;
- Avaliar se diferentes condições de secagem interferem na quantificação de extrativos e lignina;
- Desenvolver um método para a determinação de carboidratos utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), a fim de reduzir o tempo de retenção dos compostos furânicos e conseqüentemente o tempo total de análise;
- Quantificar com precisão e confiabilidade os constituintes majoritários presentes na biomassa, i.e., celulose, hemiceluloses, lignina, extrativos e minerais.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Cana-de-açúcar

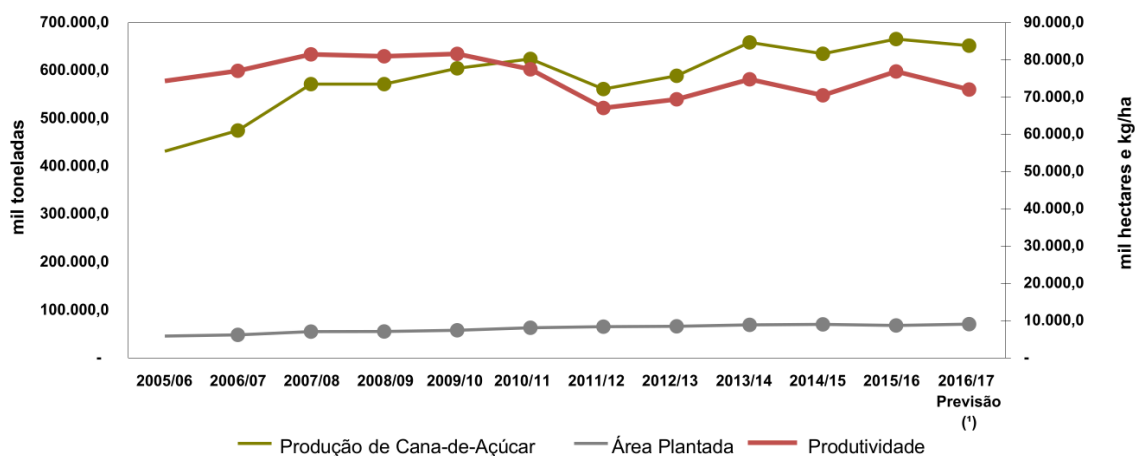
A cana-de-açúcar foi introduzida no Brasil no início da colonização. Em 1515 os primeiros exemplares de cana chegaram ao país vindos da ilha da Madeira (Portugal). No ano de 1532 foi construído o primeiro engenho para processamento da cana, na capitania de São Vicente. Historicamente, a cana-de-açúcar destacou-se como um dos principais produtos agrícolas do Brasil e, hoje, o país ocupa a posição de maior produtor mundial da cultura, seguido por Índia e China. A produção é concentrada na região Sudeste, principalmente no estado de São Paulo, como apresentado na Figura 1, mas a cultura se estende em todas as regiões do país (Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB, 2017b; Conselho de Informações sobre Biotecnologia – CIB, 2009).



**Figura 1.** Produção de cana-de-açúcar por região e por estado (CONAB, 2017b)

Em relação a última safra (2016/17), a produção de cana-de-açúcar foi de 657,2 mil toneladas e a previsão estimada para a safra 2017/18 é de 635,6 milhões de toneladas, representando uma redução de 3,3%. Estima-se que a área a ser colhida será de 8,74 milhões de hectares, ao compará-la com a safra 2016/17 observa-se uma queda de 3,4%

e a produtividade esperada para a safra 2017/18 é de 72.734 kg/ha (CONAB, 2017a). A Figura 2 representa os dados de área, produtividade e produção de cana-de-açúcar de 2005 a 2016/17.



**Figura 2.** Evolução da área, produtividade e produção de cana-de-açúcar ao longo dos anos (CONAB, 2017b).

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma gramínea com característica semiperene pois permite vários cortes sem a necessidade de replantio e possui bom desenvolvimento em solos com boa aeração e boa drenagem (SCORTECCI et al., 2012; BHOWMIK et al., 2016). Porém, o rendimento obtido na primeira colheita é o maior e decresce ao longo dos anos, até a necessidade de reforma do canavial. Geralmente a produção é satisfatória por cinco ou seis anos consecutivos (CARVALHO et al., 2011). A cultura, por ser adaptada aos climas tropical e subtropical, demanda grande volume de água para bom desenvolvimento vegetativo e expressiva produção de biomassa (TEJERA et al., 2007).

A sua estrutura é composta de partes subterrâneas, como raízes e rizomas, e partes aéreas como colmo, folhas e flores (BAKKER, 1999; MOZAMBANI et al., 2006). O desenvolvimento da planta pode ser influenciado por diversos fatores, sendo eles: propriedades físicas, químicas e microbiológicas do solo, idade fisiológica, condições climáticas durante o desenvolvimento e maturação (HUMBERT, 1963; ALEXANDER, 1973; INMAN-BAMBER; SMITH, 2005). Devido a essas características, o setor sucroalcooleiro brasileiro apresenta dois períodos de colheita, de setembro a março para a região Norte/Nordeste, e de abril a novembro para o Centro-Sul (BACCHI; ALVES, 2004; BACCARIN et al., 2011; MORAES, 2011).

Há diversas variedades de cana-de-açúcar, o que contribui para aumentar a produtividade do setor sucroalcooleiro. Dentre as variedades, existem diferenças

significativas em relação ao crescimento frente ao déficit hídrico e, quanto a composição química dos sólidos solúveis e insolúveis (INMAN-BAMBER; SMITH, 2005; SILVA et al., 2008).

### **3.1.1. Bagaço de cana**

O bagaço é o principal subproduto gerado pelas usinas de cana-de-açúcar. A produção desse resíduo é em média 280 kg de bagaço úmido por tonelada de cana moída (RABELO et al., 2011) e 110 a 160 kg de bagaço base seca (OKUNO, 2016). Apesar das tentativas de aproveitamento desse resíduo, ainda existe um grande excedente, que se não for devidamente manejados, pode causar problemas ambientais e de estocagem (SUN et al., 2004).

Esse resíduo lignocelulósico fibroso é obtido do colmo da cana-de-açúcar após a etapa de moagem e extração do caldo (SUN et al., 2004). Consiste em um material heterogêneo formado por celulose, hemicelulose ou polioses, lignina, orgânicos (extrativos) e inorgânicos (cinzas) (MARK, 1983; CARDONA et al., 2010). Sendo que, os carboidratos representam a maior parte da massa, constituindo-se uma fonte abundante e renovável de matéria-prima para a utilização em processos biotecnológicos (LEE, 1997).

A composição desse material pode variar de acordo com o período da safra, tipo de solo, estágio de desenvolvimento da planta, tipo de colheita, região e condições climáticas. Devido a essa variação destaca-se a importância da caracterização prévia da matéria-prima para que se possa obter o melhor aproveitamento na indústria (AGUIAR FILHO, 2008).

Alternativas para a utilização do bagaço de cana-de-açúcar como matéria-prima para diversos produtos de maior valor agregado, tem sido buscadas. Como a fabricação de celulose e papel, ração animal, produção energética (briquetes, *pellets* e etanol de segunda geração) e confecção de compósitos (CARASCHI et al., 1996; PANDEY et al., 2000; ANDRADE et al., 2001; TITA et al., 2002; ALMEIDA, 2008; BRIENZO et al., 2009; CHANDEL et al., 2012; FIORELLI et al., 2013).

### **3.2. Procedimentos para análise de biomassa**

Na literatura, atualmente, existem vários procedimentos genéricos para obter a caracterização química de biomassa lignocelulósica. Podendo ser de origem lenhosa

(madeira de coníferas e folhosas), não lenhosa como gramíneas (trigo, milho, cana-de-açúcar, arroz, cevada, sorgo, etc.) ou originadas de resíduos vegetais (bagaço de cana-de-açúcar, palha de trigo, milho. etc.). Os principais componentes químicos das biomassas são celulose, hemicelulose e lignina, além de cinzas e extrativos (SLUITER et al., 2010).

Os procedimentos mais utilizados mundialmente são: TAPPI, ASTM e NREL. Sendo que nenhum deles apresentam documentos específicos para análise de bagaço de cana-de-açúcar. Um comparativo entre os principais procedimentos analíticos utilizados para análise de biomassa é apresentado na Tabela 1.

**Tabela 1.** Diferentes procedimentos analíticos para análise de biomassa

TAPPI		ASTM*		NREL	
Norma	Título	Norma	Título	Norma	Título
T 204	Solvent extractives of wood and pulp	D 1107	Ethanol-Toluene Solubility of Wood	TP-510-42619	Determination of Extractives in Biomass
		E1690	Determination of Ethanol Extractives in Biomass		
T 207	Water solubility of wood and pulp	D1110	Water Solubility of Wood		
T 264	Preparation of wood for chemical analysis	D1105	Preparation of Extractive-Free Wood	-	-
T 211	Ash in wood, pulp, paper and paperboard: combustion at 525°C	D1102	Ash in Wood	TP-510-42622	Determination of Ash in Biomass
		E1755	Ash in Biomass		
T 222	Acid-Insoluble Lignin in Wood and Pulp	D1106	Acid-Insoluble Lignin in Wood	TP-510-42618	Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass
		E1721	Determination of Acid-Insoluble Residue in Biomass		
T 250	Chromatographic Analysis of Purified Pulp	D5896	Carbohydrate Distribution of Cellulosic Material		
		E1758	Determination of Carbohydrates in Biomass by High Performance Liquid Chromatography		

\*As normas ASTM são classificadas em D e E. Sendo que, D, indica que o procedimento é aplicado para madeiras. A denominação E, sugere a aplicação em madeiras de coníferas e folhosas, materiais herbáceos (gramíneas), resíduos agrícolas (palha de milho, de trigo e bagaço) e lixo (caixa de papelão, papel de jornal, resíduos de escritório).

Na Tabela 1 está descrito diferentes procedimentos para quantificação de extrativos, cinzas, carboidratos, lignina solúvel e insolúvel. Os procedimentos são

fornecidos por laboratórios de referência reconhecidos internacionalmente. Foi observado em todos laboratórios, que os procedimentos referente a biomassa são genéricos, ou seja, aplicáveis para diversas biomassa de origem lenhosa ou vegetal.

### **3.3. Determinação de extrativos e cinzas**

Os extrativos são componentes orgânicos intermediários da biomassa, oriundos do metabolismo vegetal, depositados nas lamelas médias, no interior das células e em canais presentes nos vegetais. São solúveis em solventes orgânicos e água e pertencem a diferentes classes de compostos como ácidos graxos, ésteres, álcoois, esteroides, hidrocarbonetos de elevada massa molecular e outros. Esses compostos são responsáveis pelas diversas características das plantas, tais como cor, cheiro, sabor, resistência ao apodrecimento e outros. Sua quantidade e composição relativa dependem de diversos fatores como espécie, idade da planta e região de ocorrência (GÓMEZ RUEDA, 2010).

O teor de extrativos é um parâmetro importante, pois podem prejudicar a produção de bioetanol a partir de material lignocelulósico. Alguns tipos destes orgânicos podem diminuir a atividade enzimática durante o processo de hidrólise (CHERDCHIM et al., 2012).

Já no âmbito da indústria de celulose e papel, os extrativos são responsáveis pela formação do pitch (manchas) no papel, o que é indesejável para este setor. Além de causar redução dos níveis de produção, maiores custos operacionais, incrustações em equipamentos e maior incidência de defeitos de qualidade (HILLIS; SUMIMOTO, 1989; FREIRE et al., 2002; CRUZ et al., 2006; BARBOSA et al., 2008; JANSSON; NILVEBRANT, 2009).

É relevante ressaltar que a remoção de extrativos da amostra de biomassa é necessária para obter medidas mais confiáveis dos componentes estruturais presentes. Algumas classes desses orgânicos poderiam ser condensados ou precipitados sob as condições ácidas e isso causaria uma superestimação da lignina presente na biomassa. Adicionalmente, os extrativos presentes no bagaço de cana-de-açúcar podem conter açúcares não estruturais, como a sacarose, portanto se não forem devidamente removidos, causarão uma determinação incorreta no teor de carboidratos da amostra (THAMMASOUK et al., 1997; TAMAKI; MAZZA, 2010).

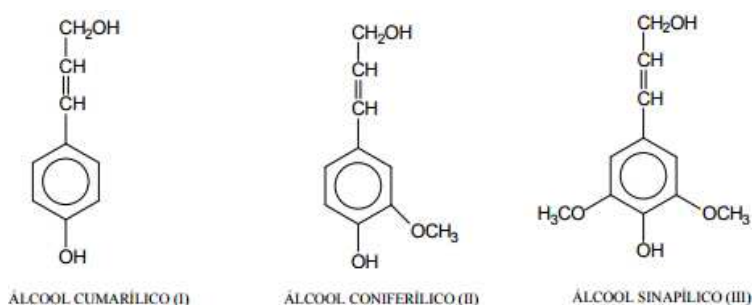
Outro componente presente em menor quantidade na biomassa, mas que precisam ser quantificados são os minerais ou cinzas. Absorvidos pelas plantas através das raízes ou folhas compõem a estrutura celular ou são importantes em diversos processos

fisiológicos essenciais à vida. Na biomassa as cinzas são representadas pelos sais, oxalatos, sulfatos, carbonatos e silicatos de potássio, sódio, manganês e cálcio. De acordo com Fengel e Wegener (1989) estes componentes e os extrativos representam entre 5 a 20% do material lignocelulósico.

### 3.4. Determinação de lignina

Dentre os componentes da biomassa lignocelulósica, a lignina é a segunda macromolécula mais abundante, na qual consiste em um polímero amorfo e hidrofóbico com estrutura complexa altamente ramificada. Formada principalmente por moléculas aromáticas e grupos alifáticos, com diversos monômeros de fenilpropano substituídos, ligados por diferentes tipos de ligações, como carbono-carbono (C-C), éter (ROR') e ligações etilênicas (CH<sub>2</sub>) (FENGEL; WEGENER, 1989; KHAN; ASHRAF, 2007; LIU et al., 2008). A maior parte das ligações presentes na lignina proveniente de madeiras são do tipo éter, denominadas de β-O-4 ou α-O-4 (BOERJAN et al., 2003). Já para a cana as ligações não são conhecidas. A composição da lignina em espécies herbáceas, como o bagaço de cana varia em torno de 10 a 40% em massa (YAMAN, 2004).

Estudos revelam que a lignina é formada por meio da polimerização desidrogenativa de três precursores primários, são eles: álcool p-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico, representados na Figura 3. Estes álcoois dão origem aos grupos p-hidroxifenila (H), guaiacila (G) e siringila (S), respectivamente, de acordo com a substituição do anel aromático (ASSUMPÇÃO et al., 1988; FENGEL; WEGENER, 1989; PILÓ-VELOSO et al., 1993).



**Figura 3.** Precursores primários da lignina (FENGEL; WEGENER, 1989).

A principal diferença entre as ligninas de diversas espécies vegetais se dá de acordo com a presença e proporção dos grupos S-G-H. As ligninas de gramíneas, como o bagaço da cana-de-açúcar, é do tipo H-G-S, pois possui os três precursores. Porém a proporção de unidades de p-hidroxifenila (H) é menor ao comparado com as unidades de

guaiacila (G) e siringila (S) (SJOSTROM, 1981; CURVELO, 1992; PILÓ-VELOSO et al., 1993; DEL RIO et al., 2005).

A lignina tem função de extrema importância para a planta, pois confere rigidez e resistência mecânica, além de proteger os tecidos vegetais contra degradação química ou biológica (CANILHA et al., 2010; PITARELO, 2013).

A presença de lignina na biomassa de gramíneas pode ser identificadas principalmente por *via* química. Como espectroscopia, pois devido sua estrutura aromática, absorve na região do ultravioleta (UV) ou método *klason* que consiste no isolamento da lignina por meio da hidrólise total dos carboidratos (D'ALMEIDA, 1988).

### **3.5. Análise de carboidratos da biomassa lignocelulósica**

Os carboidratos são as biomoléculas mais abundantes na natureza e possuem como fórmula geral  $(CH_2O)_n$ . Eles são predominantemente cetonas ou aldeídos com grupos hidroxilas ligados as suas estruturas (poliidroxicetonas ou poliidroxialdeídos, respectivamente). São classificados em três grupos, de acordo com o seu tamanho: monossacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos (NELSON; COX, 2008).

Os monossacarídeos são unidades mais simples dos carboidratos, por apresentarem somente uma unidade de poliidroxialdeídos ou poliidroxicetonas. São sólidos cristalinos, incolores e solúveis em água. (NELSON; COX, 2008). Destaca-se como alguns exemplos a glicose, xilose, arabinose, galactose e manose (SILVA et al., 2009).

Os polissacarídeos são carboidratos de alto peso molecular, formados por mais de 20 unidades de monossacarídeos. A celulose é o polissacarídeo mais abundante, possui grau de polimerização médio (DP) entre 2.000 a 15.000, dependendo da espécie vegetal e localização na parede celular. Quando a celulose é submetida a hidrólise libera um grande número de monossacáridos, neste caso a glicose. Outros exemplos de monossacarídeos são: hemiceluloses e amido (NELSON; COX, 2008).

Os oligossacarídeos são formados por cadeias curtas de monossacarídeos, ligados entre si por ligações glicosídicas. Os oligossacarídeos mais abundantes são os dissacarídeos, compostos por duas unidades de monossacarídeos. Exemplos de oligossacarídeos são: sacarose, unida por uma unidade de glicose e uma de frutose e celobiose, unidas por duas moléculas de glicose (NELSON; COX, 2008).

A análise para quantificação dos carboidratos é realizada por um método analítico denominado HPLC. Consiste em um método físico-químico de separação dos

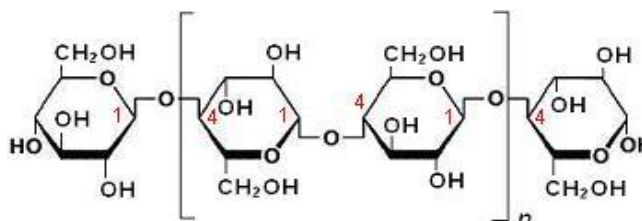
constituintes de uma mistura, através da distribuição desses constituintes em duas fases em contato, chamadas de fase móvel e fase estacionária (COLLINS et al., 2006). A separação se baseia na diferença de velocidade, gerada pelas diferenças de afinidade entre as fases móvel e estacionária. A fase estacionária, geralmente, é sólida e poder ser polar ou apolar, e a fase móvel é líquida, na qual é bombeada sobre a fase estacionária utilizando alta pressão (SKOOG et al., 2006).

O cromatograma é um gráfico gerado pelo detector, após a amostra juntamente com a fase móvel sair da coluna. A resposta obtida está em função do tempo de retenção, que corresponde ao tempo gasto desde o momento de injeção da amostra até a saída do ponto máximo do pico. A concentração dos analitos no cromatograma é proporcional à área ou a altura do pico (COLLINS et al., 2006).

O tipo de detector a ser utilizado depende da natureza da amostra. Os mais utilizados são baseados na absorção de radiação visível ou ultravioleta e o ELSD. Este último é usado em amostras que não apresentam grupos cromóforos ou que apresentam cromóforos fracos e também possibilita a análise de compostos menos voláteis que a fase móvel (SKOOG et al., 2006; GONZALEZ et al., 2011).

### 3.5.1. Celulose

A celulose  $(C_6H_{10}O_5)_n$  é uma substância fibrosa polimérica, insolúvel em água, que se encontra nas paredes celulares de plantas, particularmente em talos, caules, troncos e todas as porções lenhosas de tecidos vegetais (OSULLIVAN, 1997). É um dos biopolímeros mais abundantes na terra, possui uma cadeia longa, linear e uniforme de elevado peso molecular. Formado por várias de unidades de D-glicose, unidas entre si por ligações glicosídicas  $\beta(1-4)$ , desempenhando função estrutural nas plantas (FENGEL; WEGENER, 1989; SJOSTROM, 1993). A estrutura da celulose está representada na Figura 4.



**Figura 4.** Estrutura da celulose (FENGEL; WEGENER, 1989).

A interligação entre as moléculas de celulose ocorre através de ligações de hidrogênio. As hidroxilas são os grupos funcionais predominantes, possibilitando o

alongamento da cadeia molecular e a união com os outros componentes da matriz. A união de todos os componentes na matriz celulósica provoca diminuição da reatividade e aumento da resistência à ação de agentes biológicos (SANTOS et al., 2012).

A celulose, em termos estruturais é formada por duas fases, uma cristalina que é ordenada e está presente na maior parte da estrutura e uma amorfa, naturalmente desordenada e em menor parte da estrutura. Essas regiões não são bem definidas, mas parece haver uma transição de um arranjo ordenado das cadeias de celulose para um estado desordenado ou amorfo, no qual estas cadeias apresentam uma orientação menor. As regiões amorfas surgem como imperfeições, falhas nas microfibrilas de celulose (hemicelulose e lignina). A presença de hemiceluloses nas microfibrilas causam descontinuidade nas cadeias e a formação do complexo lignina-carboidrato, tornando a estrutura menos cristalina. Na região cristalina a fibra tem maior resistência à tração, ao alongamento e à solvatação. Na região amorfa a fibra tem maior flexibilidade e permeabilidade (GARZON FUENTES, 2009).

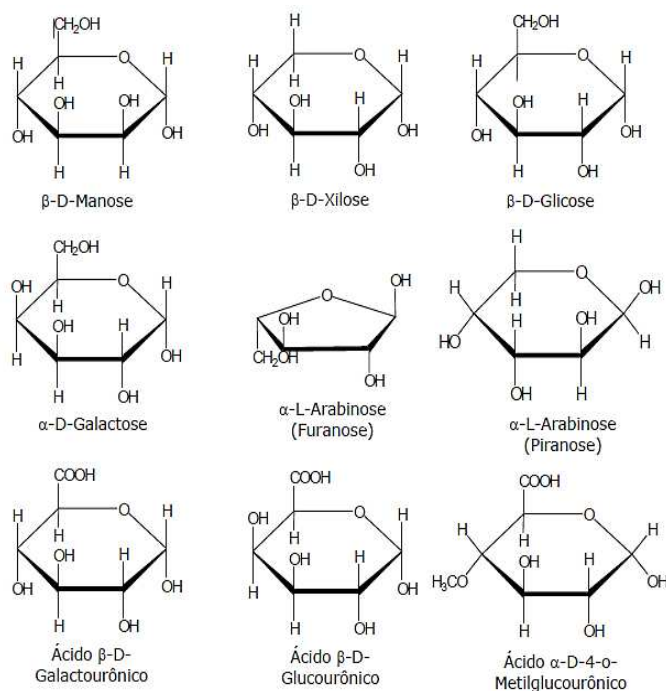
De acordo com Ogeda e Petri (2010), a celulose possui sete formas cristalinas, designadas como I $\alpha$ , I $\beta$ , II, III, IIII, IVI e IVII. Cada forma possui particularidades em relação às características físicas e químicas, como solubilidade, densidade, ponto de fusão e estrutura cristalina, além de propriedades óticas e elétricas. A proporção entre as regiões cristalina e amorfa, que determina o grau de cristalinidade. Seguindo as designações anteriores, Pitarelo (2013) afirma que celulose I (I $\alpha$  e I $\beta$ ) é o produto direto da biossíntese e por isso é denominada celulose nativa. Já as demais formas são de natureza sintética. Através de tratamentos térmicos ou alcalinos, as cadeias da celulose nativa se abrem e se recombinam de forma aleatória, dando origem a uma nova forma amorfa.

A constituição química estrutural do bagaço de cana é similar às diferentes biomassas em termos de componentes individuais, variando as percentagens dos constituintes. De acordo com Lee (1997), entre 33 e 36% do bagaço de cana é do polímero celulose, percentagem esta menor que a encontrada nas madeiras em geral.

### **3.5.2. Hemicelulose**

As polioses ou hemiceluloses, se constituem em uma mistura de sacarídeos de baixa massa molecular, os quais estão associados com a celulose e a lignina na matriz celular. As unidades de açúcares que formam as polioses podem ser subdivididas em grupos, tais como: pentoses, hexoses e deoxihexoses e ácidos urônicos (SAHA et al., 2005). São vários os monossacarídeos responsáveis pela constituição química estrutural

das hemiceluloses e são demonstrados na Figura 5, a seguir, a nomenclatura e estruturas químicas destes componentes.



**Figura 5.** Estrutura química dos componentes das hemiceluloses (D'ALMEIDA, 1988).

As xilanas ou pentoses são formadas pela condensação de unidades de xilose associadas a grupos acetil, arabinosil e glucoranosil e são os monossacarídeos predominantes na formação das hemiceluloses. Já os grupos funcionais mais abundantes são: as hidroxilas (OH), seguido das ligações acetil (COCH<sub>3</sub>) nos anéis dos açúcares e das ligações éster aos grupos acetil. Diante disso, a hemicelulose de gramíneas, como o bagaço da cana-de-açúcar, é formada majoritariamente por xilanas altamente acetiladas (PITARELO, 2013).

O bagaço de cana-de-açúcar possui conteúdo de xilanas elevado na composição de suas hemiceluloses, a qual representa entre 20 a 35% da massa seca deste complexo, tornando-o uma significativa fonte de biomassa renovável (CARAMÉZ, 1999).

Comparativamente à celulose, a estrutura química das hemiceluloses é diferente, apresentando maior quantidade de regiões amorfas, maior ramificação e menor peso molecular. Estas diferenças tornam a hemicelulose uma substância mais instável quimicamente, sofrendo hidrólise e degradação térmica com maior facilidade (YANG et al., 2007; SANTOS et al., 2012; HAGHIGHI MOOD et al., 2013). Devido a estas características, as hemiceluloses são relativamente sensíveis às condições de operação. Fatores como temperatura e tempo de reação interferem nos processos de produção de etanol de segunda geração, devido à formação de inibidores da fermentação, como

furfural e hidroximetilfurfural (HMF) (HAGHIGHI MOOD et al., 2013).

O aproveitamento das hemiceluloses para usos em produção de bioetanol, biopolímeros, emulsificantes e para aplicação na área da saúde humana tem se desenvolvido por intermédio das pesquisas possibilitando mais estudos sobre estas substâncias (KROGELL et al., 2013; GILANI; STUART, 2015).

### **3.6. Planejamento experimental**

Os planejamentos experimentais (DOE) são métodos estatísticos que se baseiam em analisar quais fatores (variáveis independentes) apresentam influência significativa nas respostas de interesse (variável dependente) (EBRAHIMI-NAJAFABADI et al., 2014; MONTGOMERY; RUNGER, 2014).

Quando um sistema possuir um grande número de fatores, é provável que alguns deles não influencie a resposta de interesse. Assim, para evitar a execução de muitos experimentos, deve-se realizar uma triagem para analisar quais são os fatores mais relevantes a serem estudados. Neste caso, é recomendado a realização de um planejamento fatorial fracionário (BARROS NETO et al., 2001).

As técnicas de planejamentos fatoriais são empregadas, principalmente, para reduzir o número de experimentos e para melhorar as características e qualidade dos produtos (MONTGOMERY, 2000).

#### **3.6.1. Planejamento fatorial completo**

O planejamento fatorial completo é uma técnica que pode ser utilizada quando há dois ou mais fatores independentes (CALADO; MONTGOMERY, 2003). Neste tipo de planejamento todas as combinações dos níveis das variáveis são realizadas, o que torna tal planejamento pouco eficiente quando se estuda mais de três variáveis.

Para realizar esse tipo de planejamento, deve-se primeiramente, estabelecer os níveis dos fatores a serem estudados no experimento, ou seja, a faixa de variação que um fator sofrerá. Normalmente é utilizado dois níveis para cada variável e são comumente codificados usando sinais (-) para níveis inferiores e (+) para níveis superiores (BARROS NETO et al., 2001).

Posteriormente deve-se analisar a influência de todos os fatores e os efeitos de interação nas respostas. Se dois níveis forem estudados para cada fator, a combinação de  $k$  fatores resultará em  $2^k$  experimentos. (TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

A relação entre os fatores e a resposta obtida é descrita por uma função ou modelo matemático. Para este tipo de planejamento utiliza-se modelos lineares com coeficientes dos efeitos principais e das interações entre os fatores. Considerando duas variáveis, denominadas de  $x_1$  e  $x_2$ , os modelos lineares sem e com o coeficiente de interação podem ser descritas conforme Equações 1 e 2, respectivamente.

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + e \quad \text{(Equação 1)}$$

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2 + e \quad \text{(Equação 2)}$$

em que,  $y$  é a resposta experimental,  $b_0$  é coeficiente correspondente a média de todas as respostas obtidas,  $b_1$  e  $b_2$  são os coeficientes relacionados as variáveis  $x_1$  e  $x_2$ , respectivamente,  $e$  é o erro associado ao modelo e  $b_{12}$  é o coeficiente referente a interação  $x_1x_2$  (TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

### 3.6.2. Planejamento Composto Central (CCD)

O planejamento composto central para  $k$  fatores é constituído por uma parte fatorial, que pode ser um planejamento fatorial completo ou fracionário de dois níveis. Uma parte axial, que são pontos situados nos eixos do sistema de coordenadas com distância  $\pm\alpha$  da origem, no qual  $\alpha = \sqrt[4]{2^k}$  e por pontos centrais, que são valores médios entre os dois níveis do planejamento. Com a utilização desses pontos centrais (níveis zero) é possível verificar se o modelo possui curvatura e também utilizá-los para estimativa do erro puro (BARROS NETO et al., 2001; TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

As superfícies de resposta são gráficos elaborados a partir dos modelos lineares, quadráticos ou cúbicos estimados a partir de cálculos empregando os resultados do planejamento. As superfícies descrevem o comportamento da resposta considerando qualquer alteração nas variáveis dentro dos níveis estudados. A partir do gráfico de superfície de resposta é possível encontrar os níveis das variáveis que fornecem a resposta ótima desejada (TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos nos Laboratórios de Instrumentação e Quimiometria (LINQ) e de Biotecnologia e Melhoramento Vegetal (LBMV), vinculados respectivamente aos Departamentos de Química (DEQ/UFV) e de Fitotecnia (DFT/UFV) da Universidade Federal de Viçosa, localizados em Viçosa, MG.

Amostras de colmos de cana-de-açúcar da variedade RB867515 (referência comercial) foram utilizadas para o desenvolvimento dos procedimentos de caracterização química. Após esta etapa, o procedimento foi aplicado para outros clones, sendo eles: RB127032, RB127035, RB127039 e RB127045. Todos os genótipos foram obtidos do banco de germoplasma do Programa de Melhoramento Genético de Cana-de-Açúcar da UFV (PMGCA), localizado em Oratórios – MG e estão caracterizados quanto ao teor de fibras e sacarose na Tabela 2. A plantação foi estabelecida em junho de 2014 e as amostras foram colhidas com 12 meses de idade em cana-soca (rebrotas). O plantio estava localizado a 20° 44' latitude sul e 42° 50' longitude oeste, a 400 m de altitude.

**Tabela 2.** Caracterização dos diferentes genótipos de cana-de-açúcar

Genótipo	Tipo	Teor de fibras <sup>1</sup>	Teor de sacarose <sup>2</sup>
RB127032	Clone em teste*	17,45	9,25
RB127035	Clone em teste*	16,68	7,86
RB127039	Cana-energia**	33,41	7,38
RB127045	Clone em teste*	11,11	10,43
RB867515	Variedade comercial***	17,54	12,39

\*Clone em processo de melhoramento genético;

\*\*Clone com elevado teor de fibras visando desenvolvimento da cana-energia;

\*\*\*Variedade comercial utilizada em cerca de 25 % da área total cultivada com cana-de-açúcar no Brasil.

<sup>1</sup> Teor de fibra médio, estimado de acordo com a análise tecnológica realizada em laboratório de usina, com base no método Consecana obtido junto ao programa de melhoramento genético.

<sup>2</sup> Teor de sacarose médio estimado de acordo com a análise tecnológica realizada em laboratório de usina, com sacarímetro.

### 4.1. Preparo da amostra de bagaço de cana-de-açúcar

Quinze colmos da RB867515 foram selecionados aleatoriamente, colhidos e despontados manualmente. Posteriormente os colmos foram picados em ensiladeira, homogeneizados e prensados à 250 Kgf cm<sup>-2</sup> min<sup>-1</sup> para retirada do caldo.

Imediatamente à extração do caldo dos colmos, o bagaço foi submetido à etapa de secagem. O bagaço triturado dos quinze colmos da RB867515 foi definido como amostra bruta, a qual foi secada em três condições, sendo: (i) secagem ao ar livre ~25 °C, (ii)

secagem em estufa a 45 °C por 24 h e (iii) secagem em estufa a 75 °C por 72 h. Para cada condição, foi utilizado aproximadamente 2 kg de amostra bruta.

Para a secagem ao ar livre, a amostra bruta foi espalhada em padiolas com camadas inferiores a 5 cm de altura, colocadas em ambiente coberto com ventilação natural. O material foi misturado manualmente duas vezes ao dia, para garantir a secagem uniforme e impedir o crescimento microbiano. A cada 24 h de secagem, foi determinado, em triplicata, o teor de umidade ou o teor de sólidos, por gravimetria, até que tenha atingido umidade inferior a 10 % ou teor de sólidos maior que 90 %. Para todos os experimentos foi usado como referência base os procedimentos descritos pelo *National Renewable Energy Laboratory* (NREL) (HAMES et al., 2008). O tempo em dias necessário para a secagem da amostra, depende da determinação do teor de umidade.

Para secagem em 45 °C por 24 h e 75°C por 72 h, o procedimento foi realizado da mesma maneira, porém as amostras foram colocadas em uma bandeja para secar em uma estufa de convecção forçada nas temperaturas pré-estabelecidas. A determinação do teor de umidade foi feita após 24 h para a primeira condição e 72 h para a segunda, até peso constante.

Em seguida, as amostras brutas foram identificadas de acordo com o tipo de secagem, moídas em moinho do tipo Willey e peneiradas. O peneiramento foi realizado utilizando peneiras de 20 e 80 mesh. A biomassa foi colocada na peneira de 20 mesh até atingir a altura de aproximadamente 3 cm, o sistema foi agitado por 15 min. O material retido na peneira de 80 mesh foi usado para análise de extrativos, lignina e carboidratos. A fração de finos (material retido na peneira de captura) foi utilizada para análise de cinzas. Os materiais peneirados foram armazenados em sacos do tipo *ZipLock* e mantidos à temperatura de -20 °C.

A amostra bruta seca e moída foi nomeada de acordo como o tipo de secagem, *i.e.*, BMT25 seca ao ar livre, BMT45 seca em estufa a 45 °C por 24 h e BMT75, seca em estufa a 75 °C por 72 h.

#### **4.1.1. Determinação do teor de umidade**

A determinação do teor de umidade foi baseada no procedimento NREL (SLUITER, A. et al., 2008). O seguinte método foi executado: após 24 h de exposição ao ar livre, a amostra foi homogeneizada para retirada de três alíquotas com aproximadamente 10 g cada e transferidas para um cadinho previamente seco e pesado. Os cadinhos contendo a amostra foram colocados em estufa de convecção forçada a 105±2 °C por 4 horas. Após esse tempo, os cadinhos foram retirados da estufa e pesados,

para realização do cálculo de teor de umidade conforme apresentado na Equação 3. Os cadinhos com valores de umidade menores que 10 % foram recolocados na estufa por mais 1 hora. A pesagem foi repetida até peso constante, ou seja, até que a diferença entre as duas medidas consecutivas do teor de umidade fosse menor ou igual a 1 %. Os valores de umidade maiores que 10%, indicam que o bagaço não está seco o suficiente, portanto, as amostras com estes valores foram deixadas ao ar livre por mais 24 h, até a próxima pesagem.

$$\%umidade = 100 - \left( \frac{m_{s(a+c)} - m_c}{m_{u(a)}} \times 100 \right) \quad \text{(Equação 3)}$$

em que,  $m_{s(a+c)}$  é a massa seca da amostra com o cadinho,  $m_{u(a)}$  é a massa úmida da amostra e  $m_c$  é massa do cadinho.

Para as condições de secagem em estufa a 45 °C e 75 °C, o teor de umidade foi determinado da mesma forma, após atingir os tempos estabelecidos de 24 e 72 horas, respectivamente.

#### 4.2. Remoção e determinação de extrativos

No desenvolvimento do procedimento para a análise de extrativos apenas a amostra BMT45 foi usada. O objetivo foi otimizar usando apenas um material. Uma massa de 3 g desta amostra (base massa seca) foi pesada e transferida para cartucho confeccionado com papel de filtro qualitativo, previamente pesado. O cartucho com a amostra foi colocado no extrator Soxhlet modelo MA044/8/50 para extração. Os volumes e temperaturas dos solventes extratores foram: 150 mL de água a 100 °C seguido de 150 mL de etanol a 80 °C.

Uma triagem dos níveis das variáveis, tempo de extração em água (t.a) e tempo de extração em etanol (t.e) foi executada com o auxílio de planejamento fatorial completo  $2^2$  com 3 experimentos no ponto central. Após a triagem, um planejamento composto central (CCD) foi aplicado para a amostra, com intuito de encontrar os níveis ótimos das variáveis capaz de remover todos os extrativos em menor tempo de análise. A resposta desses planejamentos foi o teor de extrativos utilizando como referência os procedimentos descritos pelo NREL (SLUTIER et al., 2005). O procedimento estipula que, o tempo de extração em água deve ser entre 6 a 24 horas e o tempo de extração em etanol deve ser entre 16 a 24 horas. Estes foram portanto, os níveis menos e mais utilizados para água e etanol, respectivamente, no primeiro planejamento fatorial

completo.

Ao finalizar a extração de cada corrida do planejamento, os cartuchos contendo a amostra foram retirados do Soxhlet e o material foi colocado para secar em estufa a 50 °C por 24 h. O cálculo do teor de extrativos foi realizado conforme apresentado na Equação 4.

$$\% \text{Extrativos} = \left( \frac{m_{i(a)} - (m_{f(a+ct)} - m_{ct})}{m_{i(a)}} \right) \times 100 \quad \text{(Equação 4)}$$

em que,  $m_{f(a+ct)}$  é a massa da amostra mais cartucho após extração,  $m_{ct}$  é a massa do cartucho e  $m_{i(a)}$  é a massa da amostra inicial na base seca.

Ao final do desenvolvimento do procedimento, a metodologia foi aplicada para as outras condições de secagem, i.e., ao ar e à 75 °C por 72h.

### 4.3. Determinação de Lignina

Para este estudo foram usadas as amostras BMT25, BMT45 e BMT75. Ambas passaram pela etapa de remoção de extrativos (Item 4.2) usando o procedimento otimizado.

A determinação de lignina foi realizada em duas etapas: tratamento da biomassa com ácido forte, seguido de hidrólise com ácido diluído em alta temperatura (SLUITER, A. et al., 2008).

Na primeira etapa foi pesada aproximadamente 0,3 g, base massa seca, da amostra de bagaço de cana-de-açúcar sem extrativos, em tubos de ensaio com capacidade de 100 mL. A cada tubo foi adicionado 3 mL de ácido sulfúrico 72%. Os tubos foram colocados em banho termostaticado a  $30 \pm 3$  °C durante 120 minutos. Neste tempo, a cada 5 minutos a mistura foi agitada com auxílio de um bastão de vidro. Esta etapa é importante para que ocorra a remoção de regiões amorfas (lignina e hemicelulose) e o rompimento da estrutura cristalina da celulose (SUN; CHENG, 2002; HUBBE et al., 2008; WIJAYA et al., 2014). O tempo recomendado pelo procedimento NREL é de 60 minutos.

A escolha da concentração do H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de 72% foi fundamentada em estudos já desenvolvidos. Uma vez que, em concentrações de ácido mais baixas (< 65%), a hidrólise não é eficiente, restando grandes quantidades de polissacarídeos não hidrolisados. Por outro lado, em concentrações elevadas de ácido (> 80%), foi observado um aumento no teor de lignina insolúvel e também degradação de açúcares, produzindo quantidades

significativas de HMF e furfural (LIN; DENCE, 2012).

Após a primeira etapa, os tubos foram removidos do banho e 84 mL de água deionizada foram adicionados a cada tubo. Deste modo, o ácido foi diluído a uma concentração de 4% (SLUITER, A. et al., 2008). A mistura foi homogeneizada e a boca do tubo foi coberta com uma camada dupla de papel laminado. Os tubos com a mistura foram autoclavados a 121 °C por 60 minutos. Nesta etapa ocorre a hidrólise dos carboidratos em monômeros da hemicelulose e celulose (YOON et al., 2014). Após resfriar, a autoclave foi aberta e os tubos com as misturas foram retirados e levados imediatamente para filtração a vácuo.

#### **4.3.1. Lignina insolúvel (Klason)**

Para a determinação de lignina insolúvel, a mistura hidrolisada obtida no item 4.3 foi filtrada. A filtração foi feita a vácuo em um cadinho de vidro sinterizado, previamente preparado com uma camada de aproximadamente 3 mm de espessura de fibra de óxido de alumínio ( $Al_2O_3$ ). A fibra de  $Al_2O_3$  foi usada para proteger o vidro sinterizado e evitar que a lignina não entupisse e contaminasse a área filtrante. O cadinho com a fibra de  $Al_2O_3$  foi seco em estufa a  $105 \pm 2$  °C por 6 h, pesado e, posteriormente, utilizado na filtração.

Após a filtração, os cadinhos foram novamente secos em estufa a  $105 \pm 2$  °C por 12 h, até massa constante. Em seguida, foi registrada a massa do resíduo retido no cadinho, a qual foi usada para calcular a porcentagem de lignina insolúvel na amostra.

O filtrado foi utilizado para análise de lignina solúvel e determinação de carboidratos. Um volume de aproximadamente 84 mL de cada hidrolisado foi transferido para frascos de vidro âmbar de 100 mL e armazenados em freezer a -20 °C. O tempo de armazenamento não foi superior a duas semanas (SLUITER, A. et al., 2008).

Para a determinação do teor de lignina insolúvel foi necessário realizar a correção de cinzas. Grande parte dos constituintes inorgânicos presentes no bagaço é formado por sílica, insolúvel em solventes comuns como água e álcool, por exemplo (ANDRADE; COLODETTE, 2014; DE CARVALHO et al., 2015). Desse modo, para que os resultados da composição química orgânica da biomassa seja confiável, foi descontado a superestimação causada pela sílica remanescente na lignina insolúvel. Já que esta co-precipita com a lignina durante a hidrólise ácida.

#### 4.3.1.1. Determinação de sílica na lignina insolúvel

A determinação de sílica, *i.e.*, composto inorgânico remanescente na lignina insolúvel, foi realizada conforme o seguinte procedimento. A lignina insolúvel foi retirada do cadinho de vidro com auxílio de uma espátula, transferida para cadinhos de porcelana. Em seguida os cadinhos, previamente pesados, foram colocados no forno de mufla a  $575 \pm 25$  °C durante 24 h. Após este tempo, os cadinhos foram retirados da mufla e transferidos para um dessecador até atingirem temperatura ambiente. Em seguida, foram pesados e a massa foi anotada. A diferença de massa antes e depois se refere ao composto inorgânico. A massa determinada foi usada para correção da lignina.

O teor de lignina insolúvel (*L.I*) foi calculado, por gravimetria, de acordo com a Equação 5.

$$\%L.I = \left( \frac{m_{f(a+c.o)} - m_{c.o}}{m_{i(a)}} - m_{sl} \right) \times 100 \quad \text{(Equação 5)}$$

em que,  $m_{f(a+c.o)}$  é a massa final da amostra mais cadinho com óxido de alumínio,  $m_{c.o}$  é a massa do cadinho com óxido,  $m_{sl}$  é a massa de sílica presente na lignina e  $m_{i(a)}$  é a massa inicial da amostra na base massa seca.

#### 4.3.2. Lignina solúvel

Para determinação de lignina solúvel, três alíquotas de 12,5 mL do filtrado obtido no item 4.3.1 foram transferidas, separadamente, para balões volumétricos de 50 mL. As alíquotas foram diluídas na proporção 1:3 a fim de obter uma absorbância menor do que 1. Em seguida, a solução diluída de cada alíquota foi transferida para cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico e colocada no compartimento de amostra do espectrofotômetro UV-Visível marca Ocean Optics modelo USB4000. A leitura foi realizada no modo absorbância no comprimento de onda de 240 nm. A concentração de lignina solúvel na biomassa foi determinada de acordo com a lei de Beer (Equação 6), considerando uma absorvidade a 240 nm igual a  $25 \text{ L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (SLUITER, A. et al., 2008).

$$A = \varepsilon.b.c \quad \text{(Equação 6)}$$

em que, *A* é a Absorbância da amostra,  $\varepsilon$  é a absorvidade, *c* é a concentração ( $\text{g L}^{-1}$ ) e *b* é o caminho óptico, igual a 1 cm.

Após a obtenção da concentração, foi calculado o teor de lignina solúvel (*LS*) de acordo com a Equação 7.

$$\%LS = \frac{f \cdot c \cdot v_t \cdot 100}{m_i} \quad \text{(Equação 7)}$$

em que, *f* é o fator de diluição, *c* é a concentração em g L<sup>-1</sup>, *V<sub>t</sub>* é o volume total em litros do hidrolisado e *m<sub>i</sub>* é a massa inicial da amostra em gramas.

#### 4.3.3. Lignina total

A determinação da lignina total (*LT*) foi realizada através do somatório da lignina solúvel (*LS*) e lignina insolúvel (*LI*), descontada o conteúdo de sílica (*SL*), como apresentado na Equação 8.

$$\%LT = LS + LI - SL \quad \text{(Equação 8)}$$

#### 4.4. Análise dos carboidratos

Para o desenvolvimento do método de quantificação de carboidratos foi utilizado um cromatógrafo a líquido de alta eficiência (HPLC) marca Shimadzu modelo Prominence. Os detectores utilizados foram o UV-visível como arranjo de fotodiodos (PDA) para verificar o tempo de retenção dos compostos furânicos e o ELSD, usado para quantificar os carboidratos. Um estudo foi realizado para a escolha da melhor coluna para separação e quantificação. As colunas cromatográficas estudadas foram a Bio-Rad Aminex HPX-87P e HPX-87H, ambas com dimensão de 300×7,8 mm e tamanho de partícula de 9 µm. As colunas são preenchidas com um copolímero de divinilbenzeno-estireno sulfonado. Na coluna HPX-87P o grupo sulfônico é ligado ao chumbo, enquanto na HPX-87H, o mesmo grupo é ligado a íons hidrônio.

As condições cromatográficas para a coluna HPX-87P foram: temperatura do forno de 80 °C, fluxo de 0,85 mL min<sup>-1</sup>. Para a coluna HPX-87H as condições foram: temperatura do forno de 60 °C, fluxo de 0,80 mL min<sup>-1</sup>. O volume de injeção da amostra para ambas as colunas foi de 10 µL.

A fase móvel utilizada foi uma mistura de água e acetonitrila (ACN) filtrada a vácuo em filtros de 0,45 µm, posteriormente desgaseificada em ultrassom por 5 minutos. A proporção H<sub>2</sub>O/ACN e o tempo para iniciar a adição de ACN na proporção definida (*t*) foi determinado através de um planejamento fatorial completo 2<sup>2</sup> com três experimentos

no ponto central. Os ensaios foram realizados utilizando uma solução preparada com padrões dos carboidratos, glicose, xilose, arabinose, galactose, manose, além dos compostos furânicos, HMF e furfural. Este estudo foi realizado usando a coluna HPX-87P devido a sua alta capacidade de separação destes carboidratos. As variáveis e os níveis estudados são apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Variáveis e níveis utilizados no planejamento fatorial completo 2<sup>2</sup> para o estudo da fase móvel

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
t (min)	0	6	12
% ACN	15	20	25

t, é o tempo em que se inicia a adição de ACN e %ACN, é a porcentagem de acetonitrila adicionada.

A resposta usada foi definida pela Equação 9.

$$Rtr = \frac{\sum_{i=2}^n (tp_i - tp_1)}{t_{furfural}} \times 100 \quad \text{(Equação 9)}$$

em que  $n$  é o número de picos no cromatograma,  $tp_i$  é o tempo de retenção de cada pico,  $tp_1$  é o tempo de retenção do primeiro pico e  $t_{furfural}$  é o tempo gasto até a saída do furfural, *i.e.*, último composto a sair da coluna. O objetivo foi diminuir o tempo de análise com uma boa separação entre os picos. Portanto, obter o maior valor para  $Rtr$ .

Os níveis otimizados para a fase móvel da coluna HPX-87P serão aplicados na coluna HPX-87H com uma leve alteração na composição da fase móvel. A fase móvel otimizada será acidificada com ácido acético 0,005 mol L<sup>-1</sup> para que a coluna HPX-87H possa ser utilizada. As outras condições não serão alteradas.

#### 4.4.1. Construção dos modelos de calibração para os carboidratos estruturais

Após definir a composição e tempo ótimo de adição de ACN, modelos de calibração foram construídos. Na coluna HPX-87H os modelos foram construídos para glicose, xilose e arabinose. Foram estudados 10 níveis para cada carboidrato, são eles: 0,08; 0,1; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4 e 5 mg mL<sup>-1</sup>. Os modelos de calibração foram validados com padrões de validação contendo os carboidratos nas concentrações definidas, *i.e.* 0,4; 2,9 e 4,2 mg mL<sup>-1</sup>.

As soluções com os padrões foram transferidas diretamente para *vials* sem a necessidade de filtração. Em seguida os *vials* foram levados para análise no HPLC. O *Software* Labsolution da Shimadzu foi usado para configuração do método, injeção, análise, construção dos modelos de calibração e previsões.

#### **4.4.2. Padrões de recuperação (SRS)**

Um conjunto de padrão de recuperação de açúcar (SRS) foi elaborado em triplicata para corrigir as perdas dos carboidratos durante a hidrólise. Para isso, foi preparada uma solução contendo padrões de glicose, xilose, arabinose, galactose e manose com concentração  $10 \text{ mg mL}^{-1}$ . As soluções foram transferidas para o tubo de ensaio, no qual foi adicionado  $348 \text{ }\mu\text{L}$  de ácido sulfúrico 72%. A solução foi autoclavada por 60 minutos a  $121 \text{ }^\circ\text{C}$ . Em seguida, os SRS foram filtrados a vácuo e o hidrolisado foi transferido para um balão de 10 mL e diluído com água deionizada para concentração de  $1,6 \text{ mg mL}^{-1}$ .

#### **4.4.3. Preparo do hidrolisado para análise no HPLC**

Para coluna HPX-87P, os hidrolisados, amostras e padrões SRS, tiveram o pH corrigido entre 5 e 6 com a adição lenta de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) sob agitação. O pH foi medido com um eletrodo de vidro da marca Mettler Toledo e modelo InLab Expert Pro-ISM ligado a um pHmetro da mesma marca, modelo S220 SevenCompact™ pH/Ion. Para a coluna HPX-87H as correções de pH não foram necessárias. Em seguida, as amostras e padrões SRS foram filtradas em filtro de seringa de  $0,45 \text{ }\mu\text{m}$  e transferidas para *vial* de 2 mL. Posteriormente, os *vials* foram levados ao HPLC para análise.

#### **4.4.4. Determinação da concentração de carboidratos na biomassa**

Para determinar a concentração de carboidratos na biomassa, é primeiramente necessário realizar correções nas concentrações encontradas no HPLC a fim de obter os valores dos carboidratos na forma anidra. As concentrações obtidas pelo HPLC são medidas na forma de monômeros, *i.e.*, glicose, xilose, galactose, arabinose e manose, porém os açúcares que constituem o bagaço de cana-de-açúcar são ligados uns aos outros formando polissacarídeos. Portanto, os valores precisam ser relatados na forma polimérica, para expressá-los corretamente. A união entre dois monômeros de forma a obter um polímero, ocorre com a perda de um próton e uma hidroxila, totalizando  $18 \text{ g mol}^{-1}$  de massa perdida, ou seja, uma molécula de  $\text{H}_2\text{O}$ . O fator de correção anidro

para as hexoses é de 0,90 (162/180), já para as pentoses o valor é de 0,88 (132/150) (ROCHA et al., 2015).

A concentração dos carboidratos nas amostras foi calculado utilizando as Equações 10, 11, 12 e 13, conforme o procedimento do NREL (SLUITER, A. et al., 2008).

$$\%SRS_x = \frac{Conc. \text{ padrão detectada HPLC}}{Conc. \text{ conhecida do padrão antes da hidrólise}} \times 100 \quad \text{(Equação 10)}$$

$$C_x = \frac{Conc. \text{ amostra HPLC} \times f}{\%SRS_x / 100} \quad \text{(Equação 11)}$$

$$C_{x, \text{ corrigido}} = C_x \times \text{Correção anidro} \quad \text{(Equação 12)}$$

$$\%Carboidratos = \frac{C_{x, \text{ corrigido}} \cdot V_f \cdot \frac{1g}{1000mg}}{m} \times 100 \quad \text{(Equação 13)}$$

em que  $m$  é a massa da amostra em gramas sem extrativos, base massa seca,  $V_f$  é o volume do filtrado em mL e o subíndice  $x$  representa os diferentes açúcares.

#### 4.5. Determinação de cinzas na biomassa

Para determinação de cinzas, foi aplicado o mesmo método utilizado por diversos autores (BATALHA et al., 2015; DE CARVALHO et al., 2015; DEL RIO et al., 2015; ROCHA et al., 2015; HOANG et al., 2017).

A quantificação do teor de cinzas na biomassa foi executada em triplicata com a utilização da fração de finos da amostra como descrito no item 4.1, de acordo com o procedimento NREL (SLUITER et al., 2005).

Uma massa de 1,5 g de biomassa fina (> 80 mesh), base massa seca, foi pesada e transferida para cadinhos de porcelana previamente secos e pesados. Em seguida o conjunto cadinho e amostra foi colocado em um forno de mufla a  $575 \pm 25$  °C por 24 h, até peso constante.

O teor de cinzas (Cz) foi determinado de acordo com a Equação 14.

$$\%Cz = \left( \frac{m_{(cd+cz)} - m_{cd}}{m_{i(a)}} \right) \times 100 \quad \text{(Equação 14)}$$

em que,  $m_{(cd+cz)}$  é a massa do cadinho mais cinzas,  $m_{cd}$  é a massa do cadinho e  $m_{i(a)}$  é a

massa inicial da amostra.

#### **4.6. Validação do procedimento para outras variedades**

Após desenvolvido procedimentos específicos para a caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar utilizando a variedade RB867515 como modelo, quatro diferentes genótipos foram selecionados para aplicação dos procedimentos. Os quais foram: RB127032 (BMA32), RB127035 (BMA35), RB127039 (BMA39) e RB127045 (BMA45).

Todas as propriedades químicas determinadas nos procedimentos de caracterização estudados neste trabalho bem como o balanço de massa total foram comparadas com resultados encontrados na literatura para cana-de-açúcar.

#### **4.7. Cálculo do balanço de massa total**

Para o cálculo do balanço de massa total foi realizado o somatório de todos os constituintes presente no bagaço de cana-de-açúcar com base na biomassa seca com extrativos conforme Equação 15.

$$\%BM = \text{Extr} + \text{LT} + \text{Cel} + \text{Hemi} + \text{Cz} \quad \text{(Equação 15)}$$

#### **4.8. Cálculos e análises estatísticas**

Todos os cálculos e/ou gráficos foram realizados usando os *softwares* Statistica 7.0, Excel do pacote Office 465 da Microsoft, Labsolution versão 5.54 SP3 da Shimadzu e Microcal Origin 9.0.

Sendo que, todas as análises estatísticas referentes aos planejamentos experimentais foram feitas no Statistica 7.0 (avaliação dos coeficientes e/ou efeitos, análise de variância (ANOVA), superfície de resposta, gráfico de pareto). Bem como a obtenção do modelo de regressão para etapa de extrativos.

Já para determinação de carboidratos foi usado o Labsolution versão 5.54 SP3 da Shimadzu, Excel do pacote Office 465 da Microsoft para cálculos e Microcal Origin 9.0 para construção dos cromatogramas.

Na determinação de lignina e cinzas foi usado o Excel do pacote Office 465 da Microsoft para fins de cálculos básicos.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Secagem da amostra

As amostras foram secas até obter teor de umidade inferior a 10%. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Teores de umidade das amostras secas na condição de ar livre e em estufa.

Repetições	Secagem ao ar			Secagem em estufa	
	Ar-24h	Ar-48h	Ar-72h	45 °C-24h	75 °C-72h
1	27,75	12,71	9,16	0,45	0,065
2	26,99	13,11	9,33	0,48	0,078
3	26,23	13,35	9,15	0,49	0,038
<b>Média</b>	26,99	13,06	9,21	0,47	0,060

Para as amostras secas ao ar foram necessárias 72 h para secagem até atingir teor de umidade inferior a 10% (Tabela 4). Entretanto este valor pode variar de acordo com a umidade do ar e condições climáticas. As amostras secas em estufa com convecção forçada, atingiram o teor de umidade desejado nas condições de temperatura e tempo pré-estabelecidos, como indicado na Tabela 4.

Para os estudos de remoção e determinação de extrativos a secagem em estufa à 45 °C por 24 h foi escolhida por ser uma condição intermediária. O método ótimo definido para os extrativos foi aplicado para todas as condições de secagem, i.e., ao ar e à 75 °C por 72h.

### 5.2. Determinação de extrativos

As respostas do planejamento fatorial completo 2<sup>2</sup> com experimentos ponto central utilizando a amostra seca à 45 °C / 24 h, são apresentadas na Tabela 5.

**Tabela 5.** Variáveis e níveis utilizados nos planejamentos fatoriais completos  $2^2$  com ponto central (triagem 1 e 2) para o estudo do tempo de extração com água (t.a) e com etanol (t.e) na remoção de extrativos da biomassa.

Triagem 1			Triagem 2		
Variáveis		Resposta	Variáveis		Resposta
t.a (h)	t.e (h)	Extrativos %	t.a (h)	t.e (h)	Extrativos %
6 (-)	16 (-)	19,9	3 (-)	8 (-)	16,3
24 (+)	16 (-)	19,5	12 (+)	8 (-)	18,9
6 (-)	24 (+)	18,8	3 (-)	12 (+)	16,2
24 (+)	24 (+)	19,8	12 (+)	12 (+)	18,5
15 (0)	20 (0)	19,8	7,5 (0)	10 (0)	18,1
15 (0)	20 (0)	19,3	7,5 (0)	10 (0)	18,2
15 (0)	20 (0)	19,5	7,5 (0)	10 (0)	17,9

Os símbolos (+) e (-) referem-se aos níveis máximo e mínimo das variáveis independentes, respectivamente.

Os resultados do planejamento mostrado na Tabela 5-Triagem 1, indicam ao nível de significância de 0,05, que não houve variação significativa no teor de extrativo nos experimentos realizados. A média do teor de extrativos foi de 19,5% com coeficiente de variação de 1,95%. Estes resultados mostram que, dentro dos níveis estudados, não há alteração na quantidade de extrativo. Além disso, como os tempos de extração usando água seguido de etanol foram muito altos, espera-se que nestes níveis estudados todo extrativo tenha sido removido em cada ensaio. Devido a esses resultados foi necessária a construção de um segundo planejamento fatorial completo (Triagem 2) utilizando outros níveis. O planejamento e as respostas são apresentados na Tabela 5-Triagem 2.

Na triagem 1, as variações do tempo de 6 a 24 h para água e 16 a 24 h para o etanol, como é indicado pelo NREL (SLUTIER et al., 2005), se mostraram excessivas para o bagaço de cana-de-açúcar. Portanto, os níveis foram reduzidos pela metade como observado na Tabela 5-Triagem 2.

De acordo com o modelo de regressão, os coeficientes das variáveis estudadas na triagem 2 são apresentados na Tabela 6.

**Tabela 6.** Coeficientes da regressão linear no planejamento executado na triagem 2.

	<b>Coeficientes</b>	<b>Erro Puro</b>	<b>t (2)</b>	<b>p</b>
<b>Média/Interação</b>	<b>17,728</b>	<b>0,058</b>	<b>307,07</b>	<b>0,000</b>
t.a (h)	1,225	0,076	16,039	0,004
t.e (h)	-0,125	0,076	-1,637	0,243
t.a x t.e	-0,075	0,076	-0,982	0,429

t.a é o tempo de extração em água e t.e é o tempo de extração em etanol. O sinal ( $\pm$ ) se refere a direção do coeficiente, ou seja, se a resposta aumenta ou diminui com a variação do nível (-) para (+). O Erro Puro é calculado com base na variância das repetições no ponto central (erro aleatório das replicatas). O t (n) representa o número de graus de liberdade, sendo n igual ao número de replicatas no ponto central subtraído de uma unidade. p, menor nível de significância para se rejeitar a hipótese nula.  $\alpha = 0,05$ .

Ao nível de significância de 0,05, somente a variável tempo de extração em água (t.a) foi estatisticamente significativa e positiva. Este resultado revela que, dentro dos níveis estudados, quanto maior o tempo de extração em água, maior a remoção de extrativos. Assim, esta variável deve ser investigada para níveis maiores. Por outro lado, o coeficiente da variável t.e não foi significativo dentro dos níveis estudados. Porém, como o etanol foi usado em todos os experimentos em uma etapa posterior à água, esta variável não deve ser eliminada. É importante ressaltar também que, o etanol é usado para remover compostos orgânicos que a água não é capaz de retirar. Assim, os resultados sugerem que os níveis para t.e sejam estudados em valores menores.

A partir dos resultados observados na Tabela 6, um planejamento composto central (CCD) com duas variáveis foi elaborado investigando níveis maiores para a variável t.a e níveis menores para a variável t.e. Os níveis do planejamento e os resultados são apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7.** Variáveis, níveis e resposta do CCD para a otimização da determinação do extrativos.

Ensaio	Variáveis		Resposta
	t.a (h)	t.e (h)	Extrativos (%)
1	4,5 (-)	4 (-)	18,3
2	11,5 (+)	4 (-)	18,6
3	4,5 (-)	9 (+)	18,3
4	11,5 (+)	9 (+)	20,0
5	3,0 (-1,41)	6,5 (0)	18,8
6	13 (+1,41)	6,5 (0)	19,9
7	8 (0)	3,0 (-1,41)	18,2
8	8 (0)	10,0 (+1,41)	19,1
9	8 (0)	6,5 (0)	18,3
10	8 (0)	6,5 (0)	18,2
11	8 (0)	6,5 (0)	18,3

t.a é o tempo de extração em água e t.e é o tempo de extração em etanol. Os símbolos (+) e (-) referem-se aos níveis máximo e mínimo das variáveis independentes, respectivamente.

A partir dos resultados apresentados na Tabela 7, a análise estatística foi executada. Os resultados são apresentados na Tabela 8.

**Tabela 8.** Avaliação dos coeficientes estimados para o planejamento CCD.

	Coeficientes	SQR	t (5)	p
<b>Média/Interação</b>	<b>18,27</b>	<b>0,09</b>	<b>210,11</b>	<b>0,0000</b>
t.a	0,444	0,05	8,35	0,0004
t.a <sup>2</sup>	0,492	0,06	7,76	0,0006
t.e	0,334	0,05	6,27	0,0015
t.e <sup>2</sup>	0,142	0,06	2,23	0,0756
t.a x t.e	0,350	0,07	4,65	0,0056

SQR, soma quadrática dos resíduos; t representa o número de graus de liberdade; p, menor nível de significância para se rejeitar a hipótese nula.  $\alpha = 0,05$ .

Ao nível de significância de 0,05, as variáveis principais t.a e t.e foram significativas e positivas, como apresentados na Tabela 8. Isso sugere que, dentro dos níveis estudados, deve-se usar os níveis maiores destas variáveis para obter melhores extrações. O coeficiente quadrático do t.a também foi significativo e mostra que há variação quadrática significativa nas respostas dentro dos níveis estudado para esta variável. Além disso, o sinal positivo representa uma curvatura convexa. A interação entre as variáveis tempo de extração em água e tempo em etanol, também foram significativas e positivas, indicando que a combinação entre eles agem sinergicamente.

O ajuste do modelo construído foi avaliado empregando a análise de variância. Os

resultados são apresentados na Tabela 9.

**Tabela 9.** ANOVA do modelo construído para o planejamento CCD.

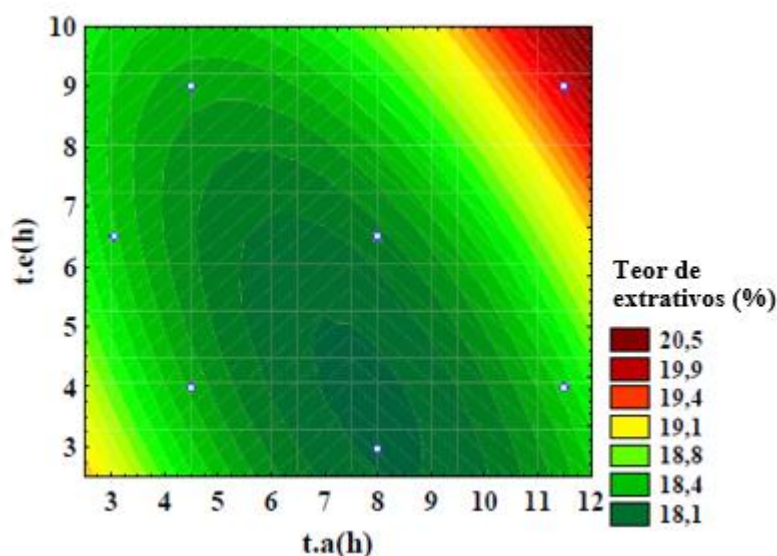
	SQ	GL	MQ	Fcalc.	p
Regressão	4,328	5	0,867	38,18	0,0005
Resíduos	0,113	5	0,023		
Falta de Ajuste	0,107	3	0,036	10,67	0,087
Erro Puro	0,007	2	0,003		
<b>Total</b>	4,442	10			

SQ: soma quadrática; GL: graus de liberdade; MQ: média quadrática; Fcalc. Teste F calculado; p: menor nível de significância para se rejeitar a hipótese nula.  $\alpha = 0,05$ .

A ANOVA, ao nível de significância de 0,05, mostra que o modelo de regressão (Equação 16) foi significativo e a falta de ajuste não significativa. Estes resultados indicam que o modelo se ajustou e possui capacidade de realizar previsões. O coeficiente de determinação indica que o modelo consegue explicar 97,5% da variação total em torno da média, portanto o modelo foi satisfatório, dentro dos níveis estudados, para explicar a extração usando as variáveis t.a e t.e.

$$\% \text{Extr.} = 18,27 + 0,44 \text{ t.a} + 0,33 \text{ t.e} + 0,49 \text{ t.a}^2 + 0,14 \text{ t.e}^2 + 0,35 \text{ t.a} \times \text{t.e} \quad \text{(Equação 16)}$$

A superfície de resposta obtida a partir do modelo construído pode ser observada na Figura 6.



**Figura 6.** Superfície de resposta que relaciona o teor de extrativos em função do tempo de extração em água (t.a) e em etanol (t.e).

Conforme resultado médio obtido na triagem 1 (Tabela 5) o teor máximo de extrativos que se espera obter com a biomassa da variedade estudada é de aproximadamente 19,5%. Esta quantidade é esperada pois na triagem 1 os níveis

estudados foram extremos 6 a 24h para água e 16 a 24h para etanol. Definindo o valor de 19,5% como exato para o teor de extrativos na biomassa estudada, pode se concluir com base no modelo (Equação 16) que os tempos ótimos de máxima extração com água seguida de etanol são de 11,5 h e 9 h, respectivamente.

O teor de extrativos das amostras BMT25, BMT45 e BMT75 foi determinado nas condições otimizadas. Para cada amostra foram realizadas 10 repetições e os resultados estão mostrados na Tabela 10.

**Tabela 10.** Teor de extrativos das amostras de bagaço de cana-de-açúcar da variedade RB867515 nas três condições de secagem.

<b>BMT25</b>	<b>% Extr.</b>	<b>BMT45</b>	<b>% Extr.</b>	<b>BMT75</b>	<b>% Extr.</b>
<b>1</b>	19,34	<b>1</b>	19,58	<b>1</b>	19,34
<b>2</b>	19,03	<b>2</b>	19,41	<b>2</b>	19,36
<b>3</b>	18,79	<b>3</b>	18,95	<b>3</b>	19,32
<b>4</b>	18,65	<b>4</b>	20,01	<b>4</b>	19,21
<b>5</b>	18,97	<b>5</b>	19,96	<b>5</b>	19,41
<b>6</b>	18,79	<b>6</b>	19,30	<b>6</b>	19,07
<b>7</b>	19,36	<b>7</b>	18,84	<b>7</b>	19,16
<b>8</b>	19,15	<b>8</b>	18,93	<b>8</b>	19,52
<b>9</b>	18,87	<b>9</b>	19,03	<b>9</b>	19,35
<b>10</b>	18,64	<b>10</b>	20,07	<b>10</b>	19,46
<b>Média</b>	<b>18,96<sub>a</sub></b>	<b>Média</b>	<b>19,41<sub>a</sub></b>	<b>Média</b>	<b>19,32<sub>a</sub></b>
<b>RSD%</b>	<b>1,37</b>	<b>RSD%</b>	<b>2,46</b>	<b>RSD%</b>	<b>0,71</b>

Médias de teores de extrativos seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de *Tukey* a 5% de significância. BMT25: secagem ao ar; BMT45: secagem em estufa a 45°C; BMT75: secagem em estufa a 75°C. RSD: desvio padrão relativo.

A partir dos resultados obtidos, observa-se que as médias apresentaram valores muito próximos entre as três amostras e uma alta precisão foi obtida para as dez repetições de cada amostra. Uma comparação de médias entre os três tratamentos foi realizada e o teste *Tukey* foi aplicado ao nível de significância de 0,05. O resultado mostrou que as condições de secagem estudadas não apresentaram diferenças significativas. Deste modo, a secagem à 45 °C por 24 h, por ser uma secagem a temperatura branda, rápida e eficiente foi escolhida para os demais genótipos.

É possível observar também que, apesar de existirem extrativos voláteis no bagaço de cana-de-açúcar, estes não apresentaram interferência neste estudo, já que todos os tratamentos foram iguais estatisticamente.

O procedimento definido para a remoção de extrativos da biomassa de cana-de-açúcar foi aplicado, em triplicata, para os genótipos BMA32, BMA35, BMA39 e

BMA45. Os resultados são apresentados na Tabela 11.

**Tabela 11.** Aplicação dos procedimentos desenvolvido para determinação do teor de extrativos do bagaço de diferentes genótipos de cana-de-açúcar.

<b>BMA32</b>	<b>% Extr.</b>	<b>BMA35</b>	<b>% Extr.</b>	<b>BMA39</b>	<b>% Extr.</b>	<b>BMA45</b>	<b>% Extr.</b>
1	15,69	1	12,85	1	7,99	1	18,61
2	13,43	2	11,37	2	9,53	2	20,50
3	15,18	3	11,76	3	8,51	3	19,36
<b>Média</b>	<b>14,77</b>	<b>Média</b>	<b>11,99</b>	<b>Média</b>	<b>8,67</b>	<b>Média</b>	<b>19,49</b>
<b>RSD%</b>	<b>8,01</b>	<b>RSD%</b>	<b>6,37</b>	<b>RSD%</b>	<b>9,02</b>	<b>RSD%</b>	<b>4,89</b>

BMA32: RB127032. BMA35: RB127035. BMA39: RB127039 e BMA45: RB127045. RSD: desvio padrão relativo.

De acordo com os valores de extrativos e de RSD apresentados na Tabela 11 obtidos para as diferentes amostras, foi possível concluir que o procedimento desenvolvido é confiável para ser aplicado a outros tipos de genótipos.

Os valores de RSD foram menores que 10% para todas as amostras. Esse erro aleatório ocorreu devido às variações na pesagem, e/ou perda de massa durante o processo.

Após revisão de literatura, diferentes valores de teor de extrativos foram encontrados, os quais variaram de 1,6 a 57,9% (MASARIN et al., 2011; KUCHELMEISTER; BAUER, 2015). Os resultados são apresentados na Tabela 12. A variação nos valores encontrados ocorre devido às características das espécies da cana-de-açúcar analisadas, tempo de maturação, tipo de colheita, preparo de amostra, condições climáticas, região, solo, dentre outros fatores.

**Tabela 12.** Teor de extrativos presentes no bagaço de cana-de-açúcar encontrados na literatura.

<b>Autor</b>	<b>Solvente</b>	<b>% Extr.</b>
(MASARIN et al., 2011)	Etanol (95%)	1,6 - 7,5
(ROCHA et al., 2015)	Etanol/ciclo-hexano (2:1) e água	2,30 - 10,45
(ROCHA et al., 2011)	Etanol (95%)	4,6
(PITARELO et al., 2012)	Diclorometano, etanol:tolueno 1:2 (v/v) e etanol 95%	6,7
(ANDRADE; COLODETTE, 2014)	Etanol:Tolueno (1:2), etanol (95%) e água quente	8,5
(CANILHA et al., 2011)	Água e etanol	9,1
(PHILIPPINI, 2012)	Água e etanol (24h para cada)	11,07 – 14,3
(PAULA et al., 2011)	Etanol:Tolueno (1:2), etanol (95%) e água quente	31,76
(DE CARVALHO et al., 2015)	Etanol:Tolueno (1:2), etanol (95%) e água quente	15,0
(ORLANDO et al., 2002)	Etanol e água	20,0
(DAS et al., 2004)	Álcool, benzeno e água	25,8
(KUCHELMEISTER; BAUER, 2015)	Água e etanol	57,9
(HOANG et al., 2017)	Água e etanol	15,1 – 34,8

É importante ressaltar, que cada autor fez a determinação de extrativos de forma diferente, o que pode causar erros nos valores obtidos e dificuldade de comparação. Assim, um procedimento padrão para análise de extrativos específico para cana-de-açúcar é desejável.

Os tempos ótimos de máxima extração em água seguida de etanol de 11,5 h e 9 h, respectivamente, indicados neste estudo podem ser aplicados para biomassas de cana-de-açúcar com até 20% de extrativos. Recomenda-se, portanto, caso o teor de extrativos encontrado usando o procedimento indicado seja maior que 20%, que os tempos em água e etanol sejam aumentados seguindo, como referência, o modelo apresentado na Equação 16. No entanto, conforme modelo construído e ajustado, as condições encontradas podem ser usadas para teores maiores que 20%. Porém, nenhum estudo foi realizado neste trabalho com biomassas de cana-de-açúcar contendo teores de extrativos maiores que 20%.

### **5.3. Teor de lignina solúvel e insolúvel**

Diversos estudos foram executados com objetivo de quantificar o teor de lignina em variados materiais vegetais, dentre eles o bagaço da cana-de-açúcar. Portanto, neste trabalho, um procedimento comum à maioria dos estudos realizados foi aplicado com uma pequena modificação no tempo em ácido concentrado. O aumento no tempo para 120 minutos foi necessário, já que com 60 minutos, como recomenda o procedimento

NREL, gerou grande quantidade de celobiose.

Para este estudo as amostras BMT25, BMT45 e BMT75 foram utilizadas a fim de analisar uma possível degradação da lignina devido a secagem da biomassa. A estrutura do material vegetal pode ser afetada durante a secagem, o que poderia alterar as propriedades físicas da lignina e conseqüentemente, a sua separação (PASQUINI et al., 2002; CHAKAR; RAGAUSKAS, 2004).

O teor de lignina insolúvel foi expresso na base seca e livre de extrativos. Os resultados para lignina insolúvel e solúvel podem ser observados na Tabela 13.

**Tabela 13.** Teor de lignina insolúvel e solúvel de bagaço de cana-de-açúcar da variedade RB867515 em três condições de secagem.

Repetições	Lignina Insolúvel			Lignina Solúvel		
	BMT25	BMT45	BMT75	BMT25	BMT45	BMT75
1	21,23	21,86	21,65	2,27	2,39	2,33
2	21,48	21,96	21,78	2,41	2,51	2,47
3	21,67	21,68	21,59	2,33	2,45	2,39
<b>Média</b>	<b>21,46<sub>a</sub></b>	<b>21,82<sub>a</sub></b>	<b>21,67<sub>a</sub></b>	<b>2,34<sub>a</sub></b>	<b>2,45<sub>a</sub></b>	<b>2,40<sub>a</sub></b>
<b>RSD (%)</b>	<b>1,03</b>	<b>0,65</b>	<b>0,45</b>	<b>3,00</b>	<b>2,45</b>	<b>2,93</b>

Médias de teores de lignina solúvel e insolúvel seguidos pela mesma letra, para cada uma, não diferem entre si pelo teste de *Tukey* a 5% de significância. RSD: desvio padrão relativo. BMT(25;45;75): RB867515 seca ao ar (~25 °C), seca a 45 °C e 75 °C, respectivamente.

A partir dos resultados obtidos, pode perceber que o teor médio de lignina insolúvel e solúvel entre as três amostras foi de 21,65 e 2,40%, respectivamente, com RSD menor que 3%. O teste *Tukey* foi executado ao nível de significância de 0,05 para comparação de média entre as três condições para lignina insolúvel e solúvel. Os resultados indicaram que a hipótese nula foi aceita e, portanto, todos os tratamentos são iguais. Assim, as condições de secagem empregadas não afetaram a determinação de lignina insolúvel e solúvel. Diante disso, para as determinações de carboidratos estruturais e balanço de massa foram utilizadas a condição de secagem de 45 °C por 24 h. Esta condição foi escolhida por consumir o menor tempo no preparo da biomassa e exigir um consumo de energia intermediário entre a secagem ao ar e a secagem à 75 °C.

Os teores de lignina insolúvel corrigidos para a sílica, além dos conteúdos de lignina solúvel e lignina total são apresentados na Tabela 14.

**Tabela 14.** Teores de lignina obtidos para o bagaço de cana-de-açúcar livre de extrativos.

	<b>BMT45</b>		<b>BMA32</b>		<b>BMA35</b>		<b>BMA39</b>		<b>BMA45</b>	
	<b>Média</b>	<b>RSD</b>	<b>Média</b>	<b>RSD</b>	<b>Média</b>	<b>RSD</b>	<b>Média</b>	<b>RSD</b>	<b>Média</b>	<b>RSD</b>
<b>LI(%)</b>	21,82	0,54	19,77	0,98	24,67	0,89	24,71	1,33	24,21	0,98
<b>SL(%)</b>	2,29	4,67	1,49	2,99	1,35	1,35	1,38	2,1	1,03	2,16
<b>LS(%)</b>	2,45	2,35	2,49	3,38	1,94	3,96	1,82	1,78	2,01	1,25
<b>LT(%)</b>	21,98 <sub>b</sub>	0,66	20,76 <sub>c</sub>	1,36	25,26 <sub>a</sub>	0,65	25,15 <sub>a</sub>	1,4	25,19 <sub>a</sub>	0,96

BMA32: RB127032. BMA35: RB127035. BMA39: RB127039 e BMA45: RB127045. Valores médios e respectivo desvio padrão relativo (%RSD) para lignina insolúvel (LI), sílica da lignina (SL), lignina solúvel (LS) e lignina total (LT). As Médias de LT seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 0,05.

Como observado na Tabela 14, as amostras possuem diferentes valores médios para o conteúdo de lignina total, os quais variaram entre 20,76 a 25,26%. O teste *Tukey* foi aplicado ao nível de significância de 0,05 e indicou que as amostras BMA35, BMA45 e BMA39 são iguais estatisticamente e as demais são diferentes.

Em relação a lignina solúvel é importante destacar que quanto maior a presença do grupo siringila na lignina, maior será o teor de lignina solúvel.

**Tabela 15.** Valores obtidos por diferentes autores na quantificação do teor de lignina no bagaço de cana-de-açúcar.

<b>Autor</b>	<b>LI (%)</b>	<b>LS (%)</b>	<b>LT (%)</b>
(DEL RIO et al., 2015)	17,8	2,2	20,0
(ROCHA et al., 2011)	-	-	21,1
(ANDRADE; COLODETTE, 2014)	21,3	1,2	22,5
(PITARELO et al., 2012)	27,4	1,2	28,6
(DE CARVALHO et al., 2015)	19,5	1,87	21,37
(ORLANDO et al., 2002)	-	-	21
(LEE, 1997)	-	-	18,4
(DAS et al., 2004)	-	-	21,8
(CANILHA et al., 2011)	14,1	5,2	19,3
(MASARIN et al., 2011)	-	-	16,8 – 24,5
(ROCHA et al., 2015)	-	-	18,9 – 26,12
(CHONG et al., 2013)	-	-	15,68 – 22,38
(NEUREITER et al., 2002)	25,15	-	-
(CARASCHI et al., 1996)	22,3	1,0	23,3
(HOAREAU et al., 2004)	25,3	-	-
(MARYANA et al., 2014)	17,52	-	-
(HOANG et al., 2017)	16,7 – 21,2	0,9 – 1,3	17,8 – 22,2
(VIERA et al., 2007)	-	-	23,8
(ASSIS et al., 2017)	23,44	-	-
<b>ESTE TRABALHO</b>	<b>18,28 – 23,33</b>	<b>1,82 – 2,49</b>	<b>23,67</b>

LI: lignina insolúvel; LS, lignina solúvel e LT, lignina total.

Os resultados obtidos para LI, LS e LT apresentados na Tabela 14 foram confiáveis, tendo como referência os valores reportados na literatura (Tabela 15). Os

valores apresentados na Tabela 15 para LT variam de 16 a 29%. Neste trabalho os valores de LT atingiram em média de 23,7%.

#### 5.4. Determinação do teor de cinzas total no bagaço de cana-de-açúcar

Os resultados do teor de inorgânico das diferentes amostras são mostrados na Tabela 16. O procedimento aplicado às amostras para quantificação do teor de cinzas, indicou resultados satisfatórios, em média 2,65% de cinzas e RSD menor que 4%. Estes resultados são similares aos encontrados por De Carvalho et al. (2015), Hoang et al.(2017), Pitarelo et al. (2012) e Rocha et al. (2015). Os valores médios do conteúdo de inorgânicos obtido variaram entre 2,12 a 3,63 % e estão coerentes com a faixa encontrada na literatura (Tabela 17).

**Tabela 16.** Teor de cinzas para diferentes variedades de bagaço de cana-de-açúcar.

Repetições	BMT	BMA32	BMA35	BMA39	BMA45
1	3,72	2,09	2,57	2,39	2,67
2	3,56	2,15	2,64	2,26	2,55
3	3,61	2,13	2,65	2,22	2,59
<b>Média</b>	<b>3,63<sub>b</sub></b>	<b>2,12<sub>d</sub></b>	<b>2,62<sub>a</sub></b>	<b>2,29<sub>c</sub></b>	<b>2,60<sub>a</sub></b>
<b>%RSD</b>	<b>2,21</b>	<b>1,31</b>	<b>1,83</b>	<b>3,81</b>	<b>2,34</b>

Médias de teores de cinzas seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de *Tukey* a 5% de significância. RSD: desvio padrão relativo.

**Tabela 17.** Teor de cinzas presentes no bagaço de cana-de-açúcar por diversos autores.

Autores	Cinzas (%)
(LEE, 1997)	2,8
(ROCHA et al., 2012)	3,5
(PITARELO et al., 2012)	2,9
(ROCHA et al., 2011)	2,1
(BATALHA et al., 2015)	4,0
(CANILHA et al., 2011)	1,4
(PAULA et al., 2011)	0,8
(ANDRADE; COLODETTE, 2014)	4,0
(DEL RIO et al., 2015)	2,0
(DE CARVALHO et al., 2015)	2,31
(ROCHA et al., 2015)	1,14- 5,96
(SOARES et al., 2017)	1,89
(HOANG et al., 2017)	1,1 – 2,6
(DAS et al., 2004)	1,83
<b>ESTE TRABALHO</b>	<b>2,12 – 3,63</b>

O teste de *Tukey* foi aplicado aos resultados apresentados na Tabela 16. Ao nível de significância de 0,05, as amostras BMA35 e BMA45 apresentaram valores de teor de cinzas estatisticamente iguais. As outras amostras apresentaram teores diferentes entre si.

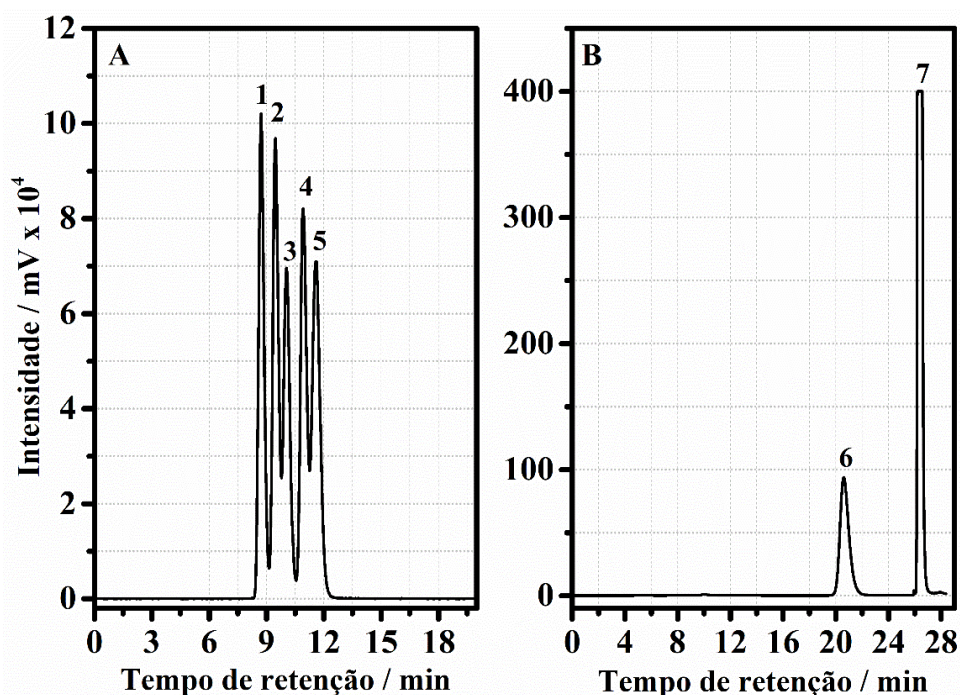
Segundo Vassilev et al. (2010), variações nos teores de cinzas podem ocorrer em função da espécie de cana, idade, manuseio, tipo de colheita, velocidade e condições de crescimento, tipo de solo, local de cultivo e depende também da quantidade de fertilizantes e pesticidas utilizados, os quais irão interferir em alguns elementos (Cl, K, N, P, S, entre outros).

## 5.5. Determinação de carboidratos estruturais na biomassa

### 5.5.1. Otimização do método

Na Figura 7 são apresentados os cromatogramas obtidos no HPLC com a coluna HPX-87P utilizando apenas água como fase móvel, ou seja, fase móvel não otimizada. O tempo total de análise nesta condição foi de 30 minutos e o tempo de retenção dos compostos furânicos foi de 27 minutos.

Os carboidratos foram denominados de celobiose (CEL), glicose (GLI), xilose (XIL), arabinose (ARA), galactose (GAL) e manose (MAN) e os compostos furânicos, i.e. furfural (FUR) e hidroximetilfurfural (HMF).



**Figura 7.** Cromatogramas na coluna HPX-87P antes da otimização do método: A: Detector ELSD; B: Detector PDA; 1: GLI; 2: XIL; 3: GAL; 4: ARA; 5: MAN; 6: HMF e 7: FUR.

Os resultados das corridas referentes ao planejamento experimental para o estudo da influência do tempo de início da adição de acetonitrila e sua porcentagem na fase móvel sobre a resposta *Rtr* são apresentados na Tabela 18.

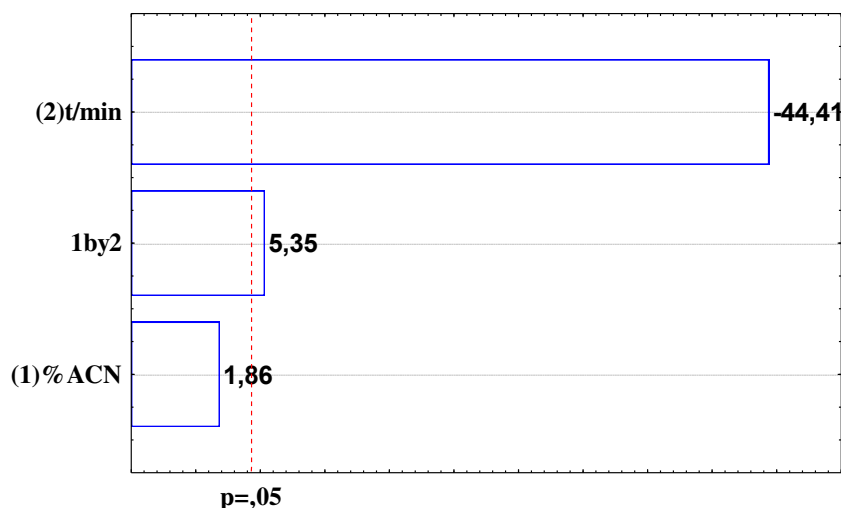
**Tabela 18.** Variáveis e níveis utilizados para o estudo da influência do tempo de início da adição de acetonitrila e sua concentração na resposta.

Ensaio	Variáveis		Resposta
	% ACN	Tempo / min	Rtr
1	25 (+)	12 (+)	34,2
2	15 (-)	0 (-)	<b>53,7</b>
3	25 (+)	0 (-)	52,1
4	15 (-)	12 (+)	30,9
5	20 (0)	6 (0)	36,4
6	20 (0)	6 (0)	37,0
7	20 (0)	6 (0)	37,3

ACN: proporção de acetonitrila na fase móvel. Rtr: razão entre a melhor separação entre os picos cromatográficos e o menor tempo de análise.

Os resultados apresentados na Tabela 18 indicam que a melhor condição é aquela que possui a maior resposta, já que é desejável obter menor tempo total de análise e uma boa separação dos picos. Portanto, o ensaio 2 apresenta a melhor condição, *i.e.*, 15% ACN com adição no tempo zero. Deste modo, a condição ótima é a eluição isocrática.

Os efeitos das variáveis estudadas no planejamento fatorial são apresentados na Figura 8. Em que, (1)%ACN é a proporção de acetonitrila adicionada na fase móvel, (2)t/min é o tempo em minutos em que se inicia a adição de ACN e 1by2 representa a interação entre os dois fatores.



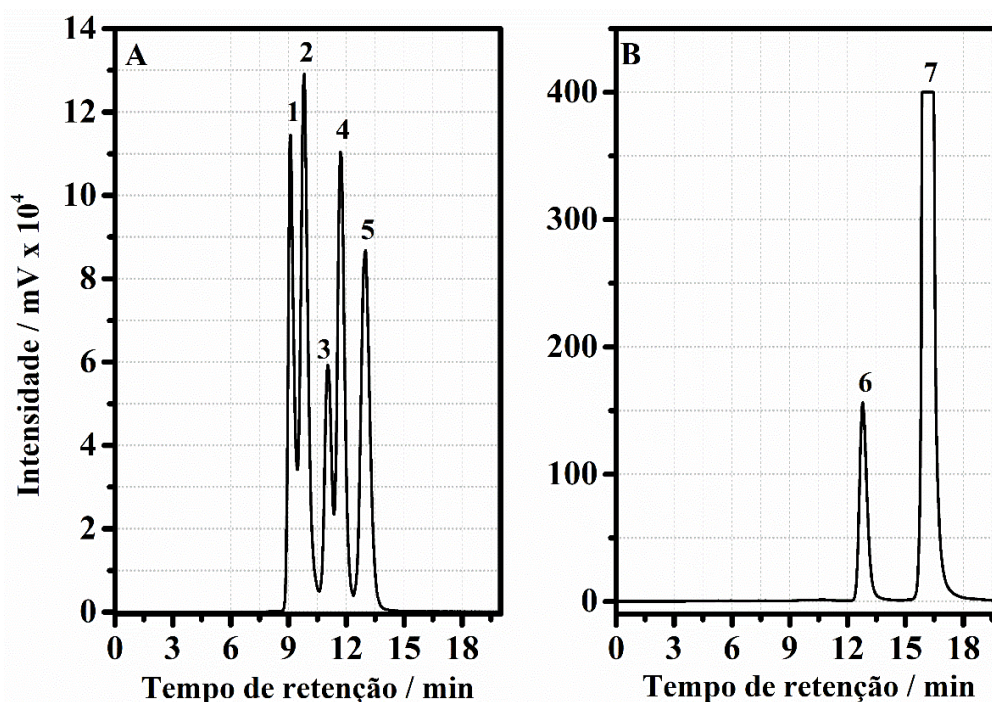
**Figura 8.** Gráfico de Pareto do planejamento fatorial mostrando a influência dos fatores estudados.

Ao nível de significância de 0,05, a variável tempo de início da adição de acetonitrila foi estatisticamente significativa e negativa. Este resultado indica que, dentro dos níveis estudados, quando mais rápido a ACN é introduzida na fase móvel, melhor a resposta, por isso escolheu-se o tempo zero.

Percebe-se também que, a interação entre a mudança da concentração da fase

móvel e o tempo de adição de acetonitrila foi significativa. A %ACN não foi significativa dentro dos níveis estudados.

Os cromatogramas obtidos no HPLC usando a coluna HPX-87P após otimização são mostrados na Figura 9.

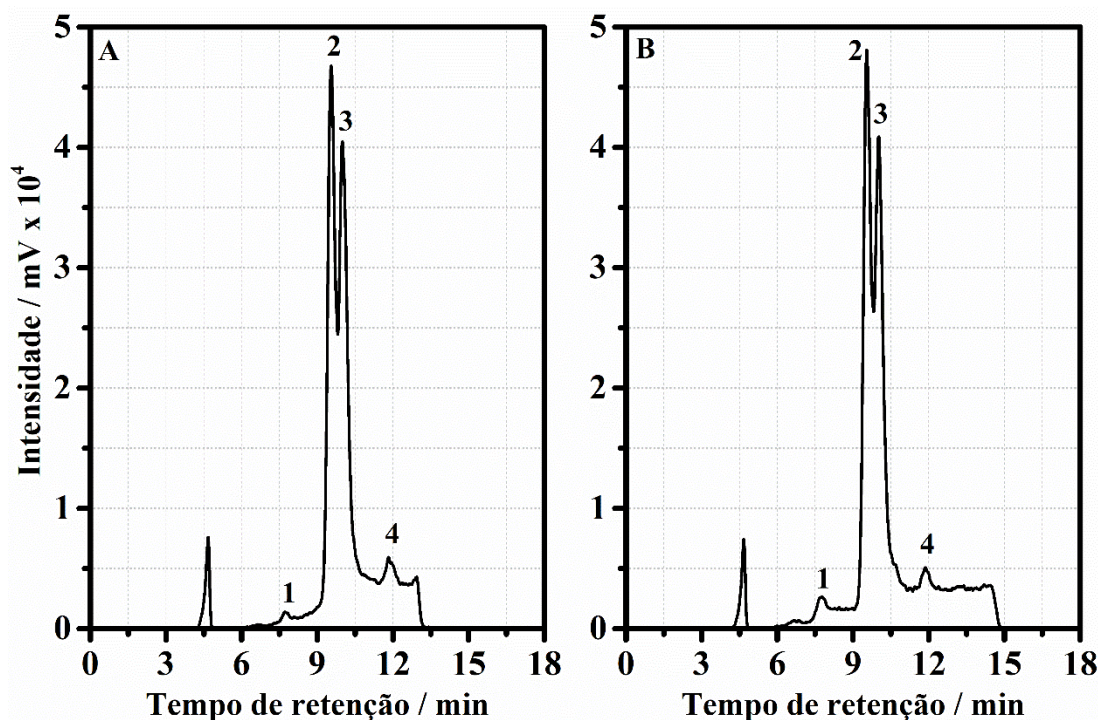


**Figura 9.** Cromatogramas obtidos usando a coluna HPX-87P na condição otimizada (Ensaio 2). A: Detector ELDS; B: Detector PDA; 1: GLI; 2: XIL; 3: GAL; 4: ARA; 5: MAN; 6: HMF e 7: FUR.

Uma comparação entre os resultados obtidos na Figura 7 com os obtidos na Figura 9 indica que o tempo total de análise reduziu para de 30 para 19 minutos e o tempo de retenção dos compostos furânicos diminuiu de 27 para 16,5 minutos. Isso confirma que a mudança na polaridade da fase móvel através da adição de acetonitrila melhora significativamente o tempo total desta análise, melhorando inclusive, a separação. A condição otimizada foi aplicada para coluna HPX-87H.

### 5.5.2. Separação dos carboidratos nos hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar.

Os cromatogramas típicos de dois hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar obtidos usando a coluna HPX-87P, são apresentados na Figura 10. Em todas as amostras analisadas, foram detectados apenas os picos relativos à glicose, xilose e arabinose, respectivamente.

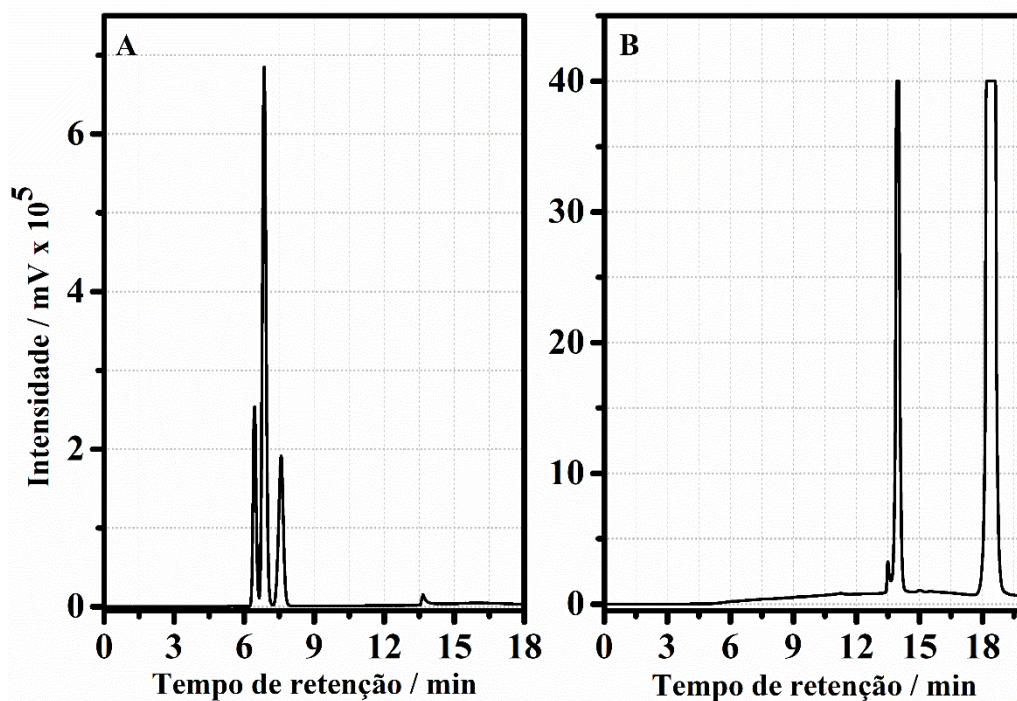


**Figura 10.** Cromatogramas típicos de dois hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar obtidos no HPLC-ELSD usando a coluna HPX-87P. A: amostra BMT45 (RB867515 seca a 45 °C) e B: BMA45 (RB127045). Picos: 1. CEL; 2. GLI; 3. XIL e 4. ARA.

De acordo com a Figura 10, foi observado o pico celobiose de baixa intensidade. Isso indica que a hidrólise foi praticamente completa. Além disso, os carboidratos GAL e MAN não foram detectados para todas as amostras analisadas. GLI e XIL foram os carboidratos majoritários.

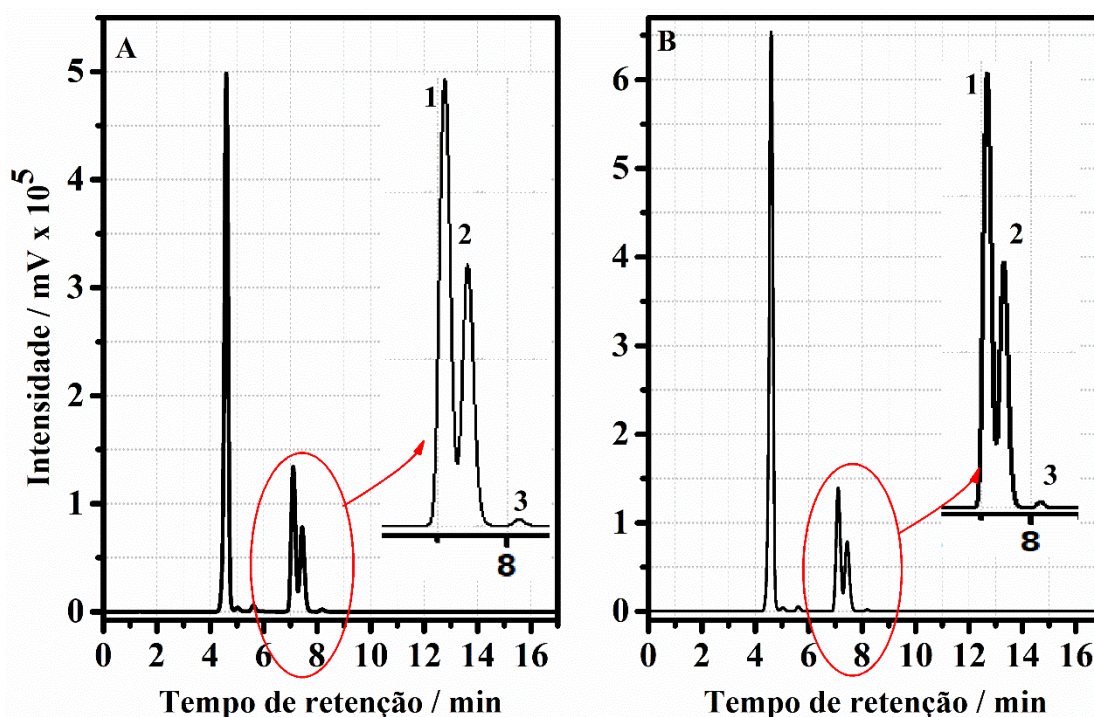
Os cromatogramas dos hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar obtidos usando a coluna HPX-87P apresentaram efeito de matriz significativo, ou seja, os constituintes presentes na biomassa (matriz) interferem na resposta. O efeito de matriz, que afetou a linha de base dos cromatogramas, pode ser observado após o tempo de aproximadamente 8 minutos. Análises estatísticas mostraram que o efeito de matriz superestimou a concentração dos carboidratos quantificados, principalmente para ARA, que foi o carboidrato mais afetado. Devido a este efeito, optou-se por substituir a coluna Bio-Rad HPX-87P pela HPX-87H.

A coluna HPX-87H possui como vantagens em relação a HPX-87P, a possibilidade de ser usada com fase móvel ácida, *i.e.*, pH entre 1 e 3 e não apresentar o efeito de matriz observado na Figura 10. No entanto, misturas com os carboidratos GLI, XIL, ARA, GAL e MAN não são recomendadas para esta coluna, uma vez que os carboidratos GAL e MAN co-eluem com os três primeiros (Figura 11A). Já que apenas os carboidratos GLI; XIL e ARA foram detectados nas amostras de hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar a coluna HPX-87H é a mais recomendada.



**Figura 11.** Cromatogramas típicos obtidos na coluna HPX-87H de uma solução padrão contendo a mistura GLI, XIL, ARA, GAL, MAN, HMF e FUR. Cromatograma A: separação dos carboidratos da mistura GLI, XIL, ARA, GAL, MAN no ELSD; cromatograma B: separação dos furânicos HMF e FUR no detector PDA.

Os resultados apresentados na Figura 11 ilustram a co-eluição dos carboidratos GLI, XIL, ARA, GAL e MAN presentes no padrão ao utilizar a coluna HPX-87H. Observa-se também que o tempo total de corrida foi de 19 minutos. 7,5 minutos para a saída do último carboidrato e 18,5 min para a saída do furfural.



**Figura 12.** Cromatogramas típicos obtidos na coluna HPX-87H dos hidrolisados das amostras A: BMA15 e B: BMA45. Picos: 1. GLI, 2. XIL e 3. ARA.

Os resultados apresentados na Figura 12 ilustram a separação típica dos carboidratos presentes nas amostras analisadas de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar. Conforme observado na Figura 12, nenhum efeito de matriz foi observado. Deste modo as previsões das concentrações de carboidratos são mais confiáveis nesta coluna. Outra vantagem da utilização desta coluna foi no preparo da amostra, uma vez que não foi necessário realizar correção de pH com  $\text{CaCO}_3$ . Esta etapa consome tempo, reagentes e necessita de um pHmetro.

Modelos de calibração foram construídos para quantificação dos carboidratos. Os resultados são apresentados na Tabela 19 e indicam modelos bem ajustados com coeficientes de determinação,  $R^2$  próximos a 1.

**Tabela 19.** Modelos de calibração para os carboidratos separados na coluna HPX-87H.

	$a \times 10^6$	$b \times 10^5$	$R^2$
<b>GLI</b>	1,62	-3,54	0,993
<b>XIL</b>	1,57	-3,42	0,993
<b>ARA</b>	1,54	-3,50	0,992

Coefficientes do modelo linear  $A = aC + b$ , em que  $A$  é a área do pico cromatográfico,  $a$  é o coeficiente angular, ou inclinação e  $b$  é o coeficiente linear, intercepto ou termo constante

As previsões dos conteúdos de glicanas (GLN), xilanas (XLN), arabinanas (ABN) e os cálculos dos valores de CEL e HEM são apresentados na Tabela 20. Os valores são

expressos tendo como base a amostra seca sem extrativos. Estes resultados foram obtidos após separação na coluna HPX-87H das amostras de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar.

**Tabela 20.** Teor de carboidratos e polissacarídeos presentes no hidrolisado do bagaço da cana-de-açúcar de amostras secas e sem de extrativos.

	<b>BMT45</b>		<b>BMA32</b>		<b>BMA35</b>		<b>BMA39</b>		<b>BMA45</b>	
	Média	RSD	Média	RSD	Média	RSD	Média	RSD	Média	RSD
<b>GLN/%</b>	33,19	3,30	33,91	3,05	32,74	2,54	35,80	3,77	33,67	3,50
<b>XLN/%</b>	23,44	1,89	21,40	0,66	21,28	0,55	22,11	0,27	22,83	0,85
<b>ABN/%</b>	6,82	0,55	6,48	0,12	6,47	0,81	6,52	0,39	6,65	0,48
<sup>1</sup> <b>CEL/%</b>	33,19 <sub>ab</sub>	3,30	33,91 <sub>ab</sub>	3,05	32,74 <sub>a</sub>	2,54	35,80 <sub>b</sub>	3,77	33,67 <sub>ab</sub>	3,50
<sup>2</sup> <b>HEM/%</b>	30,26 <sub>d</sub>	1,55	27,88 <sub>a</sub>	0,49	27,75 <sub>a</sub>	0,42	28,63 <sub>b</sub>	0,16	29,48 <sub>c</sub>	0,62

BMT45: RB867515 seca a 45 °C; BMA32: RB127032; BMA35: RB127035; BMA39: RB127039 e BMA45: RB127045. GLN: glicanas; XLN: xilanas; ARB: arabinanas. Médias de seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de *Tukey* a 5% de significância.

<sup>1</sup> A celulose foi expressa de acordo com o teor de glicanas. <sup>2</sup> O cálculo das hemiceluloses foi simulado com base no somatório das xilanas e arabinanas presentes na biomassa. A galactose e manose não foram detectadas e não foi considerado o teor de glicose presente na hemicelulose.

Dentre os carboidratos analisados, as GLN apresentaram em média maiores teores com valores variando de 32,74 a 35,78% e RSD menor que 4,0%. Em relação as HEM, a mais representativa foi a XLN com valores variando entre 21,11 e 23,44% e RSD menor que 2,0%.

Os valores de carboidratos em bagaço de cana-de-açúcar obtidos por diferentes autores são mostrados na Tabela 21.

**Tabela 21.** Variação nos teores de carboidratos presentes no hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar.

<b>Autores</b>	<b>GLN</b>	<b>XLN</b>	<b>GTN</b>	<b>ABN</b>	<b>MNN</b>	<b>HEM</b>
(SASAKI et al., 2003)	35,0	-	-	-	-	35,8
(LEE, 1997)	38,1	23,3	1,1	2,5	ND	26,7
(ANDRADE; COLODETTE, 2014)	41,6	18,9	0,5	1,2	ND	20,6
(DE CARVALHO et al., 2015)	41,8	24,8	0,87	2,27	0,93	28,87
(ROCHA, G. J. M. et al., 2015)	39,51- 45,65	20,82 - 26,84	ND	1,34 - 2,47	ND	22,16 - 29,31
(MASARIN et al., 2011)	38,2 - 43,2	-	-	-	-	25,2 - 31,6
(MARYANA et al., 2014)	44,43	-	-	-	-	22,9
(GUILHERME et al., 2015)	38,59 ± 3,45	-	-	-	-	27,89 ± 2,68
(HOANG et al., 2017)	37,8 - 46,4	20,8 - 26,9	0,6 - 0,9	0,9 - 2,3	ND	22,3 - 30,1
(NEUREITER et al., 2002)	40,19	22,54	1,40	2,00	0,48	26,42
ESTE TRABALHO	32,74 - 35,80	21,18 - 23,44	-	6,47 - 6,82	-	27,75 - 30,26

ND, não detectado. Glicanas (GLN), Xilanas (XLN), Arabinanas (ABN), Galactanas (GTN), Mananas (MNN) e Hemicelulose total (HEM).

Uma análise da Tabela 21 mostra que os teores de celulose obtidos para os cinco genótipos estudados se encontraram pouco abaixo da faixa encontrada na literatura, a qual variou de 35,0 – 46,4% (SASAKI et al., 2003; HOANG et al., 2017). Porém, para compensar o menor teor de celulose, foi observado um aumento no conteúdo de ABN em relação ao obtido por diversos autores. Para as XLN e o conteúdo de HEM total, os valores foram similares ao reportado na literatura.

### 5.6. Balanço de massa total

Na caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar, conseguir um balanço de massa igual a 100% não é uma tarefa trivial. Isto se justifica devido à dificuldade de isolamento das macromoléculas que constituem a parede celular (celulose, hemicelulose e lignina) sem comprometê-las. Além disso, o elevado número de etapas das análises aumenta o erro aleatório e são passíveis de erros sistemáticos.

Para este trabalho, o balanço de massa total das amostras de bagaço de cana-de-

açúcar analisadas foi obtido somando os teores individuais de extrativos, lignina total, cinzas totais, celulose e hemicelulose para cada amostra com base na biomassa seca e com extrativos. Os resultados estão dispostos na Tabela 22.

**Tabela 22.** Constituintes químicos do bagaço de cana-de-açúcar, base biomassa seca com extrativos.

	<b>BMT45</b>		<b>BMA32</b>		<b>BMA35</b>		<b>BMA39</b>		<b>BMA45</b>	
	Média	RSD	Média	RSD	Média	RSD	Média	RSD	Média	RSD
<b>Extr/%</b>	16,53 <sup>a</sup>	2,25	14,77 <sup>b</sup>	8,01	11,99 <sup>b</sup>	6,37	8,67 <sup>b</sup>	9,02	19,49 <sup>b</sup>	4,89
<b>LI/%<sup>b</sup></b>	18,21	0,62	20,64	1,52	21,75	2,17	22,53	1,17	15,91	0,76
<b>SL/%<sup>b</sup></b>	1,91	4,26	0,87	1,91	1,22	1,37	1,23	1,35	1,20	2,44
<b>LS/%<sup>b</sup></b>	2,04	1,91	1,71	2,59	1,60	1,81	1,77	3,37	2,00	2,74
<b>LT/%<sup>b</sup></b>	18,34	0,84	21,48	1,63	22,13	2,24	23,07	0,82	16,71	1,11
<b>CT/%<sup>b</sup></b>	3,63	2,21	2,12	1,31	2,62	1,83	2,29	3,18	2,60	2,34
<b>GLN/%<sup>b</sup></b>	27,71	3,11	28,91	4,05	28,82	3,20	32,67	3,34	27,11	3,14
<b>XLN/%<sup>b</sup></b>	19,56	1,85	18,24	2,00	18,73	0,99	20,19	1,13	18,38	1,77
<b>ABN/%<sup>b</sup></b>	5,69	0,89	5,52	1,27	5,69	0,26	5,95	0,64	5,35	0,71
<b><sup>1</sup>CEL/%<sup>b</sup></b>	27,71	3,11	28,91	4,05	28,82	3,20	32,67	3,34	27,11	3,14
<b><sup>2</sup>HEM/%<sup>b</sup></b>	25,26	1,55	23,76	1,83	24,42	0,75	26,14	1,01	23,73	1,52
<b>Total/%</b>	<b>91,47</b>	<b>1,25</b>	<b>91,04</b>	<b>1,19</b>	<b>89,99</b>	<b>0,97</b>	<b>92,85</b>	<b>1,32</b>	<b>89,65</b>	<b>1,46</b>

BMT45: RB867515 seca a 45 °C. BMA32: RB127032. BMA35: RB127035. BMA39: RB127039 e BMA45: RB127045. Extrativos (Extr), Lignina insolúvel (LI), Sílica na lignina (SL), Lignina solúvel (LS), Lignina total (LT), Cinzas totais (CT), Glicanas (GLN), Xilanas (XLN), Arabinanas (ABN), Celulose (CEL) e Hemicelulose total (HEM). Os subíndices <sup>a,b</sup>, correspondem a média obtida com 10 e 3 repetições, respectivamente. RSD: desvio padrão relativo.

<sup>1</sup> A celulose foi expressa de acordo com o teor de glicanas. <sup>2</sup> O cálculo das hemiceluloses foi simulado com base no somatório das xilanas e arabinanas presentes na biomassa. A galactose e manose não foram detectadas e não foi considerado o teor de glicose presente na hemicelulose.

Os resultados apresentados na Tabela 22 mostram que o balanço de massa total para as amostras estudadas, atingiram teores entre 89,6 a 92,8% e RSD inferior a 1,5%. Estes resultados são similares aos reportados por Masarin et al. (2011) e Hoang et al. (2017), os quais encontraram valores de balanços médios de 92,4% e 93,6%, respectivamente.

O genótipo denominado BMA39, apresentou melhores resultados para os teores de lignina e carboidratos totais (CEL+HEM). Isso pode ser explicado pelo fato desta amostra ser classificada como cana-energia e, possuir elevado teor de fibra em sua composição (33,41%). Em contra partida, BMA45 obteve-se menores teores de lignina total, celulose e hemicelulose, ao compará-la com as demais, por ser o clone que destacou-se com menor conteúdo de fibras (11,11%).

Neste trabalho não foram quantificadas as concentrações de grupo acetil e ácidos urônicos. Esses grupos encontram-se ligados à hemicelulose, mais especificamente, à

cadeia de xilana e são liberados durante a hidrólise (MCDOUGALL et al., 1993; CARVALHEIRO et al., 2004). A não quantificação destes teores e a perda de extrativos voláteis durante a secagem da amostra, são razões que contribuiram para que o balanço de massa não atingisse valores muito próximos a 100%.

**Tabela 23.** Teores de grupos acetil e ácidos urônicos presentes no bagaço de cana-de-açúcar encontrados na literatura.

<b>Autores</b>	<b>Grupos Acetil/%*</b>	<b>Ácidos Urônicos/%</b>
(DE CARVALHO et al., 2015)	2,56	1,24
(CANILHA et al., 2011)	2,6	-
(PITARELO et al., 2012)	3,0	-
(AMORES et al., 2013)	3,1	-
(CARRASCO et al., 2010)	2,0	-
(ROCHA et al., 2015)	2,06-3,11	-
(ANDRADE; COLODETTE, 2014)	1,9	1,0
(BATALHA et al., 2015)	3,3	2,4
(ROCHA et al., 2012)	3,7	-

\*Base biomassa seca com extrativos.

De acordo com a Tabela 23, pode observar que o conteúdo de grupos Acetil possui valores significativos, na faixa de 1,9 a 3,7%. Por outro lado, os ácidos urônicos possuem menores teores variando entre 1,0 a 2,4% e por isso muitas vezes não são analisados. Portanto, a quantificação desses componentes, faz que o balanço de massa total se aproxime mais do valor exato.

É importante ressaltar que os grupos acetil protegem as xilanas contra a reação de despolimerização terminal e, portanto a perda desse grupo durante a hidrólise irá causar perda no rendimento.

A liberação dos ácidos urônicos durante a hidrólise é indesejável, pois produzem compostos tóxicos, como o metano. Além disso, no âmbito da celulose e papel esses ácidos podem causar amarelamento das folhas e, portanto aumento no gasto de reagentes.

## 6. CONCLUSÕES

Com auxílio de planejamentos experimentais, análises gravimétricas, métodos cromatográficos e técnicas espectroscópicas foi possível realizar um estudo dos procedimentos usados para quantificação dos principais constituintes do bagaço de cana-de-açúcar. Alguns procedimentos foram melhorados com ganhos significativos no tempo e custo da análise. Além disso, um maior conhecimento da amostra e de cada procedimento foi obtido. As diferentes temperaturas estudadas para secagem das amostras não demonstraram diferenças significativa pelo teste de *Tukey* a 5% de significância e a condição recomendada é a secagem em estufa à 45 °C por 24 h. Para a remoção e determinação de extrativos, os tempos ótimos encontrados em água e etanol foram diminuídos significativamente. Na etapa de hidrólise, um maior tempo é necessário em ácido sulfúrico concentrado para que as celobioses sejam quebradas liberando a glicose. O método desenvolvido para separação e quantificação dos carboidratos no HPLC foi eficiente, preciso e exato. O tempo de separação cromatográfica foi reduzido em cerca de 30% com a adição de acetonitrila na fase móvel. A coluna HPX-87H apresentou melhor confiabilidade na quantificação dos carboidratos no hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar das amostras analisadas. Além disso o uso da coluna HPX-87H não exige a correção do pH antes da injeção no HPLC. O balanço de massa total para o bagaço de cana-de-açúcar, apresentou resultado entre 90 a 92,8%, o qual foi considerado satisfatório, uma vez que as determinações de grupos acetil e ácidos urônicos não foram realizadas.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR FILHO, J. M. M. **Análise enzimática de fungos lignocelulolíticos cultivados em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar**. 2008. 79 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - USP, Piracicaba, SP, 2008.

ALEXANDER, A. G. **Sugarcane physiology: A comprehensive study of the Saccharum source-to-sink system**. New York: Elsevier, 1973.

ALMEIDA, M. B. B. **Bio-óleo a partir da pirólise rápida, térmica ou catalítica, da palha da cana-de-açúcar e seu co-processamento com gasóleo em craqueamento catalítico**. 2008. 149 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2008.

ALVES, E. F.; BOSE, S. K.; FRANCIS, R. C.; COLODETTE, J. L.; IAKOVLEV, M.; VAN HEININGEN, A. Carbohydrate composition of eucalyptus, bagasse and bamboo by a combination of methods. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 4, p. 1097-1101, 2010.

AMERICAN SOCIETY OF TESTING AND MATERIALS – ASTM. **D1102-84(2013): Standard Test Method for Ash in Wood**. West Conshohocken, PA: ASTM. 2013.

\_\_\_\_\_. **D1105-96(2013): Standard Test Method for Preparation of Extractive-Free Wood**. West Conshohocken, PA: ASTM. 2013.

\_\_\_\_\_. **D1107-96(2013): Standard Test Method for Ethanol-Toluene Solubility of Wood**. West Conshohocken, PA: ASTM. 2013.

\_\_\_\_\_. **D1110-84(2013): Standard Test Method for Water Solubility of Wood**. West Conshohocken, PA: ASTM. 2013.

\_\_\_\_\_. **D5896-96(2012): Standard Test Method for Carbohydrate Distribution of Cellulosic Materials**. West Conshohocken, PA: ASTM. 2012.

\_\_\_\_\_. **E1690-08(2016): Standard Test Method for Determination of Ethanol Extractives in Biomass**. West Conshohocken, PA: ASTM. 2016.

\_\_\_\_\_. **E1721-01(2015): Standard Test Method for Determination of Acid-Insoluble Residue in Biomass**. West Conshohocken, PA: ASTM. 2015.

\_\_\_\_\_. **E1755-01(2015): Standard Test Method for Ash in Biomass**. West Conshohocken, PA: ASTM. 2015.

AMORES, I.; BALLESTEROS, I.; MANZANARES, P.; SÁEZ, F.; MICHELENA, G.; BALLESTEROS, M. Ethanol production from sugarcane bagasse pretreated by steam explosion. **Electronic Journal of Energy & Environment**, v. 1, n. 1, p. 25-36, 2013.

ANDRADE, A. M.; DUARTE, A. P. C.; BELGACEM, M. N.; MUNARO, E. R. Produção de papéis artesanais das misturas de aparas com fibras virgens de bambu (*Dendrocalamus giganteus*) e de bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*). **Floresta e Ambiente**, v. 8, n. 1, p. 143-152, 2001.

ANDRADE, M. F.; COLODETTE, J. L. Dissolving pulp production from sugar cane bagasse. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 58-64, 2014.

ASSIS, C.; RAMOS, R. S.; SILVA, L. A.; KIST, V.; BARBOSA, M. H. P.; TEOFILLO, R. F. Prediction of Lignin Content in Different Parts of Sugarcane Using Near-Infrared Spectroscopy (NIR), Ordered Predictors Selection (OPS), and Partial Least Squares (PLS). **Applied Spectroscopy**, v. 71, n. 8, p. 2001-2012, 2017.

ASSUMPÇÃO, R. M. V.; PINHO, M. R. R.; CAHEN, R.; PHILIPP, P. Polpação química. In: D'ALMEIDA, M. L. O. (Ed.). **Celulose e papel: tecnologia de fabricação de pasta celulósica**. 2ª ed. São Paulo: Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT), v. 1, 1988. cap. VI, p. 169 - 312.

BACCARIN, J. G.; GEBARA, J. J.; BORGES JÚNIOR, J. C. Expansão canavieira e ocupação formal em empresas sucroalcooleiras do Centro-Sul do Brasil, entre 2007 e 2009. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 49, n. 2, p. 493-506, 2011.

BACCHI, M. R. P.; ALVES, L. R. A. Formação de preço do açúcar cristal empacotado ao varejo da região Centro-Sul do Brasil. **Agricultura em São Paulo**, v. 53, n. 1, p. 5-22, 2004.

BACOVSKY, D.; LUDIWCZEK, N.; POINTNER, C.; VERMA, V. K. **IEA Bioenergy Countries' Report. Bioenergy policies and status of implementation**. IEA Bioenergy Agreement (European Union). 2016

BAKKER, H. The Morphology of the Sugar Cane Plant. In. **Sugar Cane Cultivation and Management**. 1ª ed.: Springer, 1999. p. 3-8.

BALAT, M.; BALAT, H. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. **Applied Energy**, v. 86, n. 11, p. 2273-2282, 2009.

BARBOSA, L. C. A.; MALTHA, C. R. A.; SILVA, V. L.; COLODETTE, J. L. Determination of the siringyl/guaiacyl ratio in eucalyptus wood by pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry (PY-GC/MS). **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2035-2041, 2008.

BARROS NETO, B.; SCARMÍNIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na indústria**. Campinas, SP: Editora Unicamp, 2001. 401 p.

BATALHA, L. A. R.; HAN, Q.; JAMEEL, H.; CHANG, H. M.; COLODETTE, J. L.; GOMES, F. J. B. Production of fermentable sugars from sugarcane bagasse by enzymatic hydrolysis after autohydrolysis and mechanical refining. **Bioresource Technology**, v. 180, p. 97-105, 2015.

BEZERRA, T. L.; RAGAUSKAS, A. J. A review of sugarcane bagasse for second-generation bioethanol and biopower production. **Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr**, v. 10, n. 5, p. 634-647, 2016.

BHOWMIK, S. S. D.; BRININ, A. K.; WILLIAMS, B.; MUNDREE, S. G. Sugarcane biotechnology: tapping unlimited potential In: O'HARA, I. M. e MUNDREE, S. G.

(Eds.). **Sugarcane-Based: Biofuels and Bioproducts** 1<sup>a</sup> ed.: Wiley-Blackwell, 2016. cap. 2, p. 23 - 52.

BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin biosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, p. 519-546, 2003.

BRIENZO, M.; SIQUEIRA, A. F.; MILAGRES, A. M. F. Search for optimum conditions of sugarcane bagasse hemicellulose extraction. **Biochemical Engineering Journal**, v. 46, n. 2, p. 199-204, 2009.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D. C. **Planejamento de experimentos usando o Statística**. Rio de Janeiro: E-Papers Serviços Editoriais, 2003. 260 p.

CANILHA, L.; CHANDEL, A. K.; MILESSI, T. S. D.; ANTUNES, F. A. F.; FREITAS, W. L. D.; FELIPE, M. D. A.; DA SILVA, S. S. Bioconversion of Sugarcane Biomass into Ethanol: An Overview about Composition, Pretreatment Methods, Detoxification of Hydrolysates, Enzymatic Saccharification, and Ethanol Fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2012.

CANILHA, L.; MILAGRES, A. M. F.; SILVA, S. S.; SILVA, J. B. A.; FELIPE, M. G. A.; ROCHA, G. J. M.; FERRAZ, A.; CARVALHO, W. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal. **Revista Analytica**, v. 44, p. 48-54, 2010.

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

CARAMEZ, M. **Produção de Endoxilanasas Termoestáveis por Termomyces lanuginosus IOC-4145 em Meio Semi-Sólido**. 1999. 113 f. Mestrado em Tecnologia de Processos Químico e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1999.

CARASCHI, J. C.; CAMPANA FILHO, S. P.; CURVELO, A. A. S. Preparação e caracterização de polpas para dissolução obtidas a partir de bagaço de cana-de-açúcar. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 3, p. 24-29, 1996.

CARDONA, C. A.; QUINTERO, J. A.; PAZ, I. C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4754-4766, 2010.

CARRASCO, C.; BAUDEL, H. M.; SENDELIUS, J.; MODIG, T.; ROSLANDER, C.; GALBE, M.; HAHN-HAGERDAL, B.; ZACCHI, G.; LIDEN, G. SO<sub>2</sub>-catalyzed steam pretreatment and fermentation of enzymatically hydrolyzed sugarcane bagasse. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 2, p. 64-73, 2010.

CARVALHEIRO, F.; ESTEVES, M. P.; PARAJO, J. C.; PEREIRA, H.; GIRIO, F. M. Production of oligosaccharides by autohydrolysis of brewery's spent grain. **Bioresource Technology**, v. 91, n. 1, p. 93-100, 2004.

CARVALHO, L. A.; SILVA JUNIOR, C. A.; NUNES, W. A. G. A.; MEURER, I.; SOUZA JÚNIOR, W. S. Produtividade e viabilidade econômica da cana-de-açúcar em diferentes sistemas de preparo do solo no Centro-Oeste do Brasil. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 34, n. 1, p. 199-211, 2011.

CATRINCK, M. N.; RIBEIRO, E. S.; MONTEIRO, R. S.; RIBAS, R. M.; BARBOSA, M. H. P.; TEOFILO, R. F. Direct conversion of glucose to 5-hydroxymethylfurfural using a mixture of niobic acid and niobium phosphate as a solid acid catalyst. **Fuel**, v. 210, p. 67-74, 2017.

CHAKAR, F. S.; RAGAUSKAS, A. J. Review of current and future softwood kraft lignin process chemistry. **Industrial Crops and Products**, v. 20, n. 2, p. 131-141, 2004.

CHANDEL, A. K.; DA SILVA, S. S.; CARVALHO, W.; SINGH, O. V. Sugarcane bagasse and leaves: foreseeable biomass of biofuel and bio-products. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 87, n. 1, p. 11-20, 2012.

CHEN, H. Z.; FU, X. G. Industrial technologies for bioethanol production from lignocellulosic biomass. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 57, p. 468-478, 2016.

CHERDCHIM, B.; MAJCHERCZYK, A.; KÜES, U. **Effects of Laccase in Combination with other Enzymes on Hydrolysis of Cellulose to Glucose in Biofuel Production**. 4<sup>th</sup> International Conference on Sustainable Energy and Environment (SEE 2011): A Paradigm Shift to Low Carbon Society. Bangkok, Thailand: 1-8 p. 2012.

CHONG, B. F.; PURCELL, D. E.; O'SHEA, M. G. Diffuse Reflectance, Near-Infrared Spectroscopic Estimation of Sugarcane Lignocellulose Components-Effect of Sample Preparation and Calibration Approach. **Bioenergy Research**, v. 6, n. 1, p. 153-165, 2013.

CIB - Conselho de Informações sobre Biotecnologia. **Guia da cana-de-açúcar: Avanço científico beneficia o país**. 2009. Disponível em: < [http://cib.org.br/wp-content/uploads/2011/10/guia\\_cana.pdf](http://cib.org.br/wp-content/uploads/2011/10/guia_cana.pdf)>.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas, São Paulo: Editora Unicamp, 2006. 452 p.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar v.3- Safra 2016/2017**. N.4- Quarto levantamento abril /2017.- Brasília: CONAB, 2017a.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar v.4 - Safra 2017/18**. N.3 - Terceiro levantamento dezembro /2017 - Brasília: CONAB, 2017b.

CRUZ, M. P.; BARBOSA, L. C. A.; MALTHA, C. R. A.; GOMIDE, J. L.; MILANEZ, A. F. Chemical characterization of pitch in Eucalyptus pulp and paper industry. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 459-466, 2006.

CURVELO, A. A. S. **Processos de deslignificação organossolve**. 1992. 94 f. Tese (Livro Docência), Instituto de Química de São Carlos - UFSCar, São Paulo, 1992.

D'ALMEIDA, M. L. O. Composição Química dos Materiais Lignocelulósicos. In: D'ALMEIDA, M. L. O. (Ed.). **Celulose e Papel: Tecnologia de fabricação da pasta celulósica**. 2ª ed. Brasil: Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT), v. 1, 1988. cap. III, p. 45 - 105.

DAS, P.; GANESH, A.; WANGIKAR, P. Influence of pretreatment for deashing of sugarcane bagasse on pyrolysis products. **Biomass & Bioenergy**, v. 27, n. 5, p. 445-457, 2004.

DE CARVALHO, D. M.; SEVASTYANOVA, O.; PENNA, L. S.; DA SILVA, B. P.; LINDSTROM, M. E.; COLODETTE, J. L. Assessment of chemical transformations in eucalyptus, sugarcane bagasse and straw during hydrothermal, dilute acid, and alkaline pretreatments. **Industrial Crops and Products**, v. 73, p. 118-126, 2015.

DE OLIVEIRA, M. E. D.; VAUGHAN, B. E.; RYKIEL, E. J. Ethanol as fuels: Energy, carbon dioxide balances, and ecological footprint. **Bioscience**, v. 55, n. 7, p. 593-602, 2005.

DEL RIO, J. C.; GUTIERREZ, A.; HERNANDO, M.; LANDIN, P.; ROMERO, J.; MARTINEZ, A. T. Determining the influence of eucalypt lignin composition in paper pulp yield using Py-GC/MS. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 74, n. 1-2, p. 110-115, 2005.

DEL RIO, J. C.; MARQUES, G.; LINO, A. G.; LIMA, C. F.; COLODETTE, J. L.; GUTIERREZ, A. Lipophilic phytochemicals from sugarcane bagasse and straw. **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 992-1000, 2015.

EBRAHIMI-NAJAFABADI, H.; LEARDI, R.; JALALI-HERAVI, M. Experimental Design in Analytical Chemistry-Part I: Theory. **Journal of Aoac International**, v. 97, n. 1, p. 3-11, 2014.

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

FIORELLI, J.; SARTORI, D. D.; CRAVO, J. C. M.; SAVASTANO, H.; ROSSIGNOLO, J. A.; DO NASCIMENTO, M. F.; LAHR, F. A. R. Sugarcane Bagasse and Castor Oil Polyurethane Adhesive-based Particulate Composite. **Materials Research-Ibero-American Journal of Materials**, v. 16, n. 2, p. 439-446, 2013.

FREIRE, C. S. R.; SILVESTRE, A. J. D.; NETO, C. P. Identification of new hydroxy fatty acids and ferulic acid esters in the wood of Eucalyptus globulus. **Holzforschung**, v. 56, n. 2, p. 143-149, 2002.

GARZON FUENTES, L. L. **Determinação de dados cinéticos da deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar e da hidrólise enzimática no pre-tratamento com hidróxido de cálcio**. 2009. 114 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2009.

GILANI, B.; STUART, P. R. Life cycle assessment of an integrated forest biorefinery: hot water extraction process case study. **Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr**, v. 9, n. 6, p. 677-695, 2015.

GÓMEZ RUEDA, S. M. **Pré-tratamento e Hidrólise Enzimática do Bagaço de Cana-de-açúcar**. 2010. 130 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2010.

GONZALEZ, M. H.; BIANCHI, S. R.; PEREIRA, C. D.; CASSIANO, N. M.; CASS, Q. B. Detector evaporativo com espalhamento de luz: princípios de operação e aplicações em cromatografia líquida de alta eficiência. **Scientia Chromatographica**, p. 315-325, 2011.

HAGHIGHI MOOD, S.; GOLFESHAN, A. H.; TABATABAEI, M.; JOUZANI, G. S.; NAJAFI, G.; GHOLAMI, M.; ARDJMAND, M. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 77-93, 2013.

HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, A.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. **Preparation of samples for compositional analysis**. Laboratory Analytical Procedure (LAP), Golden, CO: Technical Report NREL/TP-510-42620, 2008.

HILLIS, W. E.; SUMIMOTO, M. Effect of extractives on pulping. In: ROWE, J. W. (Ed.). **Natural Products of Woody Plants**. 1ª ed. Berlin: Springer, 1989. cap. 9.3, p. 880-920.

HOANG, N. V.; FURTADO, A.; DONNAN, L.; KEEFFE, E. C.; BOTHA, F. C.; HENRY, R. J. High-Throughput Profiling of the Fiber and Sugar Composition of Sugarcane Biomass. **Bioenergy Research**, v. 10, n. 2, p. 400-416, 2017.

HOAREAU, W.; TRINDADE, W. G.; SIEGMUND, B.; CASTELLAN, A.; FROLLINI, E. Sugar cane bagasse and curaua lignins oxidized by chlorine dioxide and reacted with furfuryl alcohol: characterization and stability. **Polymer Degradation and Stability**, v. 86, n. 3, p. 567-576, 2004.

HUBBE, M. A.; ROJAS, O. J.; LUCIA, L. A.; SAIN, M. CELLULOSIC NANOCOMPOSITES: A REVIEW. **Bioresources**, v. 3, n. 3, p. 929-980, 2008.

HUMBERT, R. P. **The Growing of Sugar Cane**. Elsevier, 1963.

INMAN-BAMBER, N. G.; SMITH, D. M. Water relations in sugarcane and response to water deficits. **Field Crops Research**, v. 92, n. 2-3, p. 185-202, 2005.

JANSSON, M. B.; NILVEBRANT, N.-O. Wood extractives. In: EK, M.; GELLERSTEDT, G., *et al* (Eds.). **Pulp and paper chemistry and technology, wood chemistry and biotechnology**. 1ª ed. Berlin, Germany: Walter de Gruyter GmbH & Co. KG, v. 1, 2009. cap. 7, p. 147-171.

KHAN, M. A.; ASHRAF, S. M. Studies on thermal characterization of lignin: Substituted phenol formaldehyde resin as wood adhesives. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 89, n. 3, p. 993-1000, 2007.

KIM, M.; DAY, D. F. Composition of sugar cane, energy cane, and sweet sorghum suitable for ethanol production at Louisiana sugar mills. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, n. 7, p. 803-807, 2011.

- KRALOVA, I.; SJOBLUM, J. Biofuels-Renewable Energy Sources: A Review. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 31, n. 3, p. 409-425, 2010.
- KROGELL, J.; KOROTKOVA, E.; ERANEN, K.; PRANOVICH, A.; SALMI, T.; MURZIN, D.; WILLFOR, S. Intensification of hemicellulose hot-water extraction from spruce wood in a batch extractor - Effects of wood particle size. **Bioresource Technology**, v. 143, p. 212-220, 2013.
- KUCHELMEISTER, C.; BAUER, S. Rapid Small-Scale Determination of Extractives in Biomass. **Bioenergy Research**, v. 8, n. 1, p. 68-76, 2015.
- LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology**, v. 56, n. 1, p. 1-24, 1997.
- LIN, S. Y.; DENCE, C. W. **Methods in lignin chemistry**. New York: Springer Science & Business Media, 2012. 578 p.
- LIU, Q.; WANG, S. R.; ZHENG, Y.; LUO, Z. Y.; CEN, K. F. Mechanism study of wood lignin pyrolysis by using TG-FTIR analysis. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 82, n. 1, p. 170-177, 2008.
- MARK, R. E. **Handbook of Physical and Mechanical Testing of Paper and Paperboard**. New York, USA: Dekker, M., 1983. 672 p.
- MARYANA, R.; MA'RIFATUN, D.; WHENI, I. A.; SATRIYO, K. W.; RIZAL, W. A. Alkaline Pretreatment on Sugarcane Bagasse for Bioethanol Production. **Energy Procedia**, v. 47, p. 250-254, 2014.
- MASARIN, F.; GURPILHARES, D. B.; BAFFA, D. C. F.; BARBOSA, M. H. P.; CARVALHO, W.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. Chemical composition and enzymatic digestibility of sugarcane clones selected for varied lignin content. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, 2011.
- MCDUGALL, G. J.; MORRISON, I. M.; STEWART, D.; WEYERS, J. D. B.; HILLMAN, J. R. PLANT FIBERS - BOTANY, CHEMISTRY AND PROCESSING FOR INDUSTRIAL USE. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 62, n. 1, p. 1-20, 1993.
- MOE, S. T.; JANGA, K. K.; HERTZBERG, T.; HAGG, M. B.; OYAAS, K.; DYRSET, N. Saccharification of lignocellulosic biomass for biofuel and biorefinery applications - A renaissance for the concentrated acid hydrolysis? In: TRANELL, G. (Ed.). **Technoport 2012 - Sharing Possibilities and 2nd Renewable Energy Research Conference**, v. 20, 2012. p. 50-58. (Energy Procedia).
- MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. 5. ed. Arizona, Estados Unidos: John Wiley & Sons, 2000. 684 p.
- MONTGOMERY, D. C.; RUNGER, G. C. **Applied statistics and probability for engineers**. 6. ed. Arizona, Estados Unidos: John Wiley & Sons, 2014. 832 p.
- MORAES, M. A. F. D. A influência dos sindicatos nos salários do setor sucroalcooleiro. **Revista de Economia Política**, v. 31, n. 3, p. 471-492, 2011.

MOZAMBANI, A. E.; PINTO, A. S.; SEGATO, S. V.; MATTIUZ, C. F. M. História e morfologia da cana-de-açúcar. In: SEGATO, S. V.; PINTO, A. S., *et al* (Eds.). **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. 1ª ed. Piracicaba, v. 1, 2006. p.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 5th. ed. New York, USA: W. H. Freeman and Company, 2008.

NEUREITER, M.; DANNER, H.; THOMASSER, C.; SAIDI, B.; BRAUN, R. Dilute-acid hydrolysis of sugarcane bagasse at varying conditions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 98, p. 49-58, 2002.

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

OKUNO, F. M. **Desempenho econômico de um sistema de produção de biomassa da cana energia**. 2016. 94 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Sistemas Agrícolas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - USP, São Paulo, 2016.

ORLANDO, U. S.; BAES, A. U.; NISHIJIMA, W.; OKADA, M. Preparation of agricultural residue anion exchangers and its nitrate maximum adsorption capacity. **Chemosphere**, v. 48, n. 10, p. 1041-1046, 2002.

OSULLIVAN, A. C. Cellulose: the structure slowly unravels. **Cellulose**, v. 4, n. 3, p. 173-207, 1997.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 10, p. 1153-1169, 2000.

PARAJULI, R.; DALGAARD, T.; JORGENSEN, U.; ADAMSEN, A. P. S.; KNUDSEN, M. T.; BIRKVED, M.; GYLLING, M.; SCHJORRING, J. K. Biorefining in the prevailing energy and materials crisis: a review of sustainable pathways for biorefinery value chains and sustainability assessment methodologies. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 43, p. 244-263, 2015.

PASQUINI, D.; BALOGH, D. T.; ANTUNES, P. A.; CONSTANTINO, C. J. L.; CURVELO, A. A. S.; AROCA, R. F.; OLIVEIRA, O. N. Surface morphology and molecular organization of lignins in Langmuir-Blodgett films. **Langmuir**, v. 18, n. 17, p. 6593-6596, 2002.

PAULA, L. E. R.; TRUGILHO, P. F.; NAPOLI, A.; BIANCHI, M. L. Characterization of residues from plant biomass for use in energy generation. **Cerne**, v. 17, n. 2, p. 237-246, 2011.

PHILIPPINI, R. R. **Variedades híbridas de bagaço de cana-de-açúcar: caracterização química e hidrólise enzimática em condições de pré-tratamento diferenciadas**. 2012. 82 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, 2012.

PILÓ-VELOSO, D.; NASCIMENTO, E. A.; MORAIS, S. A. L. D. Isolamento e análise estrutural de ligninas. **Química Nova**, v. 16, n. 5, p. 435-448, 1993.

PITARELO, A. P. **Produção de etanol celulósico a partir do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor**. 2013. 162 f. Tese (Doutorado em Química), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

PITARELO, A. P.; SILVA, T. A. D.; PERALTA-ZAMORA, P. G.; RAMOS, L. P. Efeito do teor de umidade sobre o pré-tratamento a vapor e a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 35, n. 8, p. 1502-1509, 2012.

RABELO, S. C.; FONSECA, N. A. A.; ANDRADE, R. R.; FILHO, M., R. ; COSTA, A. C. Ethanol production from enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse pretreated with lime and alkaline hydrogen peroxide. **Biomass & Bioenergy**, v. 35, n. 7, p. 2600-2607, 2011.

RAGAUSKAS, A. J.; WILLIAMS, C. K.; DAVISON, B. H.; BRITOVSEK, G.; CAIRNEY, J.; ECKERT, C. A.; FREDERICK, 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, n. 5760, p. 484-489, 2006.

ROCHA, G. J. D.; MARTIN, C.; SOARES, I. B.; MAIOR, A. M. S.; BAUDEL, H. M.; DE ABREU, C. A. M. Dilute mixed-acid pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production. **Biomass & Bioenergy**, v. 35, n. 1, p. 663-670, 2011.

ROCHA, G. J. M.; MARTIN, C.; DA SILVA, V. F. N.; GOMEZ, E. O.; GONCALVES, 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.; NASCIMENTO, V. M.; GONCALVES, A. R.; SILVA, V. F. N.; MARTIN, C. Influence of mixed sugarcane bagasse samples evaluated by elemental and physical-chemical composition. **Industrial Crops and Products**, v. 64, p. 52-58, 2015.

SAHA, B. C.; ITEN, L. B.; COTTA, M. A.; WU, Y. V. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 12, p. 3693-3700, 2005.

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

SASAKI, M.; ADSCHIRI, T.; ARAI, K. Fractionation of sugarcane bagasse by hydrothermal treatment. **Bioresource Technology**, v. 86, n. 3, p. 301-304, 2003.

SCORTECCI, K. C.; CRESTE, S.; CALSA JR., T.; XAVIER, M. A.; LANDELL, M. G. A.; FIGUEIRA, A.; BENEDITO, V. A. Challenges, Opportunities and Recent Advances in Sugarcane Breeding. In: ABDURAKHMONOV, I. Y. (Ed.). **Plant Breeding** 1<sup>a</sup> ed.: InTech, 2012. cap. 12, p. 267-296.

SILVA, M. A.; SOARES, R. A. B.; LANDELL, M. G. A.; CAMPANA, M. P. Agronomic performance of sugarcane families in response to water stress. **Bragantia**, v. 67, n. 3, p. 655-661, 2008.

SILVA, R.; HARAGUCHI, S. K.; MUNIZ, E. C.; RUBIRA, A. F. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 661-671, 2009.

SJOSTROM, E. **Wood Chemistry: fundamentals and applications**. New York: Academic Press, 1981.

SJOSTROM, E. **Wood Chemistry: fundamentals and applications**. San Diego, p.293. 1993

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**. 8ª ed. São Paulo: Editora Thomson, 2006.

SLUITER, A.; HAMES, B.; HYMAN, D.; PAYNE, C.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; WOLFE, J. **Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples**. Laboratory Analytical Procedure (LAP), Golden, CO: Technical Report NREL/TP-510-42621 2008.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. **Determination of ash in biomass**. Laboratory Analytical Procedure (LAP), Golden, CO: Technical Report NREL/TP-510-42622, 2005.

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), Golden, CO, USA: Technical Report NREL/TP-510-42618, 2008.

SLUITER, J. B.; RUIZ, R. O.; SCARLATA, C. J.; SLUITER, A. D.; TEMPLETON, D. W. Compositional Analysis of Lignocellulosic Feedstocks. 1. Review and Description of Methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 16, p. 9043-9053, 2010.

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

SOARES, S. S.; GUIMARÃES JÚNIOR, J. B.; MENDES, L. M.; MENDES, R. F.; PROTÁSIO, T. P.; LISBOA, F. J. N. Valorização do bagaço de cana-de-açúcar na produção de painéis aglomerados de baixa densidade. **Revista Ciência da Madeira (Brazilian Journal of Wood Science)**, v. 8, n. 2, 2017.

SUN, J. X.; SUN, X. F.; SUN, R. C.; SU, Y. Q. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, n. 2, p. 195-204, 2004.

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

TAMAKI, Y.; MAZZA, G. Measurement of structural carbohydrates, lignins, and micro-components of straw and shives: Effects of extractives, particle size and crop species. **Industrial Crops and Products**, v. 31, n. 3, p. 534-541, 2010.

TAPPI. **Sampling and preparing wood for analysis**. TAPPI Standard Methods T257cm-12, Technical Association of the Pulp and Paper Industry, Atlanta, GA, USA, 2012.

TECHNICAL ASSOCIATION OF THE PULP AND PAPER INDUSTRY - TAPPI. **T 204 cm-07: Solvent Extractives of Wood and pulp**. Atlanta: TAPPI. 2007.

\_\_\_\_\_. **T 207 cm-08: Water Solubility of Wood and Pulp**. Atlanta: TAPPI. 2008.

\_\_\_\_\_. **T 264 cm-07: Preparation of Wood for Chemical Analysis**. Atlanta: TAPPI. 2007.

\_\_\_\_\_. **T 211 om-12: Ash in Wood, Pulp, Paper, and Paperboard: Combustion at 525°C**. Atlanta: TAPPI. 2012.

\_\_\_\_\_. **T 222 om-11: Acid-Insoluble Lignin in Wood and Pulp**. Atlanta: TAPPI. 2011.

\_\_\_\_\_. **T 250 wd-96: Chromatographic Analysis of Purified Pulp**. Atlanta: TAPPI. 1996.

TEJERA, N. A.; RODES, R.; ORTEGA, E.; CAMPOS, R.; LLUCH, C. Comparative analysis of physiological characteristics and yield components in sugarcane cultivars. **Field Crops Research**, v. 102, n. 1, p. 64-72, 2007.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338-350, 2006.

THAMMASOUK, K.; TANDJO, D.; PENNER, M. H. Influence of extractives on the analysis of herbaceous biomass. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 2, p. 437-443, 1997.

TITA, S. P. S.; PAIVA, J. M. F. D.; FROLLINI, E. Resistência ao impacto e outras propriedades de compósitos lignocelulósicos: matrizes termofixas fenólicas reforçadas com fibras de bagaço de cana-de-açúcar. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 12, n. 4, p. 228-239, 2002.

ULLAH, K.; SHARMA, V. K.; DHINGRA, S.; BRACCIO, G.; AHMAD, M.; SOFIA, S. Assessing the lignocellulosic biomass resources potential in developing countries: A critical review. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 51, p. 682-698, 2015.

VASSILEV, S. V.; BAXTER, D.; ANDERSEN, L. K.; VASSILEVA, C. G. An overview of the chemical composition of biomass. **Fuel**, v. 89, n. 5, p. 913-933, 2010.

VERMA, M.; GODBOUT, S.; BRAR, S. K.; SOLOMATNIKOVA, O.; LEMAY, S. P.; LAROUCHE, J. P. Biofuels production from biomass by thermochemical conversion technologies. **International Journal of Chemical Engineering**, v. 2012, 2012.

VIATOR, R. P.; RICHARD, E. P. Sugar and energy cane date of planting effects on cane, sucrose, and fiber yields. **Biomass & Bioenergy**, v. 40, p. 82-85, 2012.

VIERA, R. G. P.; RODRIGUES, G.; DE ASSUNCAO, R. M. N.; MEIRELES, C. D. S.; VIEIRA, J. G.; DE OLIVEIRA, G. S. Synthesis and characterization of methylcellulose from sugar cane bagasse cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 67, n. 2, p. 182-189, 2007.

WIJAYA, Y. P.; PUTRA, R. D. D.; WIDYAYA, V. T.; HA, J. M.; SUH, D. J.; KIM, C. S. Comparative study on two-step concentrated acid hydrolysis for the extraction of sugars from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 164, p. 221-231, 2014.

YAMAN, S. Pyrolysis of biomass to produce fuels and chemical feedstocks. **Energy Conversion and Management**, v. 45, n. 5, p. 651-671, 2004.

YANG, H.; YAN, R.; CHEN, H.; LEE, D. H.; ZHENG, C. Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis. **Fuel**, v. 86, n. 12-13, p. 1781-1788, 2007.

YOON, S. Y.; HAN, S. H.; SHIN, S. J. The effect of hemicelluloses and lignin on acid hydrolysis of cellulose. **Energy**, v. 77, p. 19-24, 2014.

ZHENG, Y.; PAN, Z. L.; ZHANG, R. H.; WANG, D. H. Enzymatic saccharification of dilute acid pretreated saline crops for fermentable sugar production. **Applied Energy**, v. 86, n. 11, p. 2459-2465, 2009.