



Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar
com líquidos iônicos
para produção de xarope de glicose

Ingrid Santos Miguez

Taísa Nogueira Morais

Projeto de Final de Curso

Orientadores:

Prof Maria Antonieta P. Gimenes Couto, D.Sc.

Ayla Sant'Ana da Silva, D.Sc.

Dezembro de 2017

**PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA-DE-
AÇÚCAR COM LÍQUIDOS IÔNICOS PARA PRODUÇÃO DE
XAROPES DE GLICOSE**

Ingrid Santos Miguez

Táisa Nogueira Morais

Projeto de Final de Curso submetido ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários para obtenção de grau de Engenheiro de Bioprocessos.

Aprovado por:

Eliana Flávia C. Sérvulo, D.Sc.

Ricardo Sposina Sobral Teixeira, D.Sc.

Vanessa Alves Lima Rocha, D.Sc.

Orientado por:

Maria Antonieta P. Gimenes Couto, D.Sc.

Ayla Sant'Ana da Silva, D.Sc.

Rio de Janeiro, RJ – Brasil

Dezembro de 2017

Miguez, Ingrid Santos. Moraes, Taísa Nogueira.

Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com líquidos iônicos para a produção de xarope de glicose. Ingrid dos Santos Miguez, Taísa Nogueira Moraes. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2017.

xiii, 102 p; il.

(Projeto Final de Curso) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2017. Orientadoras: Maria Antonieta Peixoto Gimenes Couto e Ayla Sant’Ana da Silva.

1. Líquidos iônicos. 2. Pré-tratamento. 3. Bagaço de cana-de-açúcar 4. Maria Antonieta P. Gimenes Couto 5. Ayla Sant’Ana da Silva. I. Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com líquidos iônicos para a produção de xarope de glicose

Aos nossos pais

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Ayla, sem a qual este trabalho não poderia ser realizado, por toda orientação, ajuda, atenção e tempo dedicado a nós. Obrigada pela oportunidade de trabalharmos no Instituto Nacional de Tecnologia (INT) e nos ajudar a desenvolver habilidades importantes para o meio científico e para a vida. À professora Maria Antonieta pela grande ajuda e orientação.

À Thamires Alves e ao Renan Ferreira, com quem iniciamos este trabalho. À Viridiana Leitão pela maravilhosa liderança fazendo do grupo um verdadeiro time. Ao Leonardo Pazutti pela ajuda com as análises por CLAE, ao Javier que sempre nos fez companhia depois do horário, à Lívia Vasconcelos por todas as conversas e incentivo. Ao Álvaro por todos os favores. Ao Bruno por todos os favores e ajuda, por todos pós-expedientes e por ter se tornado um grande amigo que levaremos para sempre. E a todos do LABIC pelos bons momentos juntos, pelas conversas, reuniões, trocas e bolos. Obrigada pelos aprendizados e experiências que foram além do profissional.

Ao INT pela oportunidade de desenvolver pesquisa mesmo em tempos difíceis como estes e aos seus laboratórios que nos prestaram ajuda quando necessário: ao LACCO (Laboratório de Catálise Laboratorial) pelas análises por difração de raios-X e ao CENANO (Centro de Caracterização em Nanotecnologia para Materiais e Catálise) pelas análises no MEV/MEV-FEG.

Ao Ricardo do Laboratório Bioetanol/UFRJ por liofilizar tantas amostras para nós e à Arturine do Instituto de Química/UFJF que sintetizou os líquidos iônicos triazólicos utilizados neste trabalho.

À INBICON, Novozymes e COAGRO pelos materiais cedidos.

Ao CNPQ pela bolsa concedida.

Ingrid: Agradeço a meus pais, irmão, avós, tios, primos e afilhados por estarem sempre presentes me fazendo acreditar que eu era capaz. E ao meu avô Oliveira minha eterna motivação.

Agradeço imensamente ao suporte e companheirismo que recebi em todos os momentos do meu amado Alberto, que me incentivou desde o começo a persistir em meus sonhos.

Agradeço aos amigos que a universidade me proporcionou e levarei comigo, José Victor, Gabriel, Victor, Daniel e Eduardo, juntos nos estudos e nos rodízios de pizza.

Principalmente, meu sincero obrigada a minha amiga Taísa pela confiança em compartilhar esse momento tão importante da graduação e da vida. Uma amizade que o INT

me deu de presente e a faculdade reforçou. Obrigada por deixar tudo melhor e mais divertido com sua energia e graça mesmo com nossos desesperos com prazos chegando ao fim.

Taísa: Agradeço aos meus pais pelo suporte, apoio e incentivo dados a mim até aqui e aos meus irmãos Camilla e Caio por estarem sempre ao meu lado. Tenho certeza que nossa família, junto ao Pedro, Kleber e Andrea, é a minha base, me mantendo forte diante das dificuldades da vida.

Aos amigos que fiz durante a graduação. Foi um período turbulento de altos e baixos, dúvidas e inseguranças, mas de enorme crescimento e amadurecimento. Ter vocês ao meu lado tornou tudo isso mais leve. Obrigada Duda, Álvaro, Camilla, Dudu, Raissa, Alejandro e a todos com quem eu dividi aflições e risadas, nos corredores ou booms durante esses longos anos de permanência na EQ. Às amigas do spc por permanecerem na minha vida desde os tempos de colégio, dando apoio sempre que preciso.

Por último e mais importante, à Ingrid. Não tenho palavras para agradecer tudo que passamos juntas. Obrigada pela companhia no laboratório, por me fazer rir mesmo quando tudo dava errado, pela dedicação que você tem pelas coisas que faz, por sua organização e comprometimento que permitiram esse trabalho finalmente estar pronto. Obrigada pelos passeios pelo centro, pelas sonecas nas bibliotecas, pelas conversas, pelos chocolates e por sempre me aturar e me ouvir. Obrigada por ser mais que minha dupla: ser minha amiga. Desejo-te todo o sucesso do mundo e que continuemos sendo parceiras, seja de profissão, seja de vida.

Resumo do Projeto Final de Curso apresentado à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para obtenção de grau de Engenharia de Bioprocessos.

PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR COM LÍQUIDOS
IÔNICOS PARA PRODUÇÃO DE XAROPE DE GLICOSE

Ingrid Santos Miguez
Taísa Nogueira Morais

Dezembro, 2017

Orientadoras: Maria Antonieta Peixoto Gimenes Couto, D.Sc
Ayla Sant'Ana da Silva, D.Sc

O Brasil destaca-se como maior produtor mundial de cana-de-açúcar e, com o processamento da cana, milhões de toneladas de bagaço residual são gerados. O pré-tratamento (PT) da biomassa lignocelulósica é uma etapa crucial na conversão dos carboidratos contidos nesse material em açúcares simples. A glicose, açúcar mais abundante no bagaço de cana-de-açúcar, pode ser obtida a partir da hidrólise da celulose e, posteriormente, ser utilizada para produção de biocombustíveis ou bioprodutos. Recentemente, o uso dos líquidos iônicos (LI) para o PT foi reportado como uma alternativa promissora, pois resulta na desestruturação acentuada do complexo lignocelulósico. Neste contexto, no presente trabalho visou avaliar o PT do bagaço de cana-de-açúcar com líquidos iônicos triazólicos inéditos. Para tal, primeiramente a biomassa foi pré-tratada com o líquido iônico comercial acetato de 1-butil-3-metil-imidazólio [Bmim][Ac] para estabelecer as condições reacionais de pré-tratamento mais favoráveis. Escolhida a condição, foi avaliado o PT da biomassa com líquidos iônicos triazólicos inéditos para ao final compará-los com o PT hidrotérmico, uma metodologia já consolidada industrialmente.

Para avaliar o efeito da temperatura no PT, foram realizados ensaios a 80 °C, 100 °C e 120 °C por 120 min com o [Bmim][Ac]. O aumento da temperatura durante o PT melhorou a digestibilidade da celulose durante a hidrólise enzimática. Na hidrólise a 120 °C, o bagaço pré-tratado com [Bmim][Ac] liberou cinco vezes mais glicose do que a biomassa *in natura*. Para avaliar os efeitos do tempo, os PT foram conduzidos de 15 a 120 min a 120 °C. A condição de 120 °C por 120 minutos foi selecionada, pois minimizou o tempo de hidrólise enzimática necessário para atingir altos valores de conversão em glicose.

Os LI triazólicos avaliados foram: LI 83, iodeto de 4-hidroximetil-3-metil-1-propil-1*H*-1,2,3-triazol; LI 100, iodeto de 4-hidroximetil-3-metil-1-hexil-1*H*-1,2,3-triazol; LI 112, brometo de 4-hidroximetil-3-propil-1-propil-1*H*-1,2,3-triazol. Os LI 83 e LI 100 não foram efetivos para o pré-tratamento, evidenciando a baixa eficiência do íon iodeto. Já o LI 112 promoveu um aumento na digestibilidade do material pré-tratado, que atingiu percentuais de conversão da celulose em glicose equivalentes a 75,8% em 4 h de hidrólise. Análises complementares de DRX indicaram que o LI 112 promoveu alterações na cristalinidade, justificando sua maior eficiência, enquanto o LI 83 e o LI 100 não tiveram efeito significativo. Comparativamente, em 6 h de hidrólise enzimática, as biomassas pré-tratadas com LI 112, [Bmim][Ac] e por PT hidrotérmico resultaram, respectivamente, em 36,0 g de glicose/100 g de biomassa, 41,3 g de glicose/100 g de biomassa e 21,1 g de glicose/100 g de biomassa. A hidrólise da biomassa pré-tratada com líquidos iônicos atingiu valores máximos em 24 h, ao passo que a hidrólise do bagaço pré-tratado hidrotérmicamente alcançou a conversão máxima em 72 h, evidenciando que os PT com LI apresentam uma taxa de conversão maior em curtos tempos de hidrólise.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1. Biorrefinarias	18
2.2. Produção de cana-de-açúcar no Brasil	20
2.2.1. Bagaço de cana-de-açúcar	24
2.4. Biomassa lignocelulósica	25
2.4.1. Celulose	25
2.4.2. Hemicelulose	26
2.4.3. Lignina	28
2.5. Processos de conversão da biomassa lignocelulósica	28
2.6. Hidrólise enzimática da celulose	33
2.6.1. Hidrólise ácida	34
2.6.2. Hidrólise enzimática	34
2.7. Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica	38
2.7.1. Pré-tratamento biológico	39
2.7.2. Pré-tratamentos físicos	39
2.7.3. Pré-tratamentos físico-químicos	40
2.7.4. Pré-tratamentos químicos	41
2.8. Líquidos iônicos	44
3. OBJETIVOS	53
3.1. Objetivo geral	53
3.2. Objetivos específicos	53
4. METODOLOGIA	55
4.1. Bagaço de cana-de-açúcar	55
4.2. Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com líquido iônico	55
4.3. Determinação da composição química do bagaço <i>in natura</i> e pré-tratado	58
4.3.1. Determinação de sólidos totais, umidade e cinzas	59
4.3.2. Determinação de extrativos	59
4.3.3. Determinação de carboidratos e lignina	60
4.3.3.1. Quantificação de monossacarídeos e dissacarídeos do material pré-tratado e <i>in natura</i>	62
4.4. Hidrólise enzimática	62
4.4.1. Determinação da atividade enzimática	63
4.4.1.1. Determinação da FPase	63
4.4.1.2. Determinação da β -glicosidase	64
4.4.2. Hidrólise enzimática	65
4.5. Análise da cristalinidade por difração de raios-X	65
4.6. Análise da morfologia da superfície	66
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
5.1. Determinação da composição do bagaço <i>in natura</i>	68
5.2. Determinação das condições de pré-tratamento com o líquido iônico imidazólico	69
5.2.1. Avaliação do efeito da temperatura de pré-tratamento	70
5.2.1.1. Avaliação da composição química das amostras pré-tratadas com [Bmim][Ac] em diferentes temperaturas	70
5.2.1.2. Avaliação da hidrólise enzimática das amostras pré-tratadas com [Bmim][Ac] em diferentes temperaturas	71
5.2.2. Avaliação do efeito de tempo de pré-tratamento	72

5.2.2.1. Avaliação da composição química das amostras pré-tratadas com [Bmim][Ac] em diferentes tempos.....	72
5.2.2.2. Avaliação da hidrólise enzimática das amostras pré-tratadas com [Bmim][Ac] em diferentes tempos.....	73
5.2.2.3. Avaliação da cristalinidade das amostras pré-tratadas com [Bmim][Ac] em diferentes tempos.....	76
5.3. Pré-tratamento com líquidos iônicos triazólicos.....	77
5.3.1. Avaliação da composição química das amostras pré-tratadas com líquidos iônicos triazólicos	77
5.3.2. Avaliação da hidrólise enzimática das amostras pré-tratadas com os líquidos iônicos triazólicos.....	78
5.3.3. Avaliação da cristalinidade das amostras pré-tratadas com os líquidos iônicos triazólicos.....	80
5.4. Comparação entre os pré-tratamentos promissores.....	81
5.4.1. Avaliação da composição química das amostras pré-tratadas.....	81
5.4.2. Avaliação da hidrólise enzimática das amostras pré-tratadas.....	82
5.4.3. Avaliação da morfologia das biomassas pré-tratadas.....	83
6. CONCLUSÃO.....	86
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de blocos representativo dos produtos da biorrefinaria de cana-de-açúcar.	20
Figura 2. Plantação de cana-de-açúcar no interior de São Paulo.....	21
Figura 3. Cinco maiores produtores mundiais de cana-de-açúcar em 2014.....	22
Figura 4. Países com maior área de cultivo de cana-de-açúcar em 2014.	22
Figura 5. Estimativas da quantidade de cana que será moída no Centro-Sul na safra 2017/18.	23
Figura 6. Estrutura lignocelulósica e seus principais constituintes.	25
Figura 7. Representação da cadeia polimérica de celulose com destaque para o dímero celobiose.	26
Figura 8. Representação da cadeia polimérica da hemicelulose 4-O-metil-glucuronoarabinosilana.	27
Figura 9. Representação da estrutura da lignina.....	28
Figura 10. Produtos de cada processo termoquímico de conversão.....	29
Figura 11. Esquema sequencial de bioconversão de açúcares a bioprodutos (a) condicionamento da biomassa (b) pré-tratamento (c) hidrólise enzimática (d) processamento do hidrolisado. ...	31
Figura 12. Possíveis produtos obtidos a partir da celulose.....	32
Figura 13. Etapas da ação sinérgica das enzimas celulolíticas na fibrila de celulose durante a hidrólise enzimática.....	35
Figura 14. Processos de pré-tratamento estabelecidos para desestruturar a biomassa lignocelulósica.....	39
Figura 15. Características importantes para um líquido iônico.....	46
Figura 16. Número de publicações e citações entre 2008 e 2016. Pesquisa do Web of Science em 31/01/2017 sobre o assunto "líquido iônico" e "biomassa" e "pré-tratamento"	45
Figura 17. Cátions e ânions comuns em líquidos iônicos.....	47
Figura 18. Representação esquemática de dissolução da celulose em líquidos iônicos.....	48
Figura 19. Estrutura dos líquidos iônicos triazólicos e do líquido iônico imidazólico.	56
Figura 20. Esquema ilustrativo das etapas de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica com líquidos iônicos.....	57
Figura 21. Sistema empregado no pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com líquido iônico.	57
Figura 22. Esquema ilustrativo das etapas para determinação da composição química do bagaço <i>in natura</i> e pré-tratado.	58
Figura 23. Sistema de extração Soxhlet para determinação dos extrativos.....	60
Figura 24. Diagrama de blocos das etapas das análises realizadas neste trabalho. Fonte: Elaboração própria.....	66
Figura 25. Estruturas moleculares dos líquidos iônicos imidazólicos.a. acetato de 1-butil-3-metil-imidazólico; b. acetato de 1-etil-3-metil-imidazólico.....	70
Figura 26. Concentração de glicose liberada durante a hidrólise enzimática de cana-de-açúcar <i>in natura</i> e pré-tratados com acetato de 1-butil-3-metil-imidazólico ([Bmim][Ac]) a 80, 100 e 120 °C.....	72

Figura 27. Concentração mássica de glicose liberada durante a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> e pré-tratados com acetato de 1-butil-3-metil-imidazólio ([Bmim][Ac]) por 15, 30, 60 e 120 minutos.	74
Figura 28. Perfil de difração de raios-X do bagaço <i>in natura</i> e pré-tratado com [Bmim][Ac] por 15 e 120 minutos.	75
Figura 29. Concentração mássica de glicose liberada durante a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> e pré-tratados com iodeto de 4-hidroximetil-3-metil-1-propil-1H-1,2,3-triazol (LI 83), iodeto de 4-hidroximetil-3-metil-1-hexil-1H-1,2,3-triazol (LI 100) e brometo de 4-hidroximetil-3-propil-1-propil-1H-1,2,3-triazol (LI 112).	79
Figura 30. Perfil de difração de raios-X do bagaço <i>in natura</i> e pré-tratado com iodeto de 4-hidroximetil-3-metil-1-propil-1H-1,2,3-triazol (LI 83), iodeto de 4-hidroximetil-3-metil-1-hexil-1H-1,2,3-triazol (LI 100) e brometo de 4-hidroximetil-3-propil-1-propil-1H-1,2,3-triazol (LI 112).	80
Figura 31. Concentração mássica de glicose liberada durante a hidrólise enzimática de 100 g de bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> e pré-tratado com [Bmim][Ac], brometo de 4-hidroximetil-3-propil-1-propil-1H-1,2,3-triazol (LI 112) e pré-tratado hidrotérmicamente.	83
Figura 32. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura do bagaço de cana-de-açúcar. (a) <i>in natura</i> (b) brometo de 4-hidroximetil-3-propil-1-propil-1H-1,2,3-triazol (LI 112) (c) acetato de 1-butil-3-metil-imidazólio ([Bmim][Ac]) (d) hidrotérmico.	84

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1. Composição química média do bagaço de cana-de-açúcar	24
Quadro 2. Produtos identificados com alto potencial para produção em uma biorrefinaria a partir do bagaço da cana-de-açúcar.	33
Quadro 3. Comparação entre a hidrólise ácida e enzimática.....	37
Quadro 4. Vantagens e desvantagens de cada método de pré-tratamento.....	43
Quadro 5. Efeitos de diferentes pré-tratamentos no processo de decomposição da estrutura lignocelulósica.	44

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Curva de calibração utilizada nas análises de CLAE (mg/mL).....	62
Tabela 2. Composição química do bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> em porcentagem de massa seca baseada com e sem extrativos.	68
Tabela 3. Composição química, em porcentagem de massa seca, do bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> e pré-tratado com [Bmim][Ac] em diferentes temperaturas.....	70
Tabela 4. Composição química, em base seca, do bagaço <i>in natura</i> e pré-tratado com [BMIM][Ac] durante 15, 30, 60 e 120 minutos.	73
Tabela 5. Composição química, em base seca, do bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> e pré-tratado com os líquidos iônicos triazólicos nas condições de 120 min a 120 °C.	77
Tabela 6. Composição química, em base seca, do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com o líquido iônico [Bmim][Ac], LI 112 e pré-tratado hidrotermicamente.....	81

LISTA DE ABREVIACOES

AFEX	<i>Ammonia Fiber Expansion</i>
AS	Solúvel em cido
BGL	β -glucosideglucoidrolases
BGU	Unidade de atividade de β -glicosidase (<i>β-glucosidase unit</i>)
CBH	1,4- β -D-glucana-celobioidrolases
CLAE	Cromatógrafo líquido de alta eficiência
DNS	cido 3,5-dinitrosalicílico
DRX	Difraco por raios-X
EnG	Endoglucanases
HMF	Hidroximetilfurfural
IA	Insolúvel em cido
IU	Unidade de atividade
IUPAC	Uno Internacional de Química Pura e Aplicada
FPU	Unidade de papel de filtro (<i>filter paper unit</i>)
LAP	<i>Laboratory Analytical Procedures</i>
LI	Líquido iônico
LPMOs	Monooxigenases lticas polissacarídicas
LSA	Lignina solúvel em cido
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MEV-FEG	Microscópio eletrônico de varredura com fonte de emissão de campo
PT	Pré-tratamento
RI	ndice de refraco
<i>Syngas</i>	Gás de síntese

Líquidos iônicos:

[Amim][Cl]	Cloreto de 1-alil-3-metil-imidazólio
[Bmim][Ac]	Acetato de 1-butil-3-metil-imidazólio
[Bmim][Cl]	Cloreto de 1-butil-3-metil-imidazólio
[Bmpy][Cl]	Cloreto de 3-metil-N-butilpiridnio
[ChO][Ac]	Acetato de colina
[Emim][Ac]	Acetato de 1-etil-3-metil-imidazólio
LI 83	Iodeto de 4-hidroximetil-3-metil-1-propil-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol
LI 100	Iodeto de 4-hidroximetil-3-metil-1-hexil-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol
LI 112	Brometo de 4-hidroximetil-3-propil-1-propil-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol
LI 117	Acetato de 4-hidroximetil-3-propil-1-propil-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol

1. INTRODUÇÃO

O aumento da população mundial, com o passar dos anos, tem elevado cada vez mais o consumo de energia, e para suprir essa demanda crescente a Indústria Química explorou matérias-primas fósseis para produzir combustíveis (INTERNATIONAL ENERGY OUTLOOK, 2016). No entanto, a queima desses combustíveis fósseis é um dos responsáveis pelo aumento da emissão de gases do efeito estufa (GEE), desencadeando o aumento da temperatura do planeta e irregularidades no regime de chuvas (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2017).

A fim de impedir que as mudanças climáticas progredissem descontroladamente, agências de proteção ambiental introduziram o conceito de Química Verde, de modo a estimular a criação de uma bioeconomia baseada em produtos químicos de origem renovável e sustentável que não agridam ainda mais o planeta. O conceito de sustentabilidade foi definido pela primeira vez no Relatório Brundtland (1987) como “*desenvolvimento que atende às necessidades do presente sem comprometer a capacidade de as gerações futuras atenderem às suas próprias necessidades*”. Assim, ser sustentável seria se desenvolver de forma integral, considerando aspectos ambientais, econômicos e sociais. As questões ambientais vão além da preocupação isolada com o aquecimento global, sendo necessário generalizar a questão econômica até macroeconomia e, ainda, há conceitos sociais a serem considerados, apesar de sua subjetividade (BRUNDTLAND, 1987; VRIES; PETERSEN, 2009; PARADA; OSSEWEIJER; DUQUE, 2017).

Os doze princípios de Química Verde estimulam as biorrefinarias a usarem matérias-primas de fontes renováveis incluindo resíduos agroindustriais (ANASTAS; WARNER, 1998). Tal mudança de atitude possibilita dar destino a materiais em abundância que incorporam o gás carbônico, emitido pela queima dos combustíveis, em seu processo fotossintético característico.

Baseado nos preceitos da Química Verde, o bagaço de cana-de-açúcar, extensivamente gerado como resíduo da indústria sucroalcooleira no país, pode ser reaproveitado para conversão do conteúdo de polissacarídeos em açúcares monoméricos. Estes, por sua vez, podem ser utilizados como moléculas-plataforma para fabricação de biocombustíveis, além, também de bioprodutos de Química Fina com valor a agregar à cadeia produtiva, como ácidos orgânicos e plásticos verdes (PEREIRA JR; COUTO; SANTA ANNA, 2008).

Nesse processo de conversão, a biomassa precisa passar por uma etapa de pré-tratamento que diminua a recalcitrância do material lignocelulósico, para facilitar a atuação das enzimas que irão hidrolisar o material ao xarope de açúcar. Dessa maneira, o pré-tratamento é

fundamental para estabelecer a viabilidade do processo de bioconversão da biomassa da cana-de-açúcar, pois delimita diversos parâmetros do processo, tais como, as frações que poderão ser extraídas e reaproveitadas, os microrganismos que poderão ser empregados, se há necessidade de alguma etapa de detoxificação, dentre outros fatores (MUPONDWA, 2017).

Visando otimizar a etapa de pré-tratamento, a utilização de líquidos iônicos confere uma alternativa inovadora, que resulta em rendimentos e produtividade de hidrólise superiores aos obtidos por pré-tratamentos convencionais já bem estabelecidos, como o pré-tratamento hidrotérmico (MIGUEZ *et al.*, 2016). O pré-tratamento com líquido iônico também permite o fracionamento de lignina, que pode ser um coproduto de maior valor agregado, melhorando a economicidade do processo como um todo (LEE *et al.*, 2009). Devido as suas vantagens é considerado um solvente verde por atender alguns dos preceitos estabelecidos pela Química Verde, cujo solvente ideal deve ter uma volatilidade muito reduzida, deve ser quimicamente e fisicamente estável, reciclável, reutilizável e fácil de manusear (EARLE; SEDDON, 2000).

Assim, o presente trabalho visou estudar o uso de novos líquidos iônicos potencialmente mais baratos para o processamento da biomassa lignocelulósica, contribuindo para a discussão sobre a viabilidade de utilização dessa técnica de pré-tratamento no futuro.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. BIORREFINARIAS

O conceito de biorrefinaria surgiu como uma alternativa promissora às necessidades socioambientais atuais. As definições de biorrefinaria são múltiplas; para exemplificar, de acordo com a *International Energy Agency* (IEA), trata-se de um “*processamento sustentável de biomassas visando à obtenção de energia e produtos comercializáveis*”, enquanto que para o *National Renewable Energy Laboratory* (NREL) uma biorrefinaria “*integra a conversão e o processamento da biomassa para produção de energia, combustíveis e compostos químicos*” (U.S. DEPARTMENT OF ENERGY, 2005; BIOENERGY, 2014). Em suma, uma biorrefinaria integra diferentes setores de produção numa mesma planta aproveitando de maneira eficiente o potencial da biomassa, inclusive de seus resíduos de produção (NARODOSLAWSKY, 2013). Dessa forma, a biorrefinaria atua em sinergia com a Química Verde, fazendo uso de sínteses menos perigosas com processos e produtos mais seguros utilizando matérias-primas renováveis e reaproveitando resíduos e coprodutos (ANASTAS; WARNER, 1998; BUDZIANOWSKI, 2012).

Em sua totalidade, biorrefinarias processam biocombustíveis que são *commodities* de alto volume e baixo valor, mesmo que na safra de 2016/2017 o setor sucroalcooleiro tenha apresentado preços médios reais superiores aos da temporada passada, segundo dados do Cepea (Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada), da Esalq/USP. No entanto, a implantação da biorrefinaria pode ser viabilizada se a produção de biocombustíveis for conjunta a de bioprodutos de alto valor e baixo volume. Os custos com energia seriam reduzidos, pois a energia seria produzida na própria indústria, na área de bioenergia, a logística de transporte seria facilitada pela produção acoplada de biocombustíveis e a receita poderia ser incrementada com a produção das especialidades e produtos da Química Fina (BUDZIANOWSKI, 2016).

Os bioprodutos finais de cada biorrefinaria variam de acordo com a biomassa utilizada e o processamento a que foi submetida. Os produtos de alto valor incluem biofármacos, biocosméticos, biofertilizantes, biomateriais e compostos bioquímicos. Esses muitas vezes são obtidos em baixos volumes por estarem em baixa concentração na biomassa ou por precisarem de técnicas de conversão mais elaboradas, fator este que indica o quanto a tecnologia ainda precisa ser desenvolvida para escalonar o processo (BUDZIANOWSKI, 2016; VAZ JR, 2014b).

O desenvolvimento e a comercialização dessas inovações exigem uma mudança de cenário integrada com *feedbacks* a cada etapa. A bioeconomia ainda encontra algumas resistências, entretanto a experiência da Suécia mostrou uma implantação de bioeconomia por

meio do desenvolvimento lento e gradativo de fases até que a maturidade dos negócios fosse atingida. Isso envolve a criação de políticas incentivadoras de industrialização que criem mercados para produtos renováveis atenuando riscos e aumentando a competitividade (HELLSMARK; SÖDERHOLM, 2017).

Além das tradicionais etapas de pesquisa, desenvolvimento, demonstração e difusão de novas tecnologias, surge agora uma etapa de formação de mercado, capaz de estimular o setor privado a investir nos projetos da indústria bioquímica. O incentivo pode vir pela taxaçoão do carbono ou por meio de uma reforma dos subsídios de combustíveis fósseis em políticas que variam em escalas regionais, nacionais e globais (PHILP, 2017). Em dezembro de 2016, o Governo Federal criou o RenovaBio, um programa do Ministério de Minas e Energia, a ser aprovado na Câmara, que se propõe a concretizar os compromissos firmados no acordo de Paris na Conferência Mundial do Clima além de incentivar o investimento privado em biocombustíveis. O projeto se propõe a expandir a produção de biocombustíveis no país com base na previsibilidade do mercado, na sustentabilidade e na compatibilidade com o crescimento do mercado. Com ele cada produtor de biocombustível, receberá uma nota de eficiência energética-ambiental a qual permitirá solicitar a emissão de Créditos de Descarbonização que serão negociados em bolsa, num valor monetário por tonelada de carbono (MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, 2017).

Diante da oferta de biomassa da cana-de-açúcar no Brasil, o país se destaca como potencial difusor de biorrefinarias pela disponibilidade de matérias-primas renováveis. A biorrefinaria de cana-de-açúcar contempla no mesmo espaço físico a produção de biocombustíveis, bioquímicos, bioeletricidade e calor, atendendo à demanda de açúcar, etanol, polímeros naturais, água residual rica em matéria orgânica e alcoóis conforme apresentado na Figura 1 (VAZ, 2017).

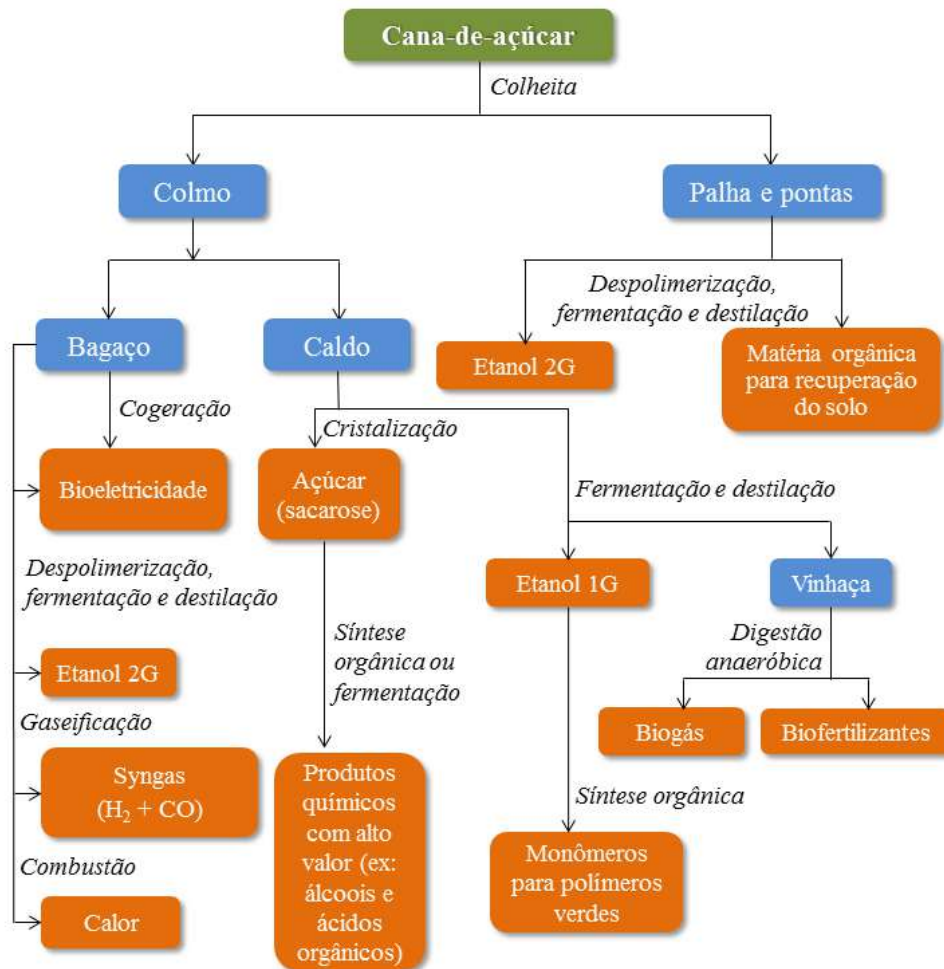


Figura 1. Diagrama de blocos representativo dos produtos da biorrefinaria de cana-de-açúcar.

Fonte: Adaptado de VAZ, 2017.

2.2. PRODUÇÃO DE CANA-DE-AÇÚCAR NO BRASIL

A cana-de-açúcar é uma gramínea perene típica de regiões de clima tropical ou subtropical (Figura 2). É uma planta monocotiledônea C4 pertencente à família Poaceae de alta taxa fotossintética que requer alta luminosidade, resiste a temperaturas ligeiramente elevadas e precisa de grandes quantidades de água para sua manutenção, considerando que até 75% da sua massa total é composta por água (MARAFON, 2012; VASCONCELOS, 2015).

Suas características de adaptabilidade ao clima/solo e sua composição rica em sacarose a fizeram uma *commodity* de destaque na agroindústria para produção de açúcar. No Brasil, o cultivo de cana-de-açúcar foi disseminado assumindo maior significância no ramo do agronegócio em 1975, quando o governo iniciou o programa ProÁlcool de incentivo à produção de etanol como combustível alternativo a partir de cana-de-açúcar. Desde então, o país lidera a produção mundial da planta (BAJAY; CARVALHO; FERREIRA, 2000; O'HARA, 2016).



Figura 2. Plantação de cana-de-açúcar no interior de São Paulo.

Fonte: Página eletrônica da MISTO BRASÍLIA, 2017.

Atualmente, tem-se cerca de 385 plantas produtoras de etanol autorizadas no Brasil, apresentando capacidade produtiva de 216.883 m³/dia de produção de etanol hidratado e 117.036 m³/dia de produção de etanol anidro, sendo a cana-de-açúcar a matéria-prima utilizada em 97,1 % destas plantas autorizadas (ANP, 2017). Há também seis usinas flexíveis que produzem etanol a partir do caldo de cana-de-açúcar e nos períodos entressafras utilizam milho como matéria-prima alternativa, permitindo estender a produção de etanol além dos períodos de colheita de cana-de-açúcar. Ainda, tem duas usinas destinadas a produzir combustível exclusivamente de milho, ambas localizadas no Mato Grosso. Uma foi inaugurada em agosto de 2017 e outra com início das obras de construção prevista para janeiro de 2018 (NOVA CANA, 2017a; NOVA CANA, 2017b; NOVA CANA, 2017c).

Conforme dados apresentados pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO, 2017), em 2014 o Brasil foi o maior produtor mundial de cana-de-açúcar ao produzir mais de 736 milhões de toneladas, com uma larga diferença, de aproximadamente 380 milhões de toneladas, do segundo maior produtor, a Índia (Figura 3).

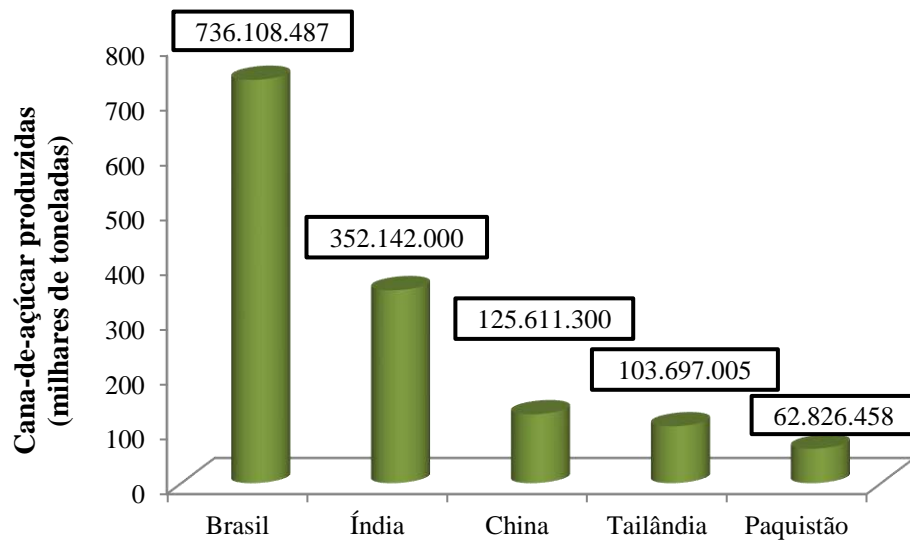


Figura 3. Cinco maiores produtores mundiais de cana-de-açúcar em 2014.

Fonte: Elaboração própria com base nos dados da FAO, 2017.

A liderança do Brasil quanto à produção de cana-de-açúcar é reflexo das vastas áreas destinadas às plantações canavieiras, muito em função do tamanho territorial e das condições edafoclimáticas favoráveis que o próprio país apresenta com relação a outros países produtores (CONAB, 2017). A Figura 4 mostra as cinco maiores áreas cultiváveis no mundo, onde é possível notar que, no Brasil, cerca de 10 milhões de hectares foram destinados ao cultivo de cana-de-açúcar em 2014 (FAO, 2017).

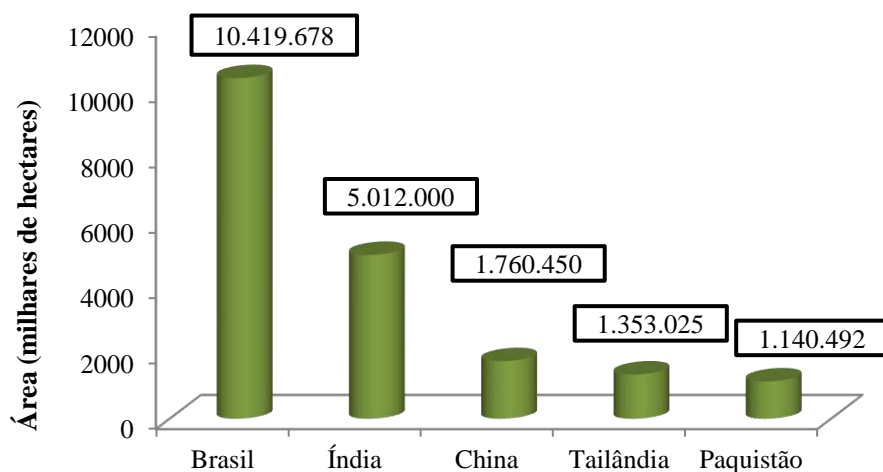


Figura 4. Países com maior área de cultivo de cana-de-açúcar em 2014.

Fonte: Elaboração própria com base nos dados da FAO, 2017.

A prospecção da Companhia Nacional de Abastecimento para a safra brasileira de cana-de-açúcar em 2017/18 é de que o Brasil continue sendo o maior produtor mundial de cana-de-açúcar com participação expressiva no ramo do agronegócio. Ainda, há previsões de que haja uma pequena diminuição da área disponível para colheita na região Sudeste, porém com produtividade estimada superior à safra passada, assumindo a recuperação da produtividade na região Nordeste uma vez superado o déficit hídrico do ano anterior (CONAB, 2017).

A fim de fornecer uma visão alternativa com relação ao futuro do setor, a empresa Nova Cana elaborou uma projeção da safra 2017/18 do setor sucroenergético com base em 18 instituições especializadas, conforme mostra a Figura 5 (NOVA CANA, 2017d).

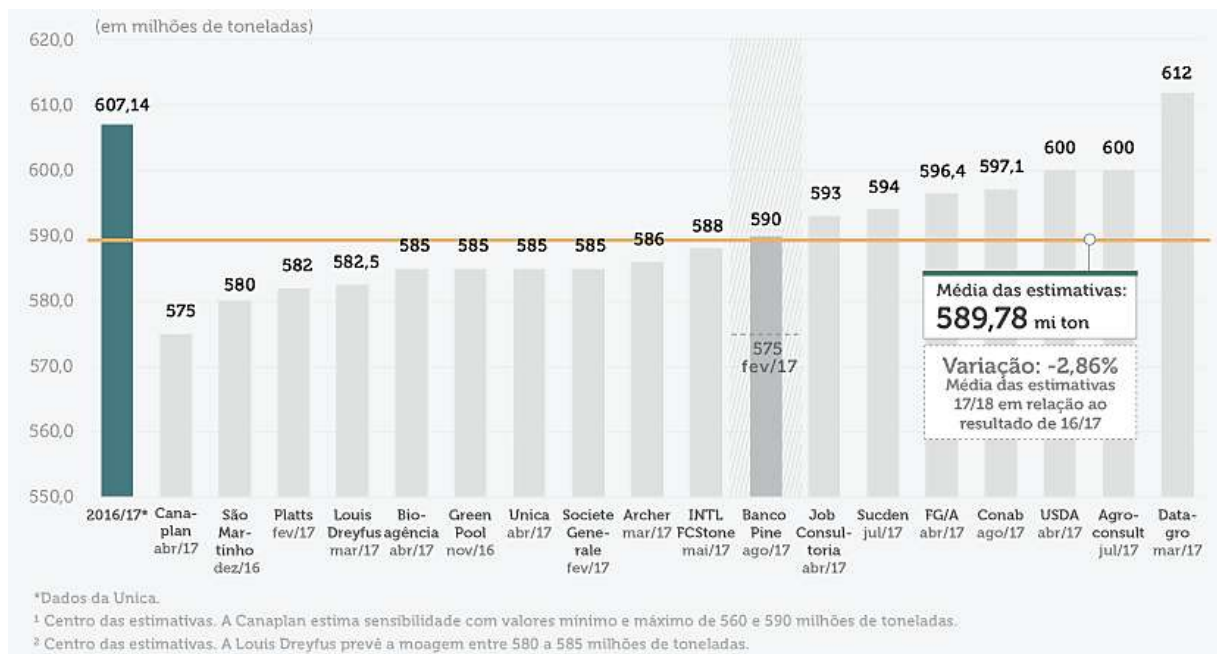


Figura 5. Estimativas da quantidade de cana que será moída no Centro-Sul na safra 2017/18.

Fonte: NOVA CANA, 2017d.

A projeção média das 18 consultorias atualizada em setembro/2017 é de 589,78 milhões de toneladas de cana-de-açúcar moída na região centro-sul para safra 2017/2018. Contudo, a estimativa inferior aos 607,14 milhões de toneladas moídas no período de 2016/17 não é consensual para as empresas. Enquanto umas acreditam que a melhora climática impactará positivamente na produção de cana-de-açúcar, há aquelas que acreditam que fatores climáticos correspondem a apenas 43% de toda a variabilidade na produção de cana-de-açúcar e os fatores socioeconômicos ou manejo representam 42% (NOVA CANA, 2017d).

2.2.1. Bagaço de cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar tem como destino principal a produção de açúcar e etanol, obtidos a partir da moagem para extração do caldo, rico em sacarose. Cerca de 75 toneladas de cana-de-açúcar são colhidas por hectare plantado, e a cada tonelada de cana processada, 126 kg de açúcar são extraídos e 77 L de etanol são obtidos (CONAB, 2017). Independente do destino final da cana-de-açúcar, o bagaço é gerado como resíduo de moagem da indústria sucroalcooleira. O bagaço é um resíduo fibroso, o qual possui alto teor de água e a quantidade gerada desse resíduo depende do teor de fibras que compõem a respectiva cultura. Em média, a cana-de-açúcar que apresenta 46% de fibra com 50% de umidade fornece 280 kg de bagaço por tonelada de cana processada, com composição química média próxima à apresentada no Quadro 1 (CERQUEIRA; FILHO; MEIRELES, 2007; VAZ JR, 2011; ALCARDE, 2017).

Quadro 1. Composição química média do bagaço de cana-de-açúcar.

Composição química	(%)
Glicose	19,50
Xilose	10,50
Arabinose	1,50
Galactose	0,55
Lignina	9,91
Cinzas	1,60
Umidade	50,00

Fonte: SOARES, 2011.

O bagaço é prioritariamente destinado à cogeração de energia nas indústrias sucroalcooleiras, sendo queimado para geração de vapor, que serve para aquecer caldeiras ou gerar energia elétrica para a própria usina. Ainda assim, há um excedente de bagaço de cana-de-açúcar que pode ser destinado a outros fins sem prejuízos à biorrefinaria, pois, o bagaço é uma biomassa lignocelulósica a qual pode ser processada para obtenção de açúcares sobrando outros componentes no material capazes de suprir a necessidade por insumos para geração de energia na indústria, como a lignina. Assim, o reaproveitamento desse resíduo agroindustrial como matéria-prima implica uma produção mais sustentável sem que haja competição com a produção de alimentos que tenham como base o açúcar (DWIVEDI; ALAVALAPATI; LAL, 2009).

2.3. BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

A biomassa lignocelulósica é composta majoritariamente por microfibrilas de celulose separadas por cadeias de hemicelulose e lignina envolvendo todo o arranjo (Figura 6). Além desses constituintes principais há outros em menor proporção, como extrativos (ésteres, álcoois, esteróides) e compostos inorgânicos/cinzas (sulfatos, oxalatos, carbonatos e silicatos de cálcio, potássio e magnésio) (LEWIN; GOLDSTEIN, 1991). As proporções variam com a espécie de cana-de-açúcar, varia ao longo das partes da planta e também pode sofrer influência de fatores externos, mas no geral o bagaço, em base seca, se constitui de 32 a 48% m/m de celulose, 19 a 24% m/m de hemicelulose e cerca de 23 a 32% m/m de lignina (FARACO; HADAR, 2011; SANTOS *et al.*, 2012).

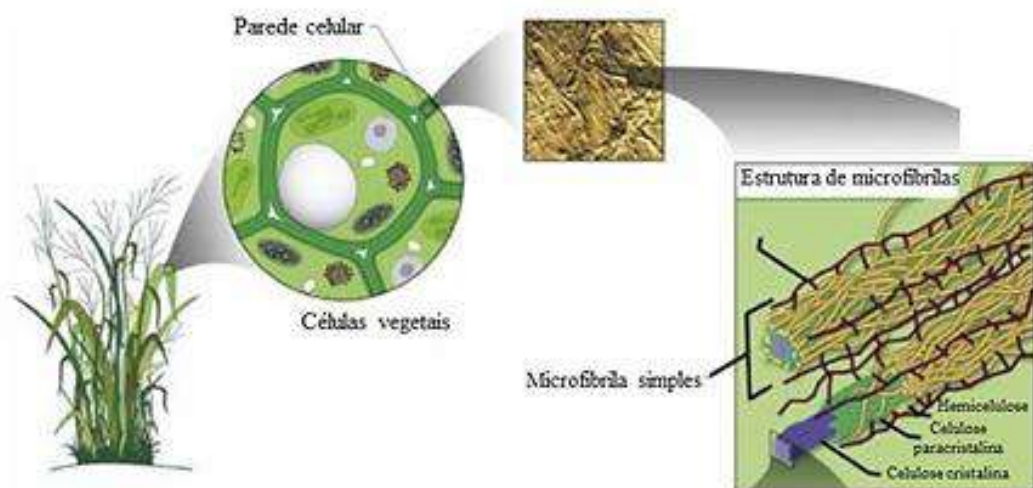


Figura 6. Estrutura lignocelulósica e seus principais constituintes.

Fonte: Adaptado de SEIDL; GOULART, 2016.

2.3.1. Celulose

A celulose é o homopolissacarídeo $(C_6H_{10}O_5)_n$ formado pela união de resíduos de β -D-glicose unidos por ligações β -1,4-glicosídicas onde os resíduos consecutivos estão dispostos numa rotação de 180° do resíduo adjacente. Assim, o dímero de glicose chamado celobiose é a unidade de repetição desse carboidrato β -1,4-anidroglicopiranosose conforme indicado na estrutura da Figura 7 (ATALLA; ISOGAI, 2010).

As unidades monoméricas se polimerizam por ligações *O*-glicosídicas, assumindo uma conformação linear, cujo tamanho da cadeia é expresso pelo grau de polimerização. À medida que as cadeias se aproximam, estabelecem ligações de hidrogênio interplanares entre o oxigênio de uma unidade glicosídica com uma hidroxila do terceiro átomo de carbono da unidade próxima organizando a estrutura em cadeias lineares justapostas com regiões amorfas intercaladas a regiões cristalinas (DUFRENSE, 2012).

Assim, com ligações intramoleculares fortes, ligações intermoleculares bem estabelecidas e completa ausência de água, esse polímero orgânico cristalino assume um comportamento extremamente recalcitrante, pouco reativo, que o torna insolúvel a maioria dos solventes convencionais (FENGEL; WEGENER, 1991). Atualmente, um dos gargalos que limitam o aproveitamento integral do potencial energético do material lignocelulósico é justamente devido à sua natureza recalcitrante, que dificulta a liberação dos polissacarídeos fermentescíveis e modificação de suas propriedades (SANTOS *et al.*, 2012).

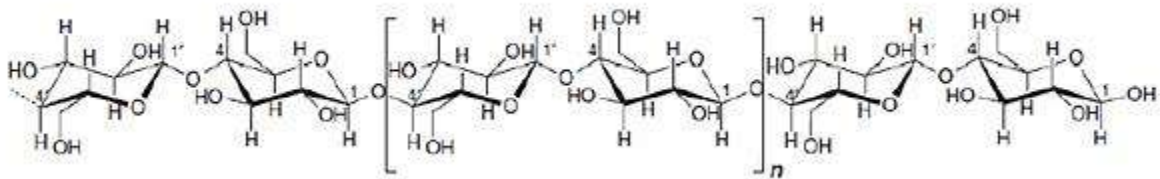


Figura 7. Representação da cadeia polimérica de celulose com destaque para o dímero celobiose.

Fonte: VERMERRIES; ABRIL, 2015.

2.3.2. Hemicelulose

Hemicelulose é um heteropolissacarídeo composto por variadas unidades monoméricas, de maneira que sua classificação se dá em função dos monômeros constituintes. Dentre os açúcares que a compõem é possível encontrar pentoses, do tipo D-xilose e L-arabinose, e/ou hexoses, tais quais D-glicose, D-manose e D-galactose, porém apresenta também outros constituintes como grupos acetila e ácidos urônicos (ácido D-glucurônico e ácido 4-*O*-metilglucurônico). Os monossacarídeos se unem por ligações β -1,4, mas também são estabelecidas ligações β -1,3; β -1,6; α -1,2; α -1,3; α -1,6 compondo uma estrutura de baixa massa molar, amplamente ramificada e, conseqüentemente, amorfa. Seu caráter amorfo a torna reativa e, assim, solúvel em água e facilmente solubilizada em álcalis fortes (PETTERSEN, 1984; FENGEL; WEGENER, 1991; SZENGYEL, 2000).

As ramificações da cadeia de hemicelulose reagem com a celulose estabelecendo ligações de hidrogênio e dá estabilidade e flexibilidade à matriz lignocelulósica (RAMOS, 2003). A hemicelulose também estabelece ligações covalentes do tipo éter com a lignina e ligações do tipo éster entre as unidades acetil e ácidos hidroxicinâmicos, além de se ligar à pectina e proteínas das células adjacentes (XU *et al.*, 2005; KAMM; GRUBER; KAMM, 2008).

De maneira geral, as madeiras pertencem a duas categorias: *softwoods*, do grupo das gimnospermas com folhagem na forma de agulha e a ausência de frutos, e *hardwoods*, do grupo das angiospermas dicotiledôneas as quais apresentam folhas largas e sementes em frutos (CARVALHO *et al.*, 2009). De todos os tipos de hemiceluloses constituintes da madeira, xilana é a principal na maioria das plantas, inclusive em resíduos florestais e agroindustriais. As glucuronoxilanas são as hemiceluloses majoritárias em *hardwoods* com xiloglucanas na parede celular primária, enquanto que as glucomananas e galactomananas são as principais em *softwoods* e arabinoxilanas e complexos de heteroxilanas em cereais (GÍRIO *et al.*, 2010). No bagaço de cana-de-açúcar, a hemicelulose predominante é a do tipo 4-*O*-metilglucuronoarabinoxilana representado na Figura 8 (PENG *et al.*, 2009).

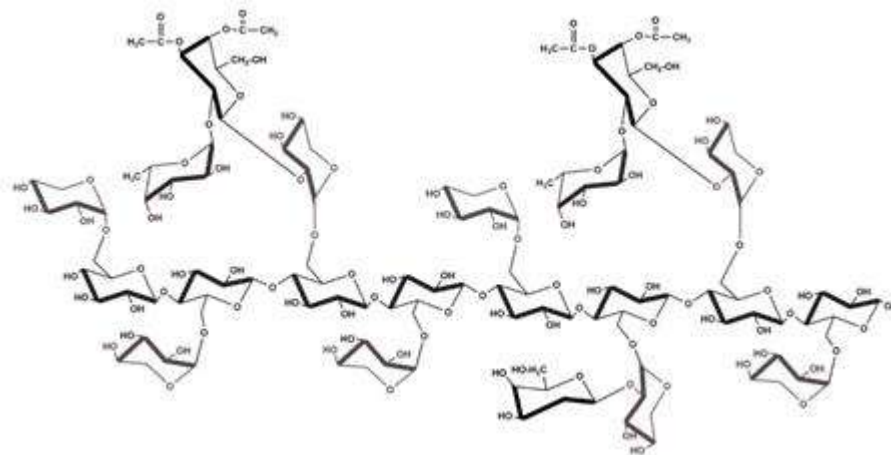


Figura 8. Estrutura representativa de xiloglucanas, principal componente da hemicelulose.

Fonte: OCHOA-VILLARREAL *et al.*, 2012.

2.3.3. Lignina

Lignina é uma substância orgânica formada por uma rede de anéis aromáticos de fenilpropânicos unidos por ligações alquil-aryl-éter cruzadas (Figura 9). A polimerização desidrogenativa dos álcoois aromáticos trans-coniferílico, trans-sinapílico e trans-para-cumárico resulta nessa macromolécula aromática heterogênea reticulada de alta complexidade, com regiões amorfas e estruturas globulares. Dessa maneira, a lignina confere ao material lignocelulósico rigidez, impermeabilidade e resistência mecânica contra ataques químicos ou microbiológicos nocivos (FENGEL; WEGENER, 1991; HOLLADAY *et al.*, 2007; AITA; KIM, 2010).

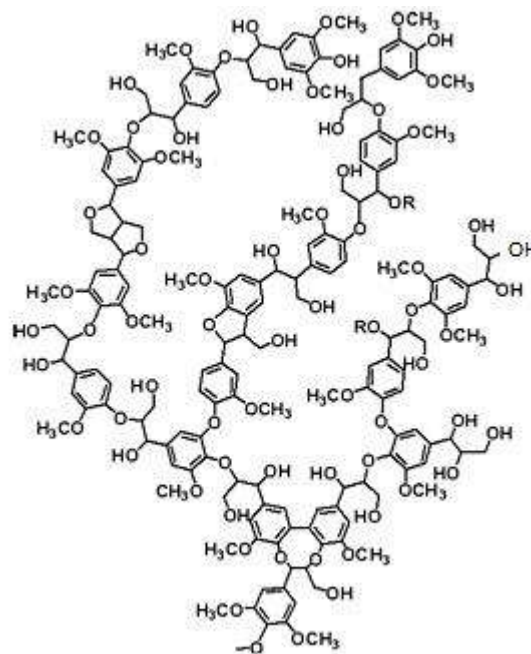


Figura 9. Representação da estrutura da lignina.

Fonte: LIGNOWORKS, 2017.

2.4. PROCESSOS DE CONVERSÃO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

A partir do bagaço de cana-de-açúcar residual da indústria sucroalcooleira é possível obter diferentes formas de energia e/ou moléculas-plataforma capazes de atuar como blocos construtores e intermediários de síntese na indústria química. Para tanto, o material lignocelulósico pode ser submetido a diferentes plataformas de conversão estabelecidas na biorrefinaria, sejam essas termoquímicas, químicas/físico-químicas ou processos bioquímicos (PANDE; BHASKARWAR, 2012; RODRIGUES, 2013).

A conversão termoquímica é conduzida para obtenção de gases, líquidos ou sólidos como forma de energia a partir de processos de pirólise, liquefação, gaseificação, combustão ou torrefação, cujos produtos específicos estão discriminados no esquema da Figura 10. A combustão direta chega a atingir, em caldeiras modernas, eficiência superior a 90% na conversão de biomassa a calor. A gaseificação emprega temperaturas muito elevadas para converter a biomassa no gás combustível conhecido como gás de síntese (*syngas*), de composição variável de acordo com o tipo da biomassa, mas em geral apresenta monóxido de carbono, hidrogênio, vapor d'água, dióxido de carbono, sulfeto de hidrogênio, alcatrão e cinzas sendo preciso uma etapa de purificação. A pirólise e a liquefação correspondem a uma decomposição sem adição de agentes oxidantes que resulta em produtos sólidos, líquidos (bio-óleos) ou gases, se empregada uma etapa de gaseificação. A torrefação, por sua vez, é uma técnica de pirólise branda que resulta em uma biomassa torrada de alto poder calorífico. A combustão, entretanto, é o único processo já aplicado industrialmente, enquanto os outros ainda estão em escala de demonstração, pois a conversão termoquímica envolve altas temperaturas que variam de 200 °C a 1200 °C, de acordo com o processo. Alguns casos também requerem altas condições de pressão o que exigem cautela no emprego em grande escala do processo (PANDE; BHASKARWAR, 2012; ROCHA, 2013; SILVA *et al.*, 2013a).

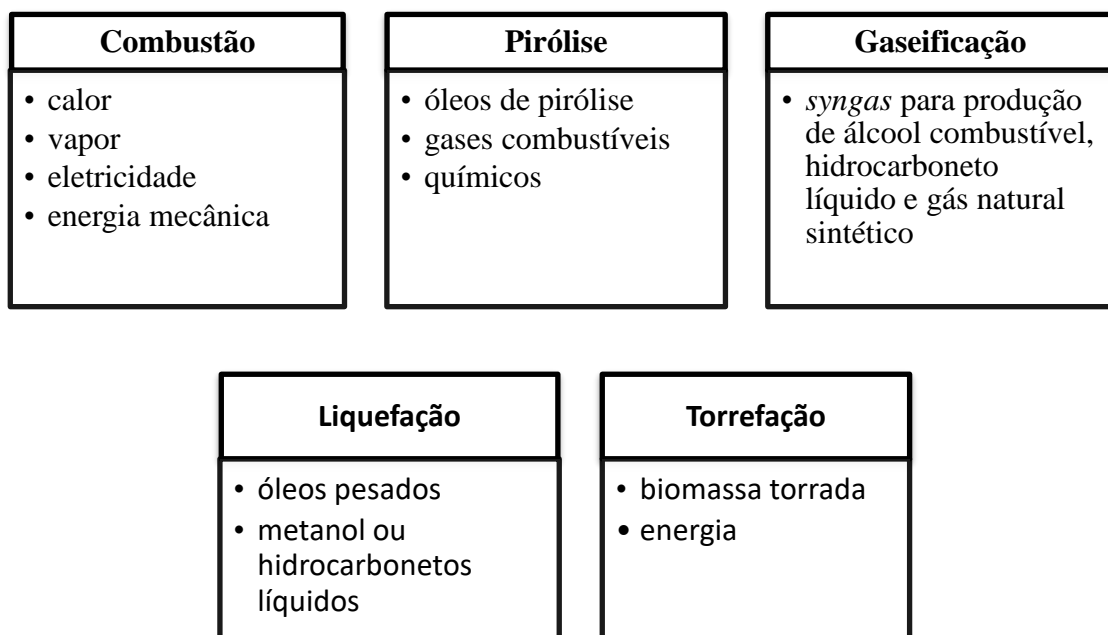


Figura 10. Produtos de cada processo termoquímico de conversão.

Fonte: Adaptado de PANDE; BHASKARWAR, 2012.

O processo de conversão química, por sua vez, consiste na extração e purificação de um componente da biomassa a ser empregado em uma rota sintética para obtenção do produto químico final. O processo conta com o uso de catalisadores que diminuem a energia de ativação da reação, porém, mesmo que reduzidos, ainda há a produção de resíduos químicos de impacto ambiental (VAZ JR, 2013). Processos de conversão físico-química, como compressões, permitem produzir uma biomassa com maior peso específico e melhores características energéticas numa maior densidade energética. A extração e transesterificação permite uma reação química de produção de biodiesel com formação de glicerina como subproduto (SILVA *et al.*, 2013a).

Como alternativa às desvantagens levantadas pelos processos de conversão listados anteriormente, a conversão bioquímica de materiais orgânicos residuais de difícil trato é conduzida sob condições brandas de temperatura, pressão e pH, tendo redução significativa da emissão de gases do efeito estufa, como CO₂, NO_x, SO_x. A bioconversão pode ser promovida mediante digestão anaeróbia, fermentação ou conversão por enzimas já isoladas do microrganismo (PANDE; BHASKARWAR, 2012). Os microrganismos são capazes de metabolizar diferentes componentes da biomassa lignocelulósica por diferentes rotas bioquímicas, podendo gerar uma vasta gama de produtos distintos. Além disso, atualmente, os avanços da engenharia bioquímica, no ramo da proteômica, genômica e na bioinformática permitem otimizar os processos metabólicos da célula favorecendo a síntese desses produtos (HATTI-KAUL *et al.*, 2007).

Entretanto, a bioconversão da biomassa lignocelulósica depende da etapa de transformação dos polissacarídeos em monossacarídeos, os quais são mais fáceis dos microrganismos metabolizarem e transformarem em produto. O processo de conversão torna-se um processo laborioso pela resistência mecânica que o material apresenta, decorrente das interações bem estabelecidas entre seus componentes, fazendo com que a bioconversão da biomassa lignocelulósica envolva uma etapa de hidrólise, que pode ser ácida ou enzimática, para clivar as cadeias poliméricas de celulose liberando os açúcares de cadeia menor passíveis de transformação bioquímica. O processo de hidrólise da celulose será discutido em detalhes no tópico a seguir.

Com isso, o processo de bioconversão a produção de materiais lignocelulósicos a xaropes de açúcar, envolve as etapas de condicionamento da biomassa, pré-tratamento, produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas, hidrólise enzimática da biomassa pré-

tratada, e processamento do xarope obtido do produto hidrolisado a diferentes produtos (Figura 11).

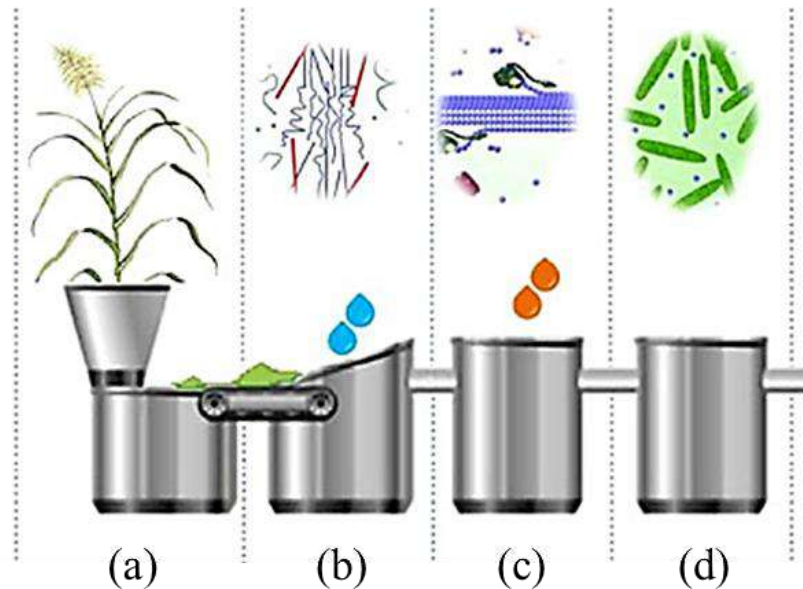


Figura 11. Etapas sequenciais para bioconversão da cana-de-açúcar (a) condicionamento da biomassa (b) pré-tratamento (c) hidrólise enzimática (d) processamento do hidrolisado para produção de bioprodutos.
 Fonte: ALVES, 2011.

Especificamente da celulose advinda da hidrólise total do bagaço são obtidas moléculas de glicose, as quais podem ser biologicamente convertidas a importantes intermediários de síntese e bioprodutos tais quais os biocombustíveis, plásticos verdes, ácidos orgânicos dentre outros listados na Figura 12 (PEREIRA JR; COUTO; SANTA ANNA, 2008).

A maioria desses bioprodutos ainda estão em escala laboratorial, porém há uma variedade de bioprodutos sintetizados a partir da biomassa lignocelulósica (Quadro 2) que estão em etapas de desenvolvimento avançadas ou que já atingiram maturidade industrial, dentre eles o ácido succínico e o etanol de segunda geração advindo do processamento de resíduos agroindustriais tal qual o bagaço de cana-de-açúcar (BOZELL; PETERSEN, 2010; VAZ JR, 2014a).

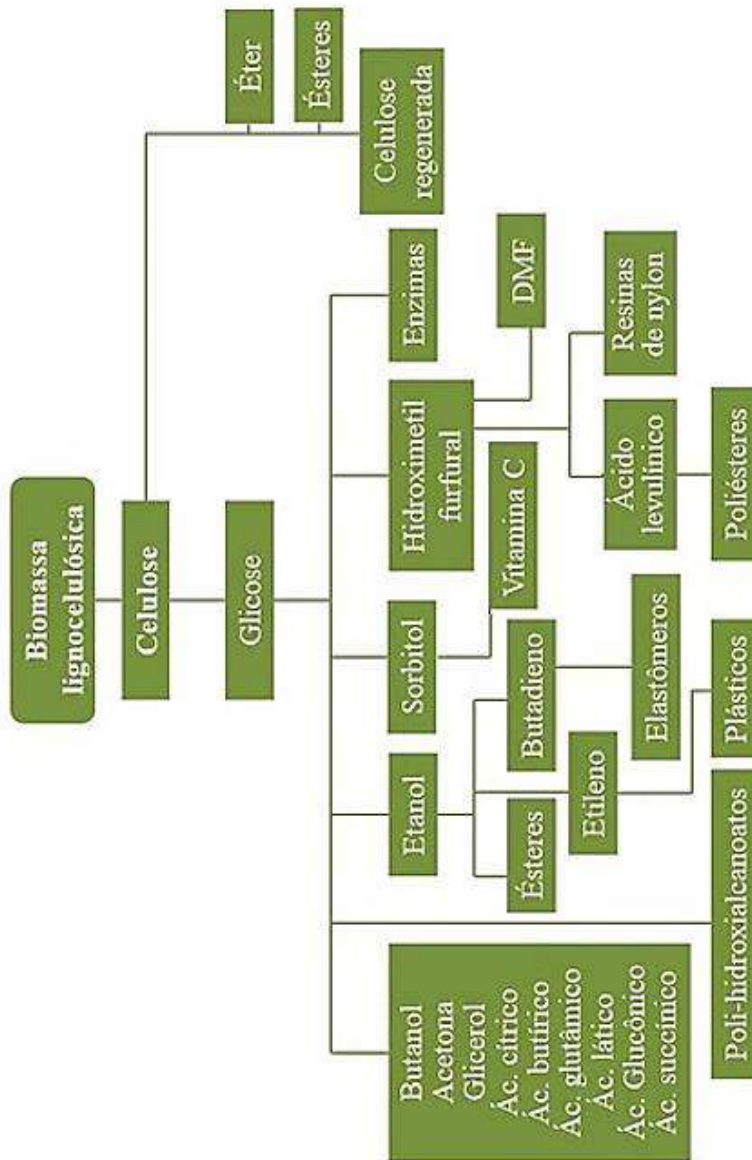


Figura 12. Possíveis produtos obtidos a partir da celulose.
 Fonte: Adaptado de PEREIRA JR; COUTO; SANTA ANNA, 2008.

Quadro 2. Produtos identificados com alto potencial para produção em uma biorrefinaria a partir do bagaço da cana-de-açúcar.

Composto alvo	Precursor	Rota	Status
Ácido 2,5-furanodicarboxílico	Glicose de celulose	Fermentação Síntese orgânica	Em desenvolvimento: melhoria de catalisador, biocatalisadores, microrganismos, rendimento, outros
Ácido succínico	Xilose de hemicelulose	Fermentação	Em desenvolvimento: melhoria de microrganismos e rendimentos
Antioxidantes	Lignina	Craqueamento catalítico	Em desenvolvimento: melhoria de catalisador, rendimento, outros
Ácido levulínico	Glicose de celulose Xilose de hemicelulose	Síntese orgânica	Provavelmente em 10 anos
Derivados de celulose (ácidos, ésteres, nitratos, éteres, etc.)	Celulose	Síntese orgânica	Processo industrial estabelecido
Etanol 2G	Glicose de celulose	Fermentação	Em produção, porém com melhorias de enzimas, microrganismos, rendimentos e redução de custos
	Xilose de hemicelulose		
Fenóis	Lignina	Craqueamento catalítico	Em desenvolvimento: melhoria de catalisadores, rendimentos, outros
Furfural	Xilose de hemicelulose	Síntese orgânica	Processo industrial estabelecido: ainda necessita melhorar catalisadores, rendimentos, outros.
Gás de síntese (CO + H ₂)	Biomassa lignocelulósica	Gaseificação	Processo industrial estabelecido baseado em petróleo: ainda necessita melhorar rendimentos
5-hidroximetil furfural	Celulose	Síntese orgânica	Processo industrial estabelecido: ainda necessita melhorar catalisadores, rendimentos, outros
Ligninas sulfonadas	Lignina	Síntese orgânica	Processo industrial estabelecido
Xilitol	Xilose de hemicelulose	Síntese orgânica	Em desenvolvimento: melhorias de catalisadores, rendimento, outros

Fonte: Adaptado de VAZ, 2017.

2.5. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA CELULOSE

As cadeias poliméricas de celulose presentes no material lignocelulósico precisam ser hidrolisadas para que os açúcares monoméricos sejam liberados e disponibilizados no meio para serem convertidos a bioprodutos. A despolimerização da celulose ocorre à medida que uma

molécula de água é adicionada a estrutura liberando uma unidade de glicose numa reação catalisada por ácido ou enzimas.

2.5.1. Hidrólise ácida

A eficácia na hidrólise ácida da biomassa está diretamente relacionada ao pK_a do ácido utilizado, sendo necessárias determinadas condições de pressão e temperatura para hidrolisar as ligações éter da lignocelulose de acordo com a concentração do ácido empregado (WALDRON, 2014). A hidrólise com ácido concentrado é conduzida com uma solução aquosa de ácidos minerais fortes, como ácido sulfúrico, clorídrico ou fosfórico (60 a 90% v/v) a temperaturas inferiores a 120 °C (FARONE; CUZENS, 1997). Tais ácidos promovem a clivagem da fração hemicelulose e celulose mais rapidamente, no entanto os altos índices de acidez favorecem a corrosão do equipamento envolvido, o que requer equipamentos resistentes que muitas vezes são mais custosos (SAEMAN, 1981). Outro caminho, é realizar a hidrólise com ácidos diluídos de concentração inferior a 5% m/v com temperatura e pressão mais elevadas. Contudo, temperaturas de reação superiores a 200 °C, necessárias para acelerar a clivagem das ligações glicosídicas, ocasionam a degradação dos açúcares e da lignina solúvel no meio, gerando subprodutos tóxicos indesejáveis para as etapas seguintes, tais quais furfural, 5-hidroxi metilfurfural, ácido acético, ácido fórmico, ácido 4-hidroxibenzóico, ácido vanílico, fenol, formaldeído (BRETHAUER; WYMAN, 2010; VERARDI *et al.*, 2012).

2.5.2. Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática, por sua vez, utiliza enzimas celulolíticas para catalisar a clivagem das ligações β -1,4-D-glicosídicas da celulose numa reação de alta especificidade sem formar subprodutos tóxicos e sem precisar de equipamentos específicos (FAN; GHARPURAY; LEE 1987; SINGHANIA *et al.*, 2010). Enzimas celulolíticas ou celulasas são um complexo enzimático de hidrolases *O*-glicosídicas composto por endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidades, as quais atuam em sinergismo, uma completando a ação da outra, de maneira a evitar a inibição retroativa pelos produtos formados e aumentar o rendimento da reação (Figura 13) (BHAT; BHAT, 1997; ARANTES; SADDLER, 2010; SINGHANIA *et al.*, 2010).

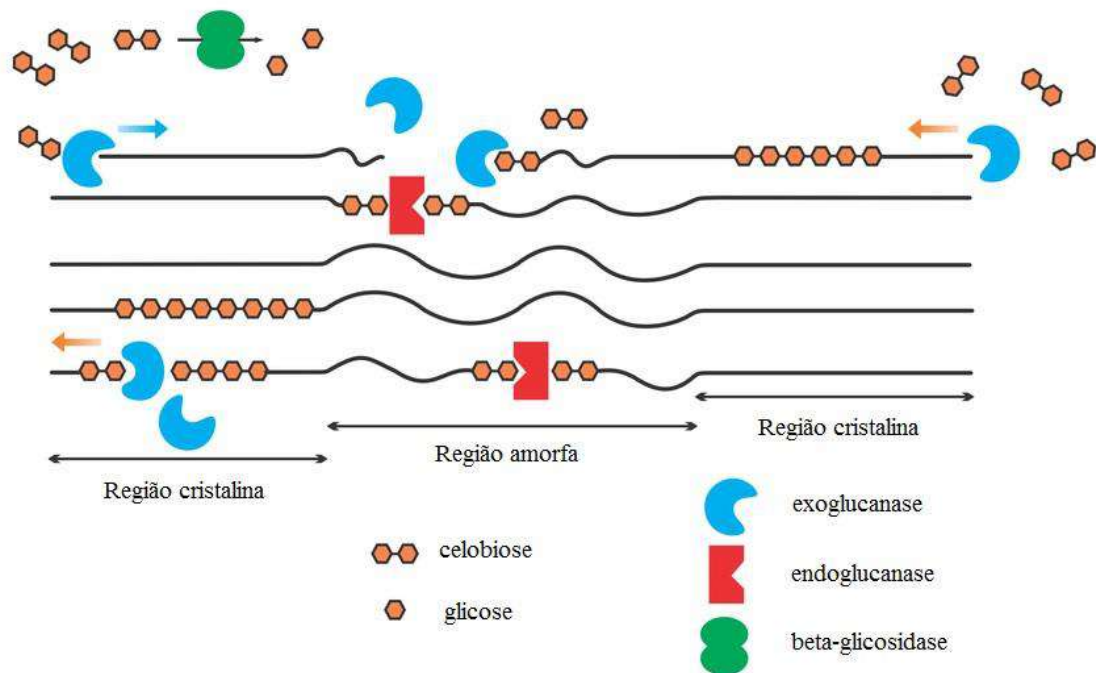


Figura 12. Etapas da ação sinérgica das enzimas celulolíticas na fibrila de celulose durante a hidrólise enzimática.

Fonte: AKHTAR, 2014.

As endoglucanases (EnG) representam as enzimas 1,4- β -D-glucana-4-glucano-hidrolase, de acordo com *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, também conhecidas como CMCase, são classificadas pela *Enzyme Commission* (EC) como EC 3.2.1.4. EnG são celulases primárias responsáveis por fazer o primeiro ataque às fibras de celulose e possuem módulos de ligação a carboidratos capazes de promover atuação na região interna amorfa clivando a celulose randomicamente liberando celo-oligossacarídeos de diferentes graus de polimerização, uns com terminais redutores (com hidroxilas heterosídicas livres) e outros não (LYND *et al.*, 2002; CASTRO; PEREIRA JR, 2010; SRIVASTAVA *et al.*, 2017a).

Os terminais das moléculas clivadas ficam suscetíveis ao ataque das exoglucanases. Exoglucanases são 1,4- β -D-glucana-celobiohidrolases (CBH) codificadas como EC 3.2.1.91 que, por atuar nas extremidades da molécula, liberam celobiose como produto final solubilizando os açúcares do meio (LYND *et al.*, 2002; CASTRO; PEREIRA JR, 2010; SRIVASTAVA *et al.*, 2017).

Sobre as celobioses, atuam as β -1,4-glicosidase, β -glucosidoglucohidrolases (BGL), denominadas como EC 3.2.1.21, que, ao final, liberam unidades monoméricas de açúcar livre, a glicose (LYND *et al.*, 2002; CASTRO; PEREIRA JR, 2010; SRIVASTAVA *et al.*, 2017).

O primeiro ataque enzimático pela EnG é facilitado quando as fibras cristalinas de celulose apresentam uma folga intersticial que permita o acesso dessas enzimas. Nesse processo de pré-hidrólise, conhecido como amorfogênese, o substrato sofre uma ruptura física e tem suas fibras desestratificadas. A amorfogênese é promovida por proteínas acessórias, porém há indícios de que as CBH também participem dessa etapa inicial ao fornecerem mais substrato as EnG pela ruptura da rede cristalina e/ou pela exposição de substratos antes inacessíveis (ZHANG; LYND, 2004; CASTRO; PEREIRA JR, 2010). As proteínas acessórias são adicionadas ao coquetel enzimático comercial conforme as especificidades da biomassa pré-tratada a ser hidrolisada. Dentre as proteínas envolvidas há as monooxigenases líticas polissacarídicas (LPMO), anteriormente classificadas como GH61 e CBM33 e atualmente como AA9 e AA10 (*Auxiliary Activity*), responsáveis por catalisar a clivagem de cadeias poliméricas em regiões cristalinas por meio de um mecanismo oxidativo dependente de cobre que inicia a quebra da cadeia pela oxidação do carbono 1 e/ou 4. Outras proteínas acessórias envolvidas na ruptura da celulose são proteínas semelhantes à expansina, como as inchaninas, responsáveis por romper as ligações de hidrogênio afrouxando as fibras de celulose e expondo a cadeia celulolítica ao ataque enzimático (SOUZA *et al.*, 2016).

Dentre os microrganismos produtores de celulasas, se destacam fungos de produção extracelular, tais como *Trichoderma*, *Humicola*, *Penicillium*, *Aspergillus*; as bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Cellulomonas*, *Cytophaga*; e actinomicetos *Streptomyces*, *Actinomucor*. Entretanto, os microrganismos mais empregados comercialmente para produção de celulasas são *T. reesei*, *H. insolens*, *A. niger*, *Thermospora fusca*, *Bacillus sp.* (BHARDWAJ; DEGRASSI; BHARDWAJ, 2017).

A hidrólise enzimática é uma das etapas mais custosas no processo de bioconversão. Na produção de etanol celulósico, por exemplo, os custos com hidrólise chegam a representar aproximadamente 30% dos gastos totais de produção (VALDIVIA *et al.*, 2016). Parte dos gastos é oriundo da necessidade em homogeneizar o meio para garantir que a enzima consiga atingir todas as partes do substrato. Todavia, o custo das enzimas ainda é um fator determinante no encarecimento do processo de hidrólise, pois há limitações quanto à tecnologia atual para purificação das enzimas, além de limitações ao longo do processo de hidrólise (ROCHA-MARTÍN *et al.*, 2017). Comparativamente, as metodologias de hidrólise são apresentadas no Quadro 3 firmando suas respectivas vantagens competitivas.

Quadro 3. Comparação entre a hidrólise ácida e enzimática.

Parâmetro	Hidrólise ácida concentrada	Hidrólise ácida diluída	Hidrólise enzimática
Duração da hidrólise	Lenta	Lenta	Rápida
Custo	Moderado	Baixo	Alto
Especificidade	Moderada	Baixa	Muito alta
Corrosão	Alta	Moderada	Muito baixa
Manutenção do equipamento	Alta	Moderada	Baixa
Rendimento de hidrólise	Alta	Moderada	Variável com as condições do pré-tratamento
Formação de inibidores	Baixa	Alta	Muito baixa
Geração de efluentes tóxicos	Muito alta	Alta	Baixa
Temperatura	Branda	Alta	Branda
Pressão	Baixa	Baixa	Branda

Fonte: SOUZA et al., 2016.

A hidrólise é limitada pela atividade catalítica da enzima, já que as celulasas podem ser inativadas por alterações de pH, temperatura, concentração de produtos no meio, os íons Hg^{+2} , Cu^{+2} , e Zn^{2+} , por exemplo, que chegam a provocar perda total de atividade (AKIBA *et al.*, 1995; HUANG, XIAO PING; MONK, 2004). A fim de minimizar os custos dessa etapa, foram traçadas diferentes estratégias que garantissem a eficiência catalítica das enzimas, aumentando os rendimentos de hidrólise. Para tanto, uma saída é desenvolver celulasas termoestáveis que suportem maiores variações de temperatura e também de pH, seja empregando engenharia genética para desenvolvimento de uma nova linhagem, fazendo um *screening* de microrganismos produtores ou ainda adicionando nanomaterias que alterem suas propriedades físico-químicas ao adsorver proteínas ou imobilizar as enzimas em nanopartículas, tais quais nanopartículas de óxido de zinco (ZnO), de níquel-cobalita ($NiCo_2O_4$), de Fe_3O_4 e nanopartículas de hidroxiapatita, por exemplo (SRIVASTAVA *et al.*, 2017b; SRIVASTAVA *et al.*, 2017c).

Visser *et al.* (2015) propôs uma maneira de contornar as dificuldades técnicas, reciclando as enzimas da fração sólida da biomassa pré-tratada hidrolisada, enquanto que Zhou *et al.* (2017) propôs usar aditivos que aumentem a hidrofiliabilidade da superfície do bagaço pré-tratado, para maior interação com as celulases. Os aditivos variam de surfatantes não iônicos, proteínas catalíticas ou polímeros sintéticos, formando uma camada na lignina evitando ligações não produtivas da celulase com a lignina (VISSER *et al.*, 2015; ZHOU *et al.*, 2017). Uma estratégia alternativa também reportada na literatura é a engenharia genética para superexpressão de celulases em microrganismos produtores (BHARDWAJ; DEGRASSI; BHARDWAJ, 2017; SRIVASTAVA; SRIVASTAVA; MISHRA; *et al.*, 2017).

Como mencionado, um ponto limitante da hidrólise é com relação às barreiras físicas que o material lignocelulósico impõe às enzimas dificultando a digestibilidade da celulose. Dentre as barreiras químicas, podem ser citados a lignina, a hemicelulose e os grupamentos acetil, enquanto que as barreiras físicas compreendem a cristalinidade da celulose, o grau de polimerização e a área superficial do material, o que inclui o tamanho da partícula e sua porosidade, por exemplo. Portanto, para converter a biomassa lignocelulósica a açúcares monoméricos por hidrólise enzimática é preciso modificar as estruturas físicas e químicas da parede celular, por meio de tecnologias de pré-tratamento que permitam o uso eficiente da matéria-prima (KIM, 2013).

2.6. PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

A etapa de pré-tratamento para obtenção de açúcares fermentáveis tem sido identificada como a mais desafiadora, tanto do ponto de vista técnico quanto econômico, por poder interferir nos processos anteriores e posteriores numa biorrefinaria, influenciando as taxas de hidrólise, a eficiência de fermentação e produção de coproduto (MUPONDWA, 2017).

A biomassa lignocelulósica pode ser pré-tratada por técnicas biológicas, físicas, químicas ou físico-químicas cujas principais técnicas, detalhadas na Figura 14, serão brevemente discutidas a seguir. A escolha do pré-tratamento a ser empregado depende da natureza física da biomassa, da sua composição química e especificidades assim como as do produto final, pois afeta as propriedades físicas e químicas do material interferindo nas etapas de *downstream*. A interdependência com estas etapas faz do pré-tratamento uma operação unitária na biorrefinaria (SOUSA *et al.*, 2009; BHOWMICK; SARMAH; SEN, 2017).

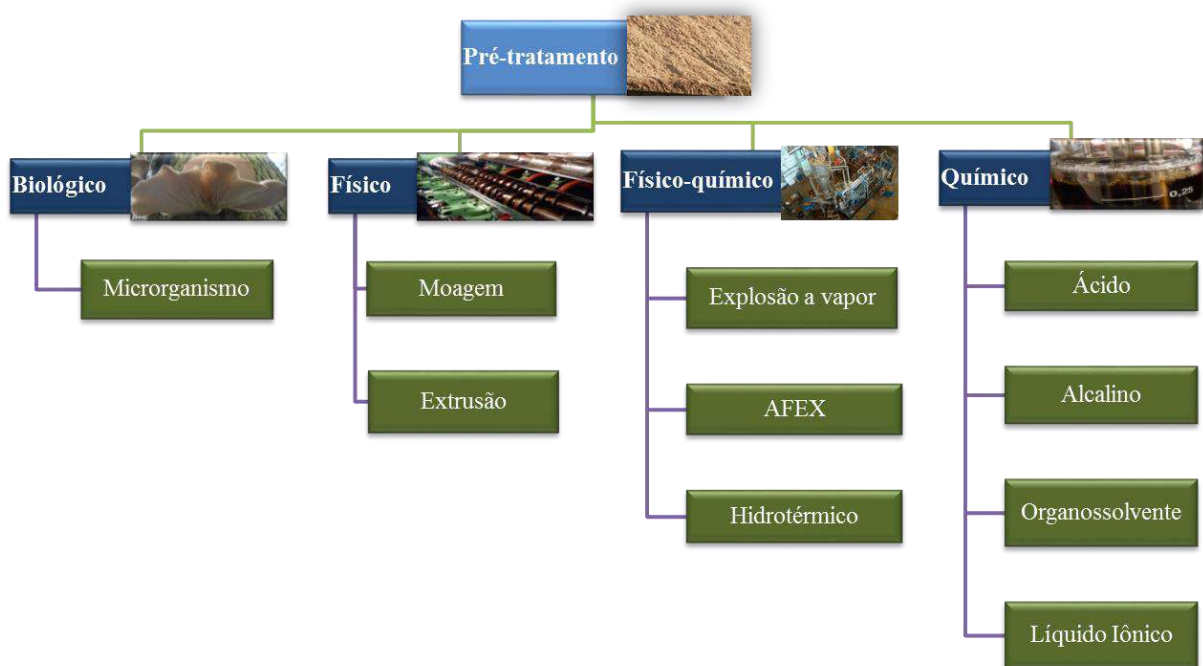


Figura 13. Processos de pré-tratamento estabelecidos para desestruturar a biomassa lignocelulósica.
 Fonte: Elaboração própria.

2.6.1. Pré-tratamento biológico

No tratamento biológico, microrganismos aptos a se desenvolverem em materiais lignocelulósicos estabelecem rotas metabólicas para degradar lignina ou até mesmo extrativos a fim de obterem energia a partir dos açúcares redutores que serão expostos (LEE *et al.*, 2007). Aproveitando-se do metabolismo do microrganismo, esse pré-tratamento emprega fungos e bactérias capazes de produzir um complexo enzimático com lacases e peroxidases, por exemplo, num processo de baixo custo o qual não precisa da adição de insumos químicos e apresenta baixo gasto energético (SINGH *et al.*, 2008). Por outro lado, esses pré-tratamentos seletivos são lentos, requerem grande espaço e esforço para controlar as condições de crescimento (SEIDL; GOULART, 2016).

2.6.2. Pré-tratamentos físicos

O pré-tratamento físico promove o aumento da área superficial pela redução do tamanho da partícula associado a uma desfibrilização ou redução da cristalinidade da celulose de modo a facilitar o acesso das enzimas ao substrato aumentando as taxas de sacarificação e de

rendimento. A moagem é uma das metodologias de pré-tratamento físico desde que a redução de tamanho de partícula promova uma alteração estrutural da biomassa lignocelulósica a nível nanoscópico. A moagem pode ser por bolas ou discos úmidos conforme os métodos comumente empregados (SILVA, *et al.*, 2013b).

Outra possibilidade de pré-tratamento físico é a extrusão, em que a biomassa é aquecida, misturada e cisalhada a uma velocidade e temperatura de reação que causam alterações físicas e químicas na estrutura das fibras de celulose aumentando a acessibilidade das enzimas ao substrato (ALVIRA, 2010). Para o pré-tratamento do bagaço são adicionados aditivos que facilitem o transporte da biomassa, como glicerol (MORO *et al.*, 2017).

2.6.3. Pré-tratamentos físico-químicos

Na explosão a vapor, a biomassa é submetida a um vapor saturado pressurizado, seguido de uma descompressão rápida até atingir a pressão atmosférica numa reação curta em altas temperaturas num escoamento turbulento. Nessas condições, a hemicelulose sofre auto-hidrólise causada pela desacetilação dos grupamentos acetil liberando ácido acético que catalisa a hidrólise das ligações glicosídicas da hemicelulose *in situ* (KUMAR *et al.*, 2009; RAMOS, 2003). A água também atua como ácido em altas temperaturas, por isso o processo é fortemente influenciado pela temperatura e, se submetido a altas temperaturas por longos períodos de tempo, pode haver destruição parcial da fração de xilana e quebra incompleta da lignina, formando compostos tóxicos como derivados de furano, ácidos fracos e compostos fenólicos inibidores (EWANICK; BURA, 2011). A lignina sofre uma despolimerização, se redistribui na superfície do material lignocelulósico e em seguida se repolimeriza. Ao final, há uma transformação da área superficial do substrato o qual se torna mais acessível às celulasas, mas devido a provável presença de inibidores, a biomassa precisa ser lavada, incorporando mais uma etapa ao processo (MORJANOFF; GRAY, 1987; BAUGH; MCCARTY, 1988; AVELLAR; GLASSER, 1998; SOCCOL *et al.*, 2010).

O pré-tratamento por AFEX (*Ammonia Fiber Expansion*) é uma metodologia que usa amônia líquida na forma de hidróxido de amônio em altas temperaturas e pressão a qual é rapidamente reduzida causando a expansão do gás de amônia. O processo desestrutura a biomassa com a ruptura física de suas fibras ocasionada por uma redução parcial da cristalinidade da celulose, modificação química da lignina com quebra das ligações alril-eter

além de redução do conteúdo de hemicelulose por hidrólise (MOSIER *et al.*, 2005; HARUN *et al.*, 2013).

Além desses, o pré-tratamento hidrotérmico já é uma metodologia consolidada e aplicada em escala industrial. O sistema é pressurizado acima do ponto de saturação da água a fim de mantê-la no estado líquido sob altas temperaturas em um curto período de tempo sem precisar da adição de insumos químicos (EWANICK; BURA, 2011; JEONG; LEE, 2015). As moléculas de água penetram na célula vegetal provocando a ruptura da matriz lignocelulósica, liberando um produto sólido rico em celulose suscetível ao ataque enzimático. A água sofre uma autoionização e os íons hidrônio resultantes irão quebrar as ligações *O*-acetil presentes na hemicelulose e substituí-las por ácido urônico, produzindo ácido acético e outros ácidos orgânicos responsáveis por catalisar a hidrólise das ligações entre hemicelulose e lignina (SILVEIRA *et al.*, 2015). A produção de inibidores pode ser evitada pelo controle do pH, porém o processo em si minimiza a produção de furfural, HMF e ácido fórmico (MOSIER *et al.*, 2005).

2.6.4. Pré-tratamentos químicos

Quanto aos pré-tratamentos químicos, o uso de ácido sulfúrico, clorídrico, fosfórico ou nítrico é uma opção de baixo custo para solubilizar e remover a fração de hemicelulose como açúcar dissolvido tornando a celulose mais acessível ao ataque das celulasas. Quando a concentração do ácido utilizado é alta, há a formação de compostos inibidores de microrganismos fermentadores, além da possível suscetibilidade dos equipamentos à corrosão e formação de resíduos ácidos que geram dificuldades no processo de recuperação e aumentam o custo operacional e de manutenção do procedimento (SIVERS; ZACCHI, 1995). Para contornar essas desvantagens, o ácido utilizado pode ser diluído a fim de gerar menos inibidores e menos perda de açúcares em condições mais brandas. Isso pode permitir a operação em diferentes reatores, em altas temperaturas por curtos intervalos de tempo, com baixa carga de sólidos, em fluxo contínuo ou, ainda, em baixas temperaturas por longos períodos com alta carga de sólidos em batelada (SAHA, 2004; KUMAR *et al.*, 2009; ALVIRA *et al.*, 2010). Quando o tamanho da partícula, a temperatura, a carga de catalisador, o tipo de reator e o tempo de residência são controlados ao longo da reação, é possível impedir a formação de inibidores (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000). Contudo a catálise ácida é responsável por hidrolisar, principalmente, a xilana e eventualmente pode degradar açúcares e lignina formando componentes tóxicos como compostos fenólicos de baixa massa molar e outros subprodutos indesejáveis como furfural e HMF.

O pré-tratamento alcalino, por sua vez, utiliza hidróxido de sódio, de potássio, de amônio ou de cálcio em temperatura ambiente para aumentar a digestibilidade da celulose ao solubilizar a lignina. No entanto pode haver perda de açúcares fermentáveis e produção de inibidores (HAMELINCK; HOOIJDONK; FAAIJ, 2005). Tem-se a vantagem de que a maioria dos sais pode ser regenerado e recuperado por neutralização (MCMILLAN, 1994), porém isto envolve mais uma etapa no processo e tem alto tempo de residência.

O pré-tratamento com organossolventes envolve misturas orgânicas aquosas de metanol, etanol, acetona, etileno glicol e álcool tetraidrofurfuril. Os solventes quebram as ligações da lignina e hemicelulose na estrutura lignocelulósica, desencadeando um aumento no tamanho do poro da biomassa capaz de facilitar a acessibilidade das enzimas e permitindo a recuperação da lignina pura. Entretanto, se faz necessária uma etapa de extração do solvente, além de uma etapa de lavagem (ZHAO, XUEBING; CHENG; LIU, 2009).

Já o pré-tratamento com líquidos iônicos tem sido estudado como um promissor método pela capacidade de aumentar a digestibilidade da celulose e dissolver a lignina e uma porção de hemicelulose, enquanto a celulose e a hemicelulose restantes podem ser fracionadas para a produção de biocombustíveis, com recuperação de cerca de 99% do solvente (FU; MAZZA, 2011). Esse pré-tratamento será detalhado no item 2.8.

Resumidamente, as vantagens e desvantagens de cada pré-tratamento citados anteriormente estão listadas no Quadro 4.

Quadro 4. Vantagens e desvantagens de cada método de pré-tratamento.

PRÉ-TRATAMENTO	VANTAGENS	DESVANTAGENS
BIOLÓGICO		
Microrganismo	Processo seletivo, sem adição de insumos químicos, de baixa severidade, gasta menos energia	Hidrólise longa, baixa produtividade, mais suscetível a inibições, perda de atividade celular, requer mais controle das condições
FÍSICO		
Moagem	Facilita o acesso enzimático ao substrato sem perda mássica	O moinho de bolas apresenta alto gasto energético, e no moinho de disco há alto consumo de água
Extrusão	Operação contínua, sem produção de efluentes, sem necessidade de lavagem, e sem produção de inibidores de microrganismos fermentadores	Requer uso de aditivos, baixos rendimentos de hidrólise
FÍSICO-QUÍMICO		
Explosão a vapor	Sem adição de insumos químicos, usa menos água, baixo impacto ambiental, e a presença de catalisadores reduz a severidade	Degradação de açúcares, alto custo com equipamentos
AFEX	Baixa formação de coprodutos, baixa necessidade por enzimas	Alto custo de aquisição, separação, recuperação e reciclo de amônia
Hidrotérmico	Não precisa de etapas de detoxicação ou recuperação	Alto tempo de residência, demanda por grandes volumes de água, alto consumo de energia para aquecer e evaporar a água
QUÍMICO		
Ácido	Hidrolisa a hemicelulose, baixo custo, bons resultados se combinado com tratamento alcalino	Reagentes tóxicos, corrosivos e perigosos, requer etapas de neutralização e recuperação de químicos, necessita de equipamentos anticorrosivos, degradação de açúcares com redução de rendimento e inibição de microrganismos fermentadores
Alcalino	Remoção da lignina reduzindo a absorção de celulose, baixo custo, e se combinado com tratamento ácido resulta em celulose praticamente pura	Formação de sais que podem ser incorporados a estrutura, alto tempo de residência, requer neutralização e recuperação de insumos químicos
Organossolvente	Formação de sólidos, recuperação de lignina com alto teor de pureza, e o processo pode ser catalisado para aumentar o rendimento	Solventes precisam ser separados, recuperados e reusados, de alto custo, precisa de uma etapa de lavagem
Líquido iônico	Projetados de acordo com as características físico-químicas desejadas, com habilidade catalítica, boa estabilidade química, pressão de vapor desprezível	Solvente caro assim como o processo de recuperação

Fonte: Adaptado de SEIDL; GOULART, 2016.

As vantagens e desvantagens de cada método variam em função do modo de atuação de cada um, como pode ser observado na Quadro 5.

Quadro 5. Efeitos de diferentes pré-tratamentos no processo de decomposição da estrutura lignocelulósica.

Efeito dos pré-tratamentos		Biológico	Físico	Explosão a vapor	AFEX	Hidro-térmico	Ácido	Alcalino	Organos-solvente	Líquidos iônicos
Celulose	Aumento da solubilização	≈	NA	≈	↓	↓	≈	≈	↓	↑
	Redução do grau de polimerização	≈	↑	≈	↓	≈	≈	≈	≈	↓
	Redução da cristalinidade	NA	↑	≈	≈	≈	≈	↑	↑	↑
	Aumento a superfície de contato	≈	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
	Redução do tamanho de partícula	↑	↑	↑	≈	NA	NA	NA	↑	NA
	Degradação	↓	NA	↓	↓	≈	≈	≈	≈	↓
Hemicelulose	Aumento da solubilização	≈	NA	↑	↓	↑	↑	≈	≈	↑
	Redistribuição	↓”	NA	≈	↓	↓	↑	≈	↓	↓
Lignina	Aumento da solubilização	≈	NA	≈	↓	↓	≈	↑	↑	↑
	Redistribuição	↓”	NA	↑	↓	≈	↑	↓	↓	↓
	Mudança estrutural	NA	NA	↑	↑	≈	≈	↑	NA	NA
	Degradação	NA	NA	↓	↑	↓	↑	↑	↑	↓

↑ intenso; ↓ insignificante; ≈ parcial; NA não se aplica

Fonte: Adaptado de SEILD; GOULART, 2016.

2.7. LÍQUIDOS IÔNICOS

Os líquidos iônicos são definidos como sais cujo ponto de fusão está abaixo de 100 °C por causa das fortes forças eletrostáticas entre seus íons de baixa simetria, com baixa densidade de carga. Estes solventes podem ser classificados como solventes verdes devido à baixa pressão de vapor, além de apresentarem, em geral, baixa inflamabilidade e alta estabilidade química e eletroquímica (MACFARLANE *et al.*, 2014; PASSOS; FREIRE; COUTINHO, 2014; SUN, NING *et al.*, 2011). No entanto, é importante destacar que devido a grande variedade de líquidos iônicos possíveis de serem sintetizados, nenhuma propriedade físico-química pode ser considerada universal nesse grupo de reagentes químicos, sendo o ponto de fusão inferior a 100

°C a única característica comum dentre todos. A Figura 15 mostra algumas características desejáveis desses solventes.

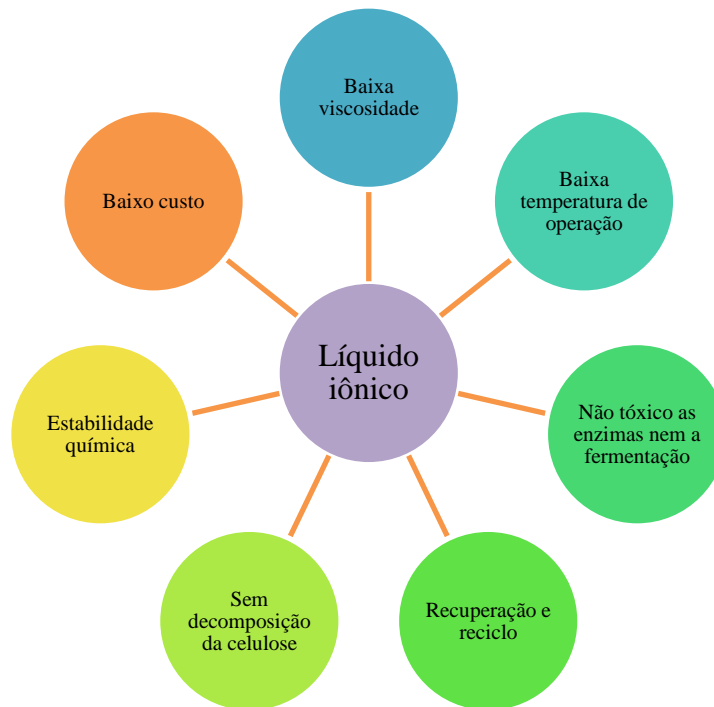


Figura 14. Características importantes para um líquido iônico.

Fonte: Adaptado de ELGHARBAWY, 2016.

Nas duas últimas décadas, os líquidos iônicos ganharam maior atenção em diversas áreas de pesquisa como catálise química, biocatálise, cromatografia e análises, aplicações eletroquímicas e, dentre outras, na área de pré-tratamento de biomassas. Até 31 de janeiro de 2017, com base no banco de dados do *Web of Science*TM, foram encontradas 766 publicações com o assunto “*líquido iônico e biomassa e pré-tratamento*”, onde o crescimento das publicações e citações por ano pode ser visto na Figura 16 (AMARASEKARA, 2016; ZHANG, QUANGUO; HU; LEE, 2017).

Os íons que compõem estes sais geralmente são um grande cátion orgânico e um ânion orgânico ou inorgânico. A combinação entre estes permite moldar as estruturas de acordo com as propriedades desejadas de capacidade de biodegradação, características termofísicas, toxicológicas e hidrofobicidade (PASSOS; FREIRE; COUTINHO, 2014).

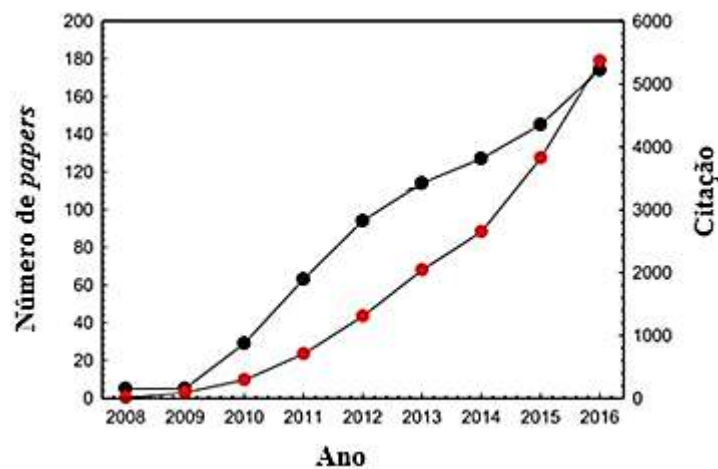


Figura 15. Número de publicações e citações entre 2008 e 2016. Pesquisa do Web of Science em 31/01/2017 sobre o assunto "líquido iônico" e "biomassa" e "pré-tratamento".

●: Número de papers; ●: Citação

Fonte: Adaptada de ZHANG, 2017.

Os cátions mais comumente usados são baseados em nitrogênio, como imidazólios e pirrolidínios, combinados com ânions como cloreto (Cl^-), brometo (Br^-), acetato ($[\text{Ac}]^-$), hexafluorofosfato ($[\text{PF}_6]^-$) e tetrafluoroborato ($[\text{BF}_4]^-$), porém ultimamente também tem sido produzidos a partir de derivados de ácidos carboxílicos e baseados em aminoácidos, visando o desenvolvimento de líquidos iônicos menos tóxicos e biodegradáveis evitando ânions hidrofóbicos e fluorados (PASSOS; FREIRE; COUTINHO, 2014). A figura 17 mostra os íons mais utilizados nos líquidos iônicos.

Na área de pré-tratamento de biomassas, os líquidos iônicos se destacam principalmente pela capacidade de dissolver a parede celular das plantas transformando a celulose cristalina em amorfa ou ainda removendo hemicelulose ou lignina, o que facilita a ação das enzimas durante a etapa de hidrólise, além de poderem ser recuperados e reutilizados (DADI; VARANASI; SCHALL, 2006).

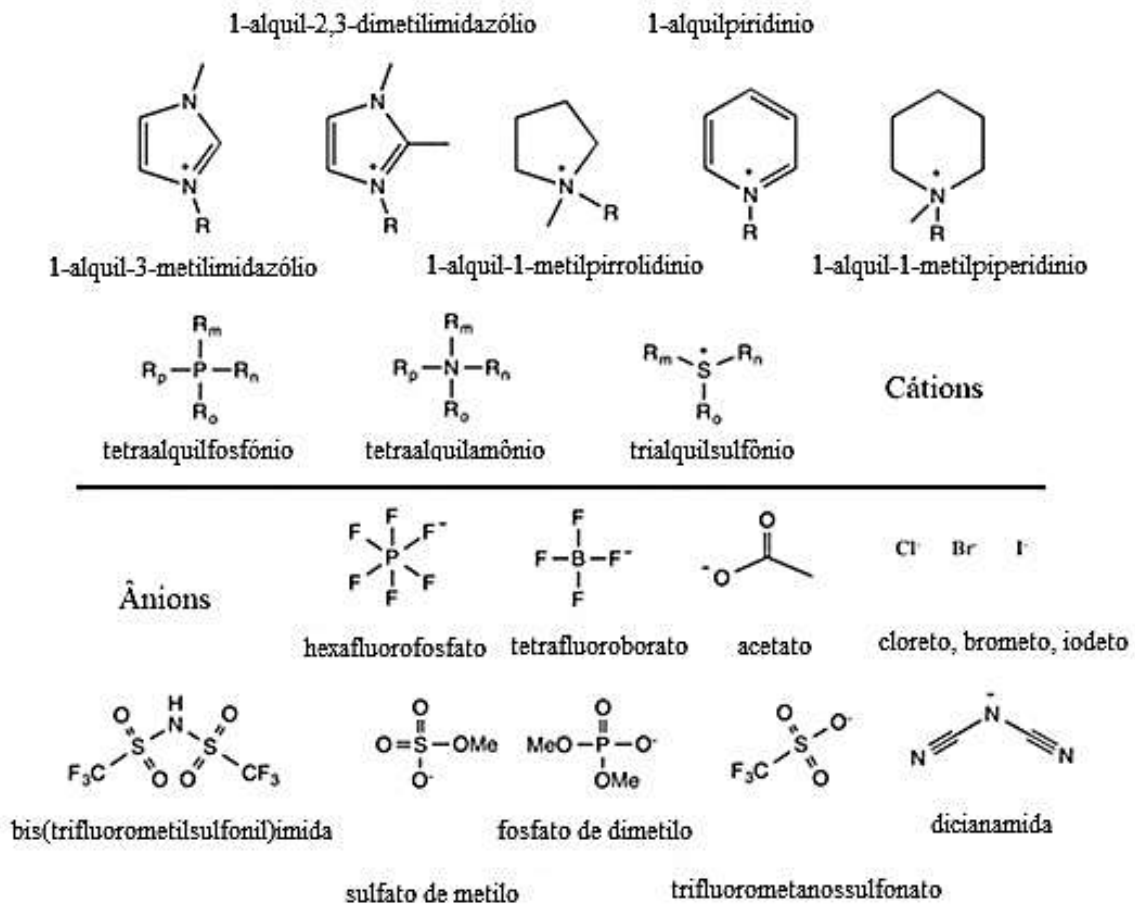


Figura 16. Cátions e ânions comuns em líquidos iônicos.

Fonte: BRANT, 2013; YOO, 2017.

A atuação dos líquidos iônicos para a dissolução da celulose se dá pela interrupção de suas redes de ligação de hidrogênio inter e intramoleculares (Figura 18). Neste sentido, os ânions demonstram relevante função não só na desestruturação como na determinação da solubilidade de diversos solutos. A solubilidade da celulose, por exemplo, aumenta proporcionalmente à capacidade de aceitação das ligações de hidrogênio do ânion (PENG *et al.*, 2009). Payal *et al.* (2015) estudou, a partir da energia livre de solvatação, a solubilidade da celulose em diferentes líquidos iônicos variando apenas o ânion e determinou que a solubilidade varia na ordem decrescente dos seguintes ânions: $[Ac]^- > [Cl]^- > [BF_4]^- \sim [PF_6]^-$. Demonstrou ainda que no caso do $[Ac]^-$ e $[CF_3SO_3]^-$ a grande contribuição entrópica para a energia livre se dá pela flexibilidade conformacional da celobiose, pois estes ânions são menos simétricos e mais volumosos em comparação aos outros, fazendo com que os anéis de hexose da celobiose fiquem mais distantes entre si e seu hidrogênio da hidroxila forme ligação com o ânion.

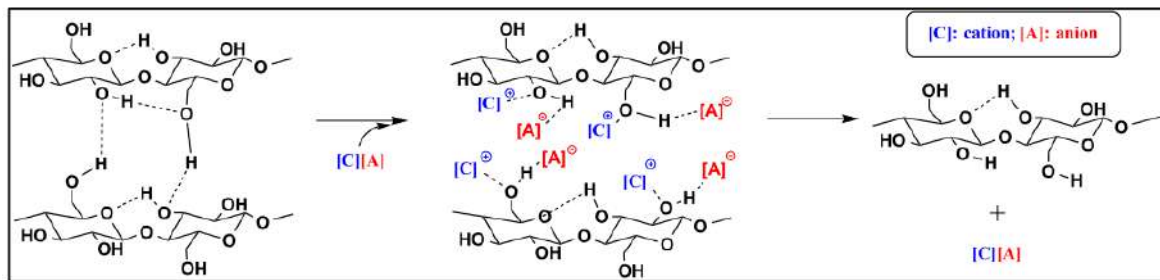


Figura 17. Representação esquemática de dissolução da celulose em líquidos iônicos.

Fonte: YOO; PU; RAGAUSKAS, 2017.

Embora as ligações entre o ânion e a celulose sejam predominantes, o cátion tem um papel secundário que deve ser levado em consideração, uma vez que estes também formam ligações de hidrogênio com a unidade de celobiose, apesar de serem mais fracas do que as ligações entre a celobiose e os ânions (PAYAL; BALASUBRAMANIAN, 2014).

Estudo realizado sobre a influência da estrutura heterocíclica e do comprimento da cadeia alquil dos cátions reportou que o ânion do [Bmpy][Cl] tem interação mais forte com a celulose do que em [Bmim][Cl], evidenciando a influência da estrutura heterocíclica na eficiência do líquido iônico. Para líquidos iônicos imidazólicos, concluiu-se que quanto menor a cadeia de alquil, maior a solubilidade da celulose no solvente, pois as longas cadeias podem aumentar o impedimento estérico do ânion para se ligar à celulose, diminuindo sua capacidade de dissolução. Foi estudado também a presença de grupos de retirada de elétrons na cadeia alquil do cátion, que aumenta a sua eletronegatividade, aumentando assim a interação entre o cátion e a celulose (ZHAO, YULING *et al.*, 2012). Portanto, a capacidade de dissolução da celulose nos líquidos iônicos também pode ser influenciada pelos cátions.

Outra forma dos líquidos iônicos atuarem no pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, é através da remoção parcial ou total da lignina. Pu *et al.* (2007) mostrou que líquidos iônicos podem solubilizá-la na ordem decrescente $[\text{MeSO}_4] > \text{Cl}^- \sim \text{Br}^- \gg \text{PF}_6^-$ para líquidos iônicos contendo $[\text{Bmim}]^+$, enquanto que grandes ânions não coordenantes como $[\text{PF}_4]^-$ e $[\text{BF}_6]^-$ não foram eficientes na remoção da lignina. Porém ao se estudar a solubilidade da lignina através de espectroscopia por ressonância magnética nuclear, foi concluído que o ânion precisa apenas ter um valor mínimo de basicidade de ligação de hidrogênio para a dissolução e, a partir deste ponto, o ânion não influencia mais significativamente a solubilidade geral da

lignina. Ao contrário do cátion que tem suas interações com o soluto com efeito mais sutil sobre a solubilidade da mesma.

Em relação à quebra das ligações de lignina-hemicelulose, o pré-tratamento com o líquido iônico ácido [HC₄im][HSO₄] consegue despolimerizar a lignina através da clivagem de ligações de éter glicosídico, éster e β -O-4 chegando a 80% de despolimerização ainda nos estágios iniciais de pré-tratamento. Depois, é possível a repolimerização e recuperação com um antissolvente como a água, podendo aplicá-la para produção de produtos de alto valor, agregando à cadeia produtiva dos biocombustíveis (BRANDT *et al.*, 2015).

Essas ações sobre a biomassa lignocelulósica podem aumentar significativamente a acessibilidade enzimática durante a hidrólise. Ao pré-tratar bagaço de cana-de-açúcar com acetato de 1-etil-3-metilimidazólio [Emim][Ac] a 120 °C por 120 min, Silva *et al.* (2011) obtiveram rendimentos de 80% de glicose em apenas 6 h de hidrólise enzimática, alcançando mais de 90% após 24 h. Ninomiya *et al.* (2015) também obtiveram sacarificação de celulose acima de 90% ao pré-tratar pó de bagaço com acetato de colina [ChO][Ac]. Raj *et al.* (2016) conseguiram cerca de 97% de rendimento de glicose em 24 h de hidrólise pré-tratando talo de mostarda e obteve 98,7% de rendimento de glicose após 72 h de hidrólise pré-tratando palha de trigo, ambos com [Emim][Ac]. Eles concluíram que a variabilidade da biomassa também tem um papel importante no pré-tratamento e, ao comparar os resultados com outros líquidos iônicos, atestaram que a diminuição do tempo de hidrólise da biomassa pré-tratada foi obtida pela maior basicidade da ligação de hidrogênio dos líquidos iônicos. Isto facilitou a deslignificação, a remoção de hemicelulose e reduziu significativamente a cristalinidade da celulose, resultando em natureza mais amorfa.

Em comparação ao pré-tratamento ácido, a biomassa pré-tratada com o líquido iônico [Emim][Ac] apresenta menor cristalinidade, maior área superficial e maior redução no teor de lignina em comparação com o pré-tratamento com ácido diluído, obtendo 90% de rendimento de hidrólise em 12 h em contraste com o tratamento ácido que obtém 80% em 72 h (LI *et al.*, 2009).

Além da ação direta do cátion e ânion, outros fatores afetam a eficiência do pré-tratamento. Por exemplo, quanto menor a viscosidade do líquido iônico, influenciada pelo ânion e pela cadeia lateral do cátion, maior será a solubilidade da celulose e também melhor será o processo de *downstream* (BADGUJAR; BHANAGE, 2015). As condições do pré-tratamento

como o tipo da biomassa, o seu tamanho de partícula, umidade ou presença de água e a razão biomassa:líquido iônico também interferem na eficiência. Uma menor carga de biomassa melhora a taxa de dissolução de celulose uma vez que propicia uma dispersão mais eficiente e difusão do líquido iônico dentro dos poros da amostra, assim a maioria dos pesquisadores costumam usar uma carga de 5 a 8% em massa (WANG; GURAU; ROGERS, 2012; BADGUJAR; BHANAGE, 2015).

Além disso, temperaturas mais altas de pré-tratamento promovem a dissolução da biomassa, uma vez que diminuem a viscosidade do líquido iônico e desestabilizam a rede de ligações de hidrogênio. Em geral, na literatura o pré-tratamento se dá entre 40 e 160 °C, porém é importante atentar que altas temperaturas propiciam a decomposição do líquido iônico acarretando na derivação indesejada da celulose e formação de impurezas que diminuem a eficiência de reciclagem do líquido iônico e dificultam as etapas seguintes do processo (BADGUJAR; BHANAGE, 2015; ELGHARBAWY *et al.*, 2016).

Para que esta técnica possa ser aplicada industrialmente, é importante que os líquidos iônicos sejam recuperados e reciclados. Para isso, é desejável ter recuperação completa do produto regenerado, eliminar as impurezas e manter a estabilidade do solvente para que o uso do líquido iônico recuperado mantenha-se eficiente (BADGUJAR; BHANAGE, 2015). Uma forma de recuperação, devido à baixa pressão de vapor, é a destilação dos outros componentes, podendo ainda ser realizada a extração com solventes orgânicos, processos supercríticos de dióxido de carbono e separação por membrana (ELGHARBAWY *et al.*, 2016).

Sun *et al.* (2013) relatou que a estrutura do [Emim][Ac] quando reciclado se manteve essencialmente inalterada e não alterou a digestibilidade nem a eficiência enzimática. Huang *et al.* (2013) conseguiu reciclar e reutilizar o líquido iônico [Amim][Cl] por 5 vezes com pureza de 99,56% sem mudanças estruturais.

Um estudo técnico-econômico sobre uma biorrefinaria de etanol baseada no pré-tratamento com líquido iônico, realizado por Klein-Marcuschamer *et al.*, aponta que as variáveis que mais interferem no custo da planta e de operação são a carga de líquido iônico utilizada, a reciclagem e o custo do líquido iônico (KLEIN-MARCUSCHAMER; SIMMONS; BLANCH, 2011). Primeiramente o custo do líquido iônico deve ser de modo que o processo seja economicamente viável. Caso seja, o estudo apontou que diminuir a carga de líquido iônico utilizado impacta mais do que a reciclagem do mesmo. Outro fator que aumenta a viabilidade

da biorrefinaria é a utilização da lignina para outros produtos de alto valor agregado, mostrando que a lignina pode reduzir efetivamente o preço mínimo de venda do etanol, inclusive até o ponto em que a lignina se torna a principal fonte de receita para a biorrefinaria.

Outro fator que deve ser considerado, tanto do viés econômico quanto sustentável, é o consumo de água. Konda *et al.* (2014) realizou um estudo com a finalidade de redução de custos de um processo em que o líquido iônico é totalmente retirado antes da biomassa seguir para a etapa de hidrólise comparado a um processo “*one-pot*” que não necessita de remoção do líquido iônico antes da sacarificação por ser realizada com enzimas tolerantes. Concluiu que a carga de líquido iônico e o custo do mesmo são essenciais para a viabilidade econômica, porém, embora as duas rotas apresentassem potencial econômico comparável, tratando-se de cargas de biomassa mais altas, o processo “*one-pot*” apresentou um menor consumo de água, mostrando-se uma oportunidade de processo mais sustentável a ser explorado.

Ainda em busca de melhorar o processo, novos líquidos iônicos têm sido sintetizados a partir de sais triazólicos. No que diz respeito à síntese, os líquidos iônicos à base de cátions 1,2,3-triazólio são preparados em duas etapas com bom rendimento numa reação de “*click chemistry*” em que ocorre a cicloadição entre azidas funcionalizadas e alcinos, catalisada por cobre resultando em 1,2,3-triazóis-1,4-dissubstituídos. Dessa forma, as propriedades do líquido iônico podem ser examinadas por seu êxito no controle molecular, facilidade de síntese e boas condições de reação. Estudos preliminares por microscopia eletrônica de varredura de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com estes solventes foram realizados indicando que há mudança estrutural nas fibras da biomassa, aumentando a exposição superficial da mesma, o que facilitaria o acesso das enzimas à estrutura celulósica (CARMO *et al.*, 2014). Frente aos sais imidazólicos, os sais triazólicos são vantajosos pela fácil purificação, altos rendimentos de síntese, geração de subprodutos de menor impacto ambiental, condições simples de reação, estereoespecificidade e geração de compostos estáveis (KOLB *et al.*, 2001). No entanto, ainda não existem estudos de avaliação dessa classe de líquidos iônicos para o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica.

3.

OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O trabalho tem a finalidade de estudar a eficiência de pré-tratamento dos líquidos iônicos e comparar os triazólicos frente a um imidazólico comercial, analisando a influência de seus constituintes estruturais na desconstrução da biomassa lignocelulósica.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar o pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* com o líquido iônico 1-butil-3-metil-imidazólio ([BMIM][Ac]), em diferentes tempos e temperaturas a fim de estabelecer as melhores condições de pré-tratamento.
- Realizar o pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar nas condições pré-estabelecidas com quatro líquidos iônicos triazólicos distintos;
- Avaliar os resultados obtidos comparando a eficiência do pré-tratamento com o líquido iônico imidazólico, com o melhor líquido iônico triazólico e o pré-tratamento hidrotérmico.

4.**METODOLOGIA**

4.1. BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

O bagaço de cana-de-açúcar *in natura* utilizado foi gentilmente cedido pela COAGRO (Cooperativa Agroindustrial do Estado do Rio de Janeiro) de Campos dos Goytacazes, RJ. O resíduo agroindustrial foi moído em moinho de facas WILEY MILL® e peneirado a uma granulometria entre 180 µm e 850 µm, sendo ao final armazenado em temperatura ambiente. O bagaço pré-tratado hidrotêrmicamente foi gentilmente cedido pela empresa INBICON S/A (Dinamarca).

4.2. PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR COM LÍQUIDO IÔNICO

Os líquidos iônicos (LI) triazólicos avaliados foram sintetizados e caracterizados pelo Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), MG, sendo estes: iodeto de 4-hidroximetil-3-metil-1-propil-1*H*-1,2,3-triazol (LI 83), iodeto de 4-hidroximetil-3-metil-1-hexil-1*H*-1,2,3-triazol (LI 100), brometo de 4-hidroximetil-3-propil-1-propil-1*H*-1,2,3-triazol (LI 112), acetato de 4-hidroximetil-3-propil-1-propil-1*H*-1,2,3-triazol (LI 117). O LI comercial empregado foi o acetato de 1-butil-3-metil-imidazólio ([Bmim][Ac]) adquirido da Sigma-Aldrich. As estruturas dos líquidos iônicos estão elucidadas na Figura 19.

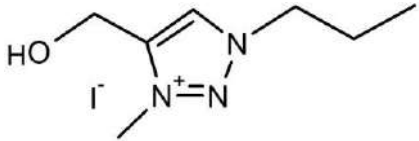
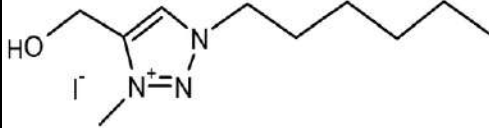
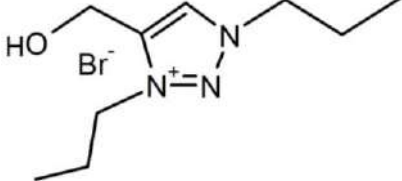
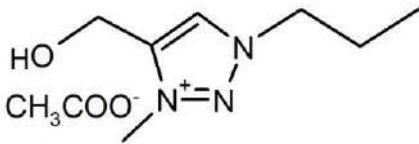
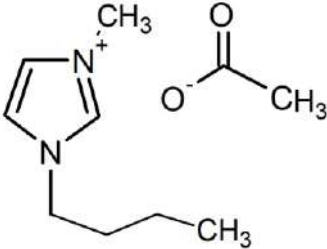
Estrutura	Informações	Identificação
	$C_7H_{14}IN_3O$ MM: 283,11	LI 83 iodeto de 4-hidroximetil-3-metil-1-propil-1H-1,2,3-triazol
	$C_{10}H_{20}IN_3O$ MM: 325,19	LI 100 iodeto de 4-hidroximetil-3-metil-1-hexil-1H-1,2,3-triazol
	$C_9H_{18}BrN_3O$ MM: 264,16	LI 112 brometo de 4-hidroximetil-3-propil-1-propil-1H-1,2,3-triazol
	$C_9H_{17}N_3O_3$ MM: 215,25	LI 117 acetato de 4-hidroximetil-3-propil-1-propil-1H-1,2,3-triazol
	$C_{10}H_{18}N_2O_2$ MM: 198,26	[BMIM][Ac] acetato de 1-butil-3-metil-imidazólio

Figura 18. Estrutura dos líquidos iônicos triazólicos e do líquido iônico imidazólio.

Fonte: Elaboração própria.

O pré-tratamento da biomassa foi realizado seguindo a metodologia descrita por Silva *et al.* (2011), com adaptações, assim como indicado no esquema da Figura 20. Conforme ilustrado na Figura 21, em um balão de fundo redondo de 50 mL contendo um agitador magnético foram adicionados 0,2 g de bagaço e 3,0 g de líquido iônico, respeitando a proporção de 1:15 (m/m). A mistura foi mantida durante 120 min em um banho de glicerina a 120 °C e, ao término do tempo, foram adicionados 10 mL de água destilada como contrassolvente para que a biomassa fosse regenerada. A mistura foi resfriada em banho de gelo e o líquido iônico presente na fração líquida foi recuperado e armazenado. A fim de retirar resíduos de líquidos iônicos da amostra de bagaço pré-tratada esta foi lavada com cerca de 200 mL de água destilada por centrifugação e cerca de 800 mL de água destilada por filtração com membrana Millipore® hidrofílica GV (durapore em PVDF 47 mm de diâmetro e 0,22 µm de diâmetro de poro) em bomba de vácuo.

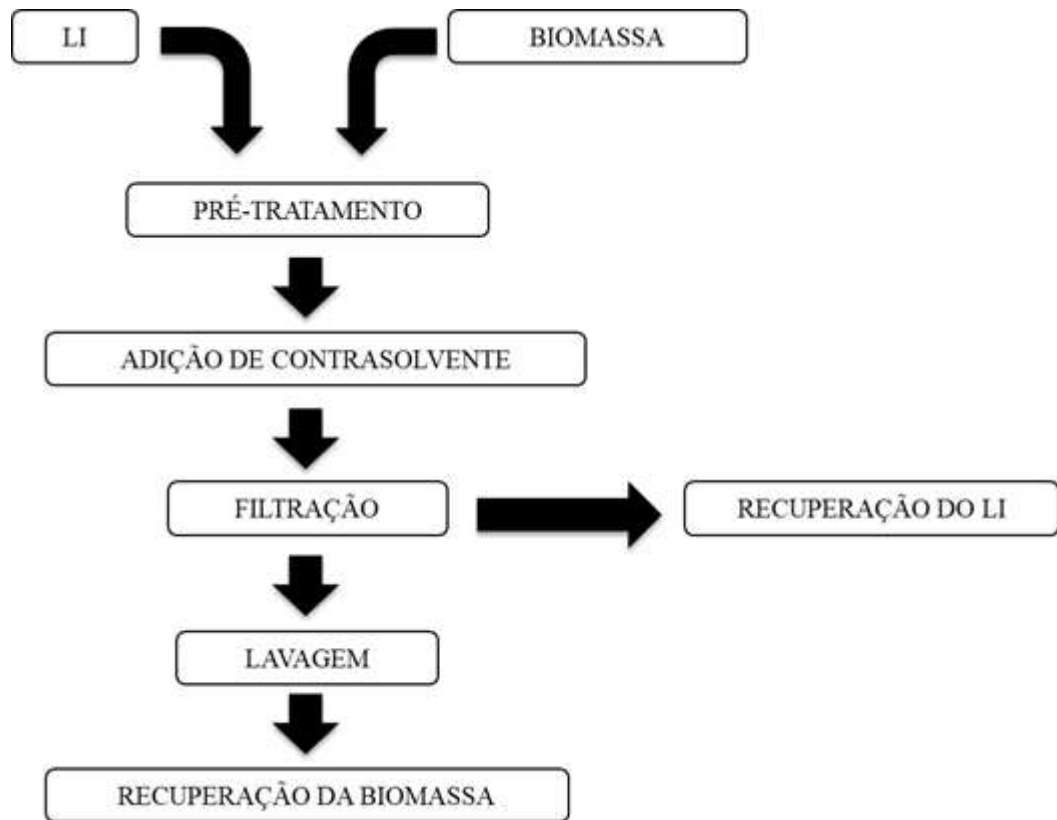


Figura 19. Esquema ilustrativo das etapas de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica com líquidos iônicos.

Fonte: Elaboração própria.

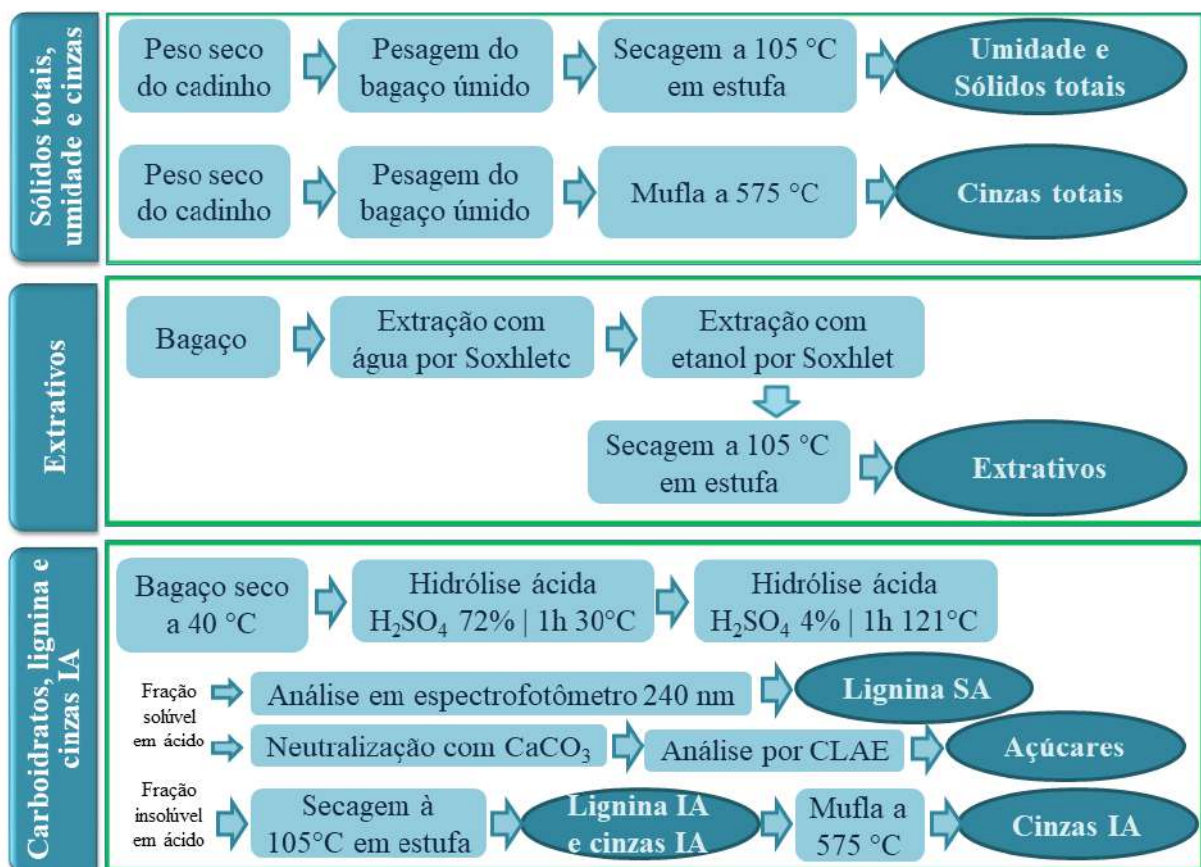


Figura 20. Sistema para pré-tratamento com balão contendo a mistura de LI e bagaço, tampado, e posto em banho de glicerina.

Fonte: Própria, 2017.

4.3. DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO *IN NATURA* E PRÉ-TRATADO

Os procedimentos realizados para caracterização do bagaço de cana-de-açúcar se baseiam nos métodos analíticos para análise de biomassa padronizados pelo Laboratório Nacional de Energia Renovável dos Estados Unidos da América (NREL – *National Renewable Energy Laboratory*) e descritos em protocolos conhecidos como LAP (*Laboratory Analytical Procedures*) de referência mundial. O processo de caracterização é composto por três procedimentos esquematizados na Figura 22: determinação dos sólidos totais, umidade e cinzas; quantificação de extrativos; determinação de carboidratos estruturais, lignina e cinzas insolúveis em ácido.



IA: Insolúvel em ácido; AS: solúvel em ácido

Figura 21. Esquema ilustrativo das etapas para determinação da composição química do bagaço *in natura* e pré-tratado.

Fonte: Elaboração própria.

4.3.1. Determinação de sólidos totais, umidade e cinzas

A determinação de sólidos totais, umidade e cinzas seguiu as técnicas reportadas por Sluiter e colaboradores (2008a). A determinação de sólidos totais foi realizada por quantificação da umidade, ou seja, pela diferença de massa entre o bagaço úmido e seco. Para isso, cadinhos de porcelana foram secos em estufa a 105 °C por pelo menos 4 h e pesados após serem esfriados em um dessecador por 30 min. A biomassa foi pesada no cadinho de porcelana e este foi levado à estufa a 105 °C *overnight*. Feito isso, o cadinho com o bagaço seco esfriou no dessecador por 30 min para ser pesado e os sólidos totais calculados de acordo com a Equação 1:

$$\% \text{ Sólidos Totais} = \frac{\text{Massa}_{\text{cadinho seco com bagaço seco}} - \text{Massa}_{\text{cadinho seco}}}{\text{Massa}_{\text{bagaço úmido}}} \times 100 \quad [\text{Eq. 1}]$$

As cinzas totais foram calculadas por procedimento similar ao de sólidos totais, porém levando o cadinho de porcelana à mufla à 575 °C e calculando-as de acordo com a Equação 2:

$$\% \text{ Cinzas} = \frac{\text{Massa}_{\text{cadinho com cinzas}} - \text{Massa}_{\text{cadinho}}}{\text{Massa}_{\text{bagaço seco}}} \times 100 \quad [\text{Eq. 2}]$$

4.3.2. Determinação de extrativos

A determinação de extrativos da biomassa *in natura* foi realizada por meio do método de Soxhlet conforme descreve Sluiter *et al.* (2008b) no protocolo para determinação de extrativos em biomassa, com seis sistemas em série, conforme mostrado na Figura 23. Os cartuchos de celulose foram previamente secos a 105 °C em estufa e pesados. A eles, foram adicionados 2,0 g de bagaço *in natura* com porcentagem de sólidos totais conhecida. Em cada balão de fundo redondo de 500 mL foram adicionados pérolas de vidro e 190 mL de solvente e o aquecimento foi feito por manta térmica. Primeiramente, foi feita a extração do bagaço de cana-de-açúcar com água por no mínimo 6 horas para remoção de material inorgânico, carboidratos não estruturais e materiais nitrogenados. Na sequência foi realizada a extração com álcool etílico 95% da mesma forma, para remoção de clorofila e outros componentes menores.



Figura 22. Sistema de extração Soxhlet para determinação dos extrativos.
Fonte: Própria.

Terminado o processo, três cartuchos com a biomassa foram secos em estufa a 105 °C para que fosse determinada a quantidade de extrativos segundo a Equação 3:

$$\% \text{ Extrativos} = \frac{(Massa_{\text{cartucho seco}} + Massa_{\text{bagaço seco}} - Massa_{\text{cartucho com biomassa sem extrativos}})}{Massa_{\text{bagaço seco}}} \times 100 \quad [\text{Eq. 3}]$$

A biomassa dos três cartuchos restantes foi mantida a 40 °C até atingir um teor de umidade inferior a 10% necessária para a etapa de determinação de carboidratos estruturais e lignina.

4.3.3. Determinação de carboidratos e lignina

De acordo com o protocolo analítico descrito por Sluiter *et al.* (2012), 0,300 g ± 0,010 g de amostras de bagaço sem extrativos foram transferidos para tubos de hidrólises em triplicata nos quais foram adicionados 3,0 mL de ácido sulfúrico 72% (m/m). Os tubos foram homogeneizados durante 1 hora em banho-maria a 30 °C com o auxílio de bastão de teflon, de modo a permitir que toda a biomassa entrasse em contato com o ácido. Completado o tempo,

foram adicionados 84 mL de água ultrapura, diluindo o ácido a uma concentração final de 4% (m/m) para que as amostras fossem autoclavadas a 121 °C por 1 hora.

Em paralelo, foi preparada uma solução padrão para contabilizar a porcentagem de recuperação de açúcares após a hidrólise ácida. Esse procedimento se faz necessário uma vez que o processo em autoclave pode degradar os açúcares. A concentração da solução padrão estabelecida foi próxima à concentração de açúcares liberados do bagaço de cana-de-açúcar nesse processo, sendo 3,0 g/L de glicose, 2,0 g/L de xilose, 1,0 g/L de arabinose e 1,0 g/L galactose. Dessa solução, 10 mL foram retirados e adicionados a tubos de hidrólise, em triplicata, juntamente a 348 µL de ácido sulfúrico 72%, mantendo a proporção de 4% (m/m) deste.

Após a hidrólise com ácido concentrado e diluído, as amostras foram filtradas em cadinhos de Gooch de massa seca conhecida. A fração sólida foi levada à estufa a 105 °C *overnight* para o cálculo do conteúdo de lignina e cinzas insolúveis em ácido sulfúrico. Em seguida, a mesma foi levada à mufla a 575 °C *overnight* para calcular o conteúdo de cinzas insolúveis em ácido. Pela diferença das massas pesadas após cada etapa, foi possível determinar a quantidade de lignina insolúvel em ácido presente na amostra.

A fração líquida do filtrado corresponde aos componentes solúveis em ácido sulfúrico. Parte das amostras líquidas foi destinada para quantificação do teor de lignina solúvel em ácido sulfúrico (LSA) conforme a Equação 4. Tais amostras foram analisadas em duplicata no espectrofotômetro UV-visível (*ThermoScientific, Evolution 201*). Para isso as amostras foram diluídas de modo a ter absorvância entre 0,7 e 1,0 a 240 nm.

$$\% LSA = \frac{\text{Absorbância} \times \text{Volume}_{\text{filtrado}} \times \text{diluição}}{\epsilon \times \text{Massa}_{\text{bagaço seco}} \times \text{comprimento óptico}} \times 100 \quad [\text{Eq. 4}]$$

Onde ϵ corresponde à absorvância do bagaço de cana-de-açúcar no comprimento de onda utilizado, isto é, 25 L/g.cm.

Outra parte da fração líquida foi destinada à quantificação do teor de carboidratos estruturais. Para tanto, as amostras e o padrão de recuperação de açúcares foram neutralizados com CaCO_3 até pH 5-6, e após centrifugação, cerca de 1 mL de cada sobrenadante foi separado para a análise em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE).

4.3.3.1. Quantificação de monossacarídeos e dissacarídeos do material pré-tratado e *in natura*

As amostras foram quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), sendo injetadas no cromatógrafo líquido ThermoScientific Ultimate 3000, equipado com detector de Índice de Refração (RI) a 50 °C, pré-coluna Carbo-P (4.6mm x 4,0 cm – ResinaPlúmbea, Bio-Rad, EUA) e coluna Aminex HPX – 87P (300 x 7.8mm, 9 mm de tamanho de partícula, *Bio-Rad Laboratories Ltd*), mantida a 80°C, sendo a fase móvel água ultrapura, em fluxo isocrático, a 0,6 mL.min⁻¹ de vazão e volume de injeção de 20 mL com tempo de corrida de 30 min. As respostas foram obtidas em μ RIU e as concentrações foram determinadas com base nas respectivas curvas analíticas.

Para injeção no equipamento, cerca de 1mL das amostras foram filtradas com o auxílio de seringas acopladas a filtros Millex[®] LCR (0,45 μ m) de polietileno diretamente para os *vials*. Além desses, foi acrescido à corrida um branco de água ultrapura e cinco pontos de uma solução padrão preparada os quais compõem a curva padrão. A solução padrão corresponde a 3,0000 mg/mL de glicose, 2,0000 mg/mL de xilose, 1,0000 mg/mL de arabinose, galactose e celobiose, e os pontos são oriundos de uma diluição seriada conforme apresentado a Tabela 1.

Tabela 1. Curva de calibração utilizada nas análises de CLAE (mg/mL).

Açúcar	Concentração em mg/mL dos pontos da curva analítica				
	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5
Glicose	3,0000	1,5000	0,7500	0,3750	0,1875
Xilose	2,0000	1,0000	0,5000	0,2500	0,1250
Arabinose/ Galactose/ Celobiose	1,0000	0,5000	0,2500	0,1250	0,0625

4.4. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

As enzimas celulolíticas utilizadas, *Celluclast*[®] 1.5 L e *Novozym 188*[®], foram gentilmente cedidas pela empresa *Novozymes Latin America* (Araucária, Brasil).

4.4.1. Determinação da atividade enzimática

Antes de iniciar os procedimentos de hidrólise enzimática, foi preciso quantificar a atividade das celulases comerciais *Celluclast*[®] 1.5 L e *Novozym 188*[®], a fim de garantir a padronização da dosagem a cada uso. Para isso, quantificou-se a FPase, que determina a atividade da celulase em FPU (*filter paper unit*) sobre o papel de filtro e a β -glucosidase.

4.4.1.1. Determinação da FPase

O procedimento seguiu a metodologia descrita pela IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada) adaptada por Adney e Baker (1996). A quantificação dos açúcares liberados foi determinada com auxílio do método DNS descrito por Miller (1959) e adaptado conforme Teixeira e colaboradores (2012).

O ensaio foi realizado em triplicata em tubos de ensaio onde em cada um foi adicionado 1 mL de tampão citrato de sódio 0,05 M, pH 4,8 e uma tira de papel de filtro Whatman N° 1 de 1 x 6 cm enrolada, de aproximadamente 50 mg. Os tubos foram colocados em banho-maria por 5 minutos a 50 °C para o equilíbrio da temperatura e após esse tempo foi adicionado 0,5 mL de uma solução de enzima previamente diluída. Complementarmente, preparou-se um ensaio controle para a enzima, em que havia somente 1,5 mL de tampão e o papel de filtro, um ensaio controle para o substrato, no qual não foi adicionado o papel de filtro e um ensaio controle para a reação em que não foram adicionados a enzima nem o substrato.

Os tubos foram encubados e, após 1 hora, a reação foi interrompida com a adição de 3 mL de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico). Em seguida, os tubos foram colocados em banho de água fervente durante 5 minutos e, logo após, resfriados em banho de gelo até a temperatura ambiente. Feito isso, foi realizada uma diluição de 0,2 mL da mistura reacional com 2,5 mL de água destilada e realizada a leitura da absorbância a 540 nm, utilizando um espectrofotômetro para posterior cálculo da atividade enzimática.

A concentração de açúcares redutores, equivalentes à glicose, foi determinada por meio de uma curva padrão cujas concentrações de glicose eram conhecidas. Para a construção da curva padrão partiu-se de uma solução estoque de 10,0 mg/mL, preparada em água destilada, sendo realizadas diluições 1:1,5, 1:2, 1:3, 1:5. Após o preparo das diluições com as

concentrações conhecidas, a curva de glicose passou pelo mesmo procedimento que as amostras, utilizando 0,5 mL das diluições, 1mL de tampão e 3 mL de DNS seguindo a metodologia descrita pela IUPAC.

Para a atividade de FPase, uma unidade de enzima (FPU) foi baseada na liberação de exatamente 2,0 mg de glicose, seguindo a Equação 5:

$$FPU = \frac{2,0}{(0,18016 \times 0,5 \times 60) \times [\text{enzima diluída}]} \text{ unidades/mL} \quad \text{Eq [5]}$$

4.4.1.2. Determinação da β -glicosidase

As dosagens da atividade enzimática de β -glicosidase foram realizadas conforme metodologia descrita pela IUPAC segundo Ghose (1987), com adaptações descritas.

Em cada tubo de ensaio adicionou-se 0,5 mL de cada uma das enzimas diluídas em tampão citrato de sódio 0,05 M, pH 4,8. Os tubos foram colocados em banho-maria por 5 minutos a 50 °C para o equilíbrio da temperatura. Após esse tempo, foi adicionado 0,5 mL de uma solução 15 mmol/L do substrato de celobiose preparado no mesmo tampão da enzima e os tubos foram encubados por 30 minutos. Ao término da reação, os tubos foram imersos em um banho de água fervente por 5 minutos e resfriados em banho de gelo. A concentração final de glicose foi determinada utilizando o bioanalisador *Biochemistry Analyzer YSI 2700*.

Uma unidade de atividade (IU) corresponde à liberação de um μmol de produto por minuto. Os ensaios para determinação da atividade enzimática foram realizados em triplicata e os resultados obtidos segundo a Equação 6:

$$\frac{\text{IU}}{\text{mL}} = \frac{\text{Diluição} \times \text{Fator de conversão} \times \text{Volume total do ensaio (mL)}}{\text{Tempo (min)} \times \text{Volume da enzima (mL)}} \quad \text{Eq. [6]}$$

* Fator de conversão 5,55 ($\mu\text{mol/mL}$)

4.4.2. Hidrólise enzimática

Foi preparada uma solução-mãe da mistura enzimática a ser utilizada na hidrólise por meio da diluição das enzimas *Celluclast*[®] 1.5 L e *Novozym 188*[®] em tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,8, a fim de adicionar à biomassa volumes dessa mistura que correspondessem a uma dosagem de FPase de 20 FPU/g de biomassa e uma relação de FPase/ β -glicosidase de 1 FPU/3 BGU.

As amostras foram pesadas diretamente em *Erlenmeyers* de 25 mL com tampa contendo 1% de biomassa do meio reacional total, fosse este 10 ou 20 g. A eles foram acrescidas as devidas proporções da solução-mãe, além de azida de sódio 0,02% para evitar o crescimento de microrganismos. Com isso, os *erlenmeyers* foram vedados e incubados em *shaker* a 200 min⁻¹ climatizado a 50 °C, e alíquotas foram retiradas com tempos de reação de 0 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 24 h, 48 h, 72 h, de forma que o volume retirado não ultrapassasse 20% do inicial. Cada ponto foi armazenado em microtubos de 1,5 mL, os quais foram levados a banho-maria a 100 °C por 5 min, com o objetivo de inativar as enzimas, e em seguida centrifugados a 10.000 min⁻¹ por 5 minutos para posterior análise do sobrenadante. As concentrações de glicose de cada amostra foram determinadas no bioanalisador, e com base nos valores obtidos foi estabelecida uma proporção de diluição das amostras que permitisse posterior análise por CLAE como descrito no item 4.3.3.1.

4.5. ANÁLISE DA CRISTALINIDADE POR DIFRAÇÃO DE RAIOS-X

As amostras a serem analisadas por difração de raios-X (DRX), precisaram ser liofilizadas, retirando qualquer conteúdo líquido sem que houvesse alteração na morfologia da biomassa. Para isso, foi preciso anteriormente trocar o solvente das amostras lavando-as com terc-butanol. A liofilização foi realizada pelo Laboratório Bioetanol do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

As análises por DRX foram feitas pelo Laboratório de Catálise Combinatorial (LACCO/INT) no difratômetro de raios-X D8-Advance da Bruker com radiação Cu K α ($\lambda = 0,15418$ nm), filtro de níquel (0,02 mm), utilizada a 40 kV e 40 mA. A intensidade da difração foi medida na faixa de $2\theta = 5- 50^\circ$ utilizando variação de $0,02^\circ$ /passo e tempo de 1 s.

4.6. ANÁLISE DA MORFOLOGIA DA SUPERFÍCIE

As amostras a serem visualizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) precisaram da mesma preparação que as análises em difratômetro de raios-X, passando por uma etapa de troca de solvente de água para terc-butanol, seguida de liofilização. As amostras também foram impregnadas com ouro, uma vez que o carbono não é um bom emissor de elétrons e precisa tornar-se condutor. Dessa forma, consegue-se gerar imagens com boas resoluções.

Por fim, a morfologia da superfície das amostras foi observada por microscopia eletrônica de varredura de alta resolução com emissão de elétrons por um canhão de aplicação de um campo elétrico (MEV-FEG). As análises foram realizadas pelo Centro de Caracterização em Nanotecnologia (CENANO/INT).

O diagrama de blocos das etapas pelas quais o bagaço de cana-de-açúcar passou para a obtenção dos resultados está condensado na Figura 24.

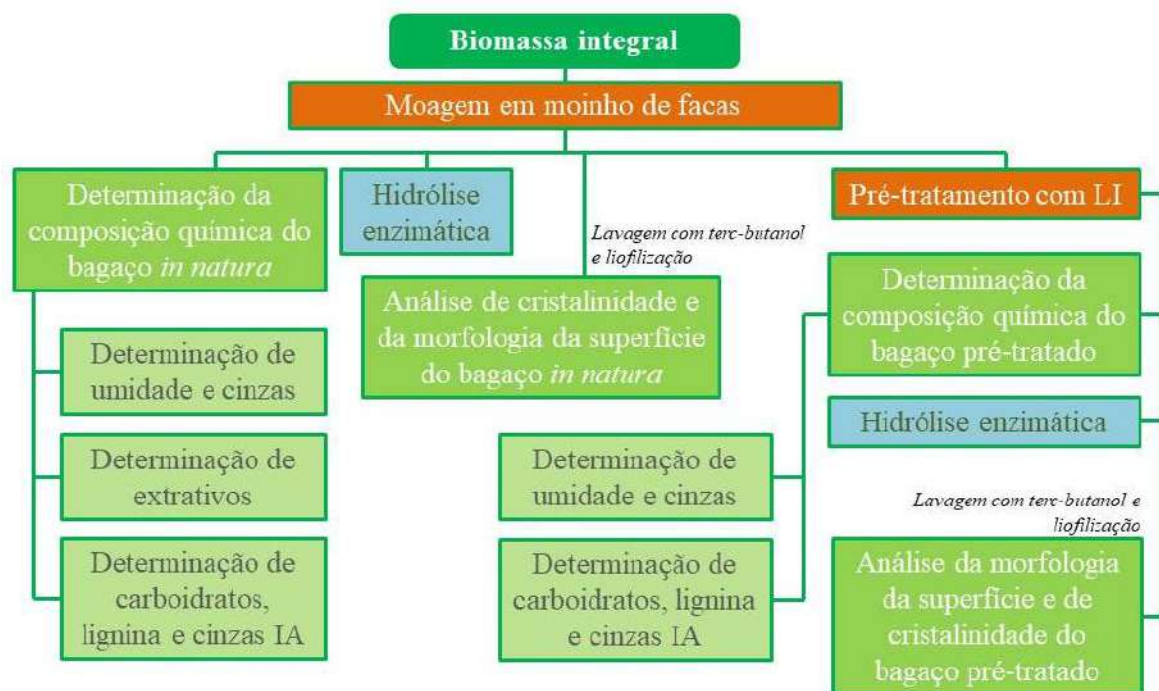


Figura 23. Diagrama de blocos das etapas das análises realizadas neste trabalho.

Fonte: Elaboração própria.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para melhor entendimento do trabalho, os resultados a seguir foram divididos em quatro tópicos. O primeiro refere-se à determinação da composição do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* utilizado para os pré-tratamentos com líquidos iônicos. O segundo traz o estudo das condições mais apropriadas de pré-tratamento realizado com o líquido iônico comercial acetato de 1-butil-3-metil-imidazólio. Estabelecidas as condições, a terceira parte aborda o pré-tratamento com líquidos iônicos triazólicos a fim de analisar a influência que cátions e ânions constituintes de cada molécula apresentam na hidrólise enzimática da biomassa e estudar a eficiência desses solventes. Por último, é realizada a comparação entre a eficiência do líquido iônico imidazólico no pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, o líquido iônico triazólico que possibilitou atingir melhores rendimentos de hidrólise da biomassa pré-tratada e a eficiência do pré-tratamento hidrotérmico, um método já estabelecido em grande escala.

5.1. DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO BAGAÇO *IN NATURA*

Inicialmente foi realizada a caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* que foi posteriormente submetido ao pré-tratamento com diferentes líquidos iônicos neste trabalho. A composição química da biomassa *in natura* em porcentagem de massa seca é apresentada na Tabela 2. Uma vez que o pré-tratamento nas condições empregadas remove os extrativos do material nativo, faz-se necessária a comparação com base nos extrativos e sem os mesmos. Estes dados são importantes para que possamos comparar e analisar as características de cada pré-tratamento em relação à alteração da composição da biomassa.

Tabela 2. Composição química do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* em porcentagem de massa seca com e sem extrativos.

Componentes	% (material com extrativos)	% (material livre de extrativos)
Glucana	37,78 ± 0,66	40,27 ± 0,71
Xilana	22,66 ± 1,56	24,15 ± 0,23
Arabinana	2,56 ± 1,12	2,73 ± 1,62
Lignina IA ^a	22,29 ± 0,74	23,75 ± 0,78
Lignina SA ^b	4,13 ± 0,82	4,41 ± 0,88
Extrativos	6,18 ± 0,24	-
Cinzas totais	3,05 ± 0,61	3,25 ± 0,65
Total	98,65	98,56

^aInsolúvel em ácido ^bSolúvel em ácido

Um estudo realizado por Rocha *et al.* (2015) avaliou a composição química de 60 amostras de misturas de bagaço de cana-de-açúcar do estado de São Paulo e do nordeste, de diferentes variedades, locais geográficos, solos, épocas de colheita e condições climáticas. A média de cada componente foi analisada sendo igual a 42,2% de celulose, 27,6% de hemicelulose, 21,6% de lignina, 5,6% de extrativos e 2,8% de cinzas. Esses valores são próximos aos obtidos no presente estudo ao considerar a variação do teor de cada componente nas amostras estudadas. Estas variações estão entre 36,9 e 45,7% de celulose, 25,6 e 29,6% de hemicelulose, 18,9 e 26,1% de lignina, 2,3 e 10,5% de extrativos e 1,1 e 6% de cinzas (ROCHA *et al.*, 2015). Podemos afirmar, então, que a composição explicitada na Tabela 2 está de acordo com a composição normalmente encontrada para o bagaço de cana-de-açúcar.

5.2. DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE PRÉ-TRATAMENTO COM O LÍQUIDO IÔNICO IMIDAZÓLICO

A fim de estabelecer as condições mais favoráveis de temperatura e tempo de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com líquido iônico, foram realizados ensaios com o líquido iônico acetato de 1-butil-3-metil-imidazólio ([Bmim][Ac]), pois sua estrutura é similar à do acetato de 1-etil-3-metil-imidazólio ([Emim][Ac]), comumente reportado para o pré-tratamento de biomassa lignocelulósica. A diferença entre os dois solventes é o radical butil no lugar do radical etil no nitrogênio 1 do cátion imidazólico (Figura 25).

O solvente [Emim][Ac] é abordado na literatura como um líquido iônico eficiente para a desestruturação da biomassa lignocelulósica devido à sua capacidade de extrair componentes do bagaço de cana-de-açúcar, à potencial remoção de lignina e à diminuição da cristalinidade da celulose. Foi reportado que a ação deste líquido iônico resultou em biomassas pré-tratadas que apresentam rendimentos de conversão de glucana em glicose de 99,8% e de xilana em xilose de 60% após 72 h de hidrólise enzimática, quando o pré-tratamento foi realizado a 120 °C por 120 min (SILVA *et al.*, 2011). O [Bmim][Ac] também já foi reportado na literatura para o pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar. A biomassa pré-tratada apresentou rendimentos de 97,4% de conversão em glicose após 3 h de hidrólise enzimática quando o pré-tratamento foi realizado a 110 °C por 30 minutos, numa proporção biomassa:líquido iônico de 1:20. Logo, o [Bmim][Ac] mostra-se capaz de melhorar a eficiência da hidrólise enzimática da biomassa (HASHMI *et al.*, 2017).

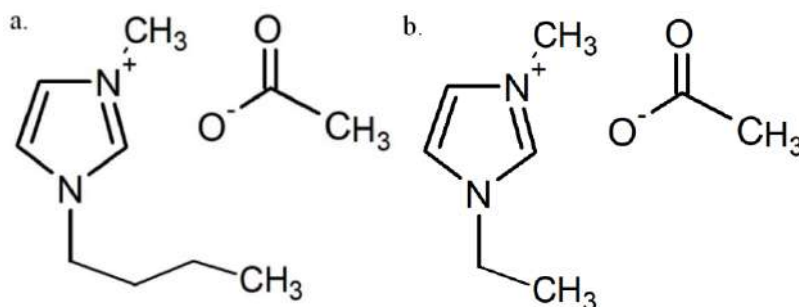


Figura 24. Estruturas moleculares dos líquidos iônicos imidazólicos. a. acetato de 1-butil-3-metil-imidazólio; b. acetato de 1-etil-3-metil-imidazólio.

Fonte: Elaboração própria.

5.2.1. Avaliação do efeito da temperatura de pré-tratamento

5.2.1.1. Avaliação da composição química das amostras pré-tratadas com [Bmim][Ac] em diferentes temperaturas

Para avaliar o efeito da temperatura no pré-tratamento, foram realizados ensaios a 80 °C, 100 °C e 120 °C por 120 min com o [Bmim][Ac]. A composição química dos materiais pré-tratados, apresentada na Tabela 3, mostra que este líquido iônico é capaz de remover parcialmente a lignina da biomassa, visto que a porcentagem de lignina nas amostras pré-tratadas é inferior a 22,3 % apresentada no material *in natura*. O teor de hemicelulose não sofre alterações expressivas, enquanto o teor relativo de glucana parece aumentar com a elevação da temperatura, porém para garantir tal afirmação, será necessário realizar experimentos adicionais de avaliação da perda mássica ao final do pré-tratamento para que o balanço de massa de cada componente seja calculado. Experimentos posteriores serão realizados para complementar esses dados.

Tabela 3. Composição química, em porcentagem de massa seca, do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratado com [Bmim][Ac] em diferentes temperaturas.

Componentes	<i>In natura</i> (com extrativos)	<i>In natura</i> (livre de extrativos)	80 °C*	100 °C	120 °C
Glucana	37,78 ± 0,66	40,27 ± 0,71	39,45 ± nd	41,23 ± 2,70	42,15 ± 1,94
Hemicelulose	25,22 ± 2,68	26,88 ± 1,85	25,92 ± nd	27,33 ± 3,43	26,24 ± 1,55
Lignina IA ^a	22,29 ± 0,74	23,75 ± 0,78	19,43 ± nd	17,04 ± 0,50	18,22 ± 3,61
Extrativos	6,18 ± 0,24	-	-	-	-
Cinzas totais	3,05 ± 0,61	3,25 ± 0,65	5,87 ± nd	5,88 ± nd	3,32 ± nd
Total	94,52	94,15	90,57	88,31	89,93

*dados obtidos a partir de um único ensaio de caracterização, por isso encontra-se sem desvio padrão; nd: valor não determinado; ^aInsolúvel em ácido

Pode-se observar que os balanços de massa das biomassas pré-tratadas encontram-se na ordem de 90%, sendo inferiores à biomassa *in natura* que tem balanços de massa próximos a 98% quando quantificada a lignina solúvel (Tabela 2). O baixo balanço total de massa das amostras pré-tratadas pode ocorrer devido às numerosas etapas do processo de caracterização que possibilitam a perda de massa. Outro fator interferente é a lignina solúvel em ácido, que nas biomassas pré-tratadas não é quantificada por causa de possíveis alterações em sua estrutura nativa que impediriam uma quantificação precisa. Ao negligenciar este componente, há uma queda no balanço de massa da biomassa *in natura*, como visto na Tabela 3, podendo ocorrer o mesmo na biomassa pré-tratada. Ainda, os extrativos podem não ter sido removidos completamente da biomassa durante o pré-tratamento, apesar de convencionalmente não se realizar extração destas biomassas. Portanto, os motivos acima afetam o balanço de massa dos materiais pré-tratados, contribuindo para um valor inferior à biomassa *in natura*.

5.2.1.2. Avaliação da hidrólise enzimática das amostras pré-tratadas com [Bmim][Ac] em diferentes temperaturas

Analisada a composição química, é importante avaliar quanto o líquido iônico consegue facilitar a ação enzimática na amostra pré-tratada. A Figura 26 mostra que mesmo a menor temperatura de pré-tratamento, avaliada a 80 °C, resulta em amostras de bagaço com digestibilidade favorecida na hidrólise enzimática, que apresentam aumentos de cerca de três vezes a concentração de glicose liberada em até 72 h em comparação à hidrólise da biomassa *in natura*. À temperatura de 120 °C, o tratamento com [Bmim][Ac] consegue aumentar cerca de 80% a liberação de glicose durante a hidrólise enzimática em relação ao pré-tratamento a 80 °C e aumenta mais de cinco vezes a concentração de glicose do que durante a hidrólise da biomassa *in natura*, evidenciando o potencial de obtenção de glicose desta biomassa pré-tratada.

Portanto, apesar da composição química dos materiais tratados nestas três temperaturas não apresentarem expressivas diferenças entre si, é possível atestar que o aumento da temperatura durante o pré-tratamento melhorou a digestibilidade das cadeias de celulose durante a hidrólise enzimática e, por isso, a temperatura de 120 °C foi escolhida para seguir os experimentos posteriores.

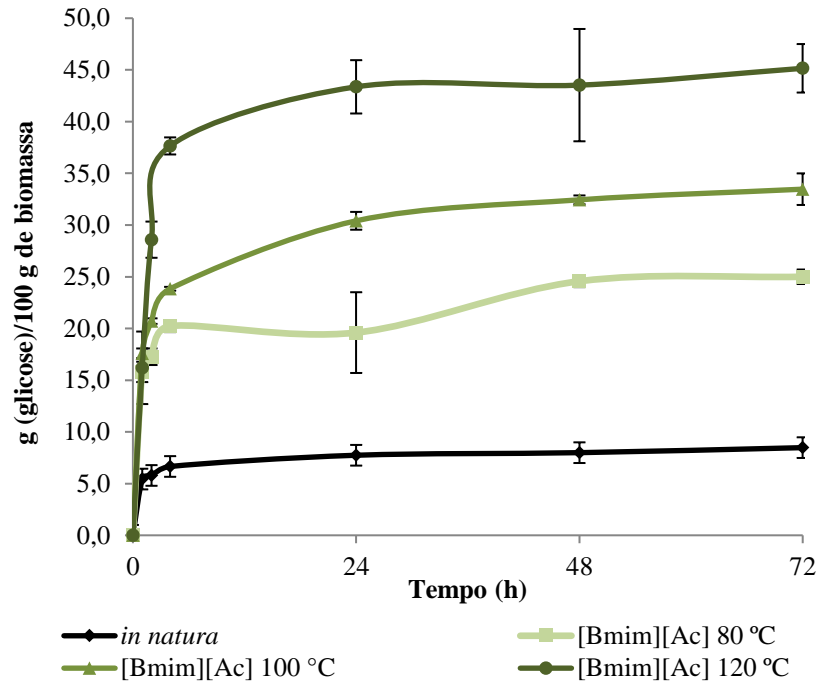


Figura 25. Concentração de glicose liberada durante a hidrólise enzimática de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratados com acetato de 1-butil-3-metil-imidazólio ([Bmim][Ac]) a 80, 100 e 120 °C.

5.2.2. Avaliação do efeito de tempo de pré-tratamento

5.2.2.1. Avaliação da composição química das amostras pré-tratadas com [Bmim][Ac] em diferentes tempos

Uma vez estabelecida a temperatura do pré-tratamento, houve a avaliação do efeito do tempo. Desta forma, foram conduzidos ensaios de 15 a 120 min a 120 °C. A composição química dos materiais pré-tratados está indicada na Tabela 4. Nas amostras pré-tratadas por 15 minutos já é possível notar remoção parcial da lignina, enquanto os outros componentes presume-se que não houve alteração, uma vez que os seus percentuais estão próximos aos da biomassa *in natura* com extrativos. Conforme aumenta a duração do pré-tratamento, é possível perceber o aumento do percentual de glucana. Entretanto, por causa do erro associado ao valor da glucana em 120 minutos, não podemos afirmar que o aumento é estatisticamente significativo com o acréscimo do tempo. Em relação à hemicelulose, não há variação expressiva de seu percentual em nenhum dos tempos de pré-tratamento, exceto no ensaio de 60 minutos. Provavelmente, este resultado está equivocado porque não segue a tendência das biomassas pré-tratadas nos outros tempos e se faz necessário a repetição da análise de composição desta amostra.

Tabela 4. Composição química, em base seca, do bagaço *in natura* e pré-tratado com [Bmim][Ac] durante 15, 30, 60 e 120 minutos.

Componentes	<i>In natura</i>	<i>In natura</i>	15 min	30 min	60 min	120 min
	(com extrativos)	(livre de extrativos)				
Glucana	37,78 ± 0,66	40,27 ± 0,71	38,32 ± 0,96	38,89 ± 0,57	40,39 ± 0,90	42,15 ± 1,94
Hemicelulose	25,22 ± 2,68	26,88 ± 1,85	24,64 ± 0,34	23,55 ± 0,36	19,81 ± 0,08	26,24 ± 1,55
Lignina IA ^a	22,29 ± 0,74	23,75 ± 0,78	19,34 ± 0,55	19,62 ± nd	20,06 ± 0,38	18,22 ± 3,61
Extrativos	6,18 ± 0,24	-	-	-	-	-
Cinzas totais	3,05 ± 0,61	3,25 ± 0,65	5,45 ± nd	5,31 ± nd	6,52 ± nd	3,32 ± nd
Total	94,52	94,15	87,75	87,37	86,78	89,93

nd: valor não determinado; ^aInsolúvel em ácido

5.2.2.2. Avaliação da hidrólise enzimática das amostras pré-tratadas com [Bmim][Ac] em diferentes tempos

Em relação ao tempo de pré-tratamento, o aumento deste propicia maior disponibilidade de açúcares na hidrólise enzimática. A biomassa pré-tratada por apenas 15 minutos tem concentração de glicose, durante a hidrólise enzimática, 3,7 vezes maior do que a observada na hidrólise da biomassa *in natura*. A concentração de glicose na hidrólise aumenta conforme aumenta o tempo em que da biomassa foi pré-tratada até o tempo de 60 min de pré-tratamento, onde atinge-se valores de rendimento de hidrólise próximos a 100% de conversão de glucana em glicose. A biomassa pré-tratada por 120 minutos, após 24 h hidrólise enzimática, não apresenta mais aumento da concentração de glicose em relação à obtida pela biomassa pré-tratada por 60 minutos. Sua cinética inicial de hidrólise, entretanto, é melhorada, atingindo valores mais altos já em 6 h de hidrólise enzimática, como ilustrado na Figura 27. Portanto, conclui-se que, apesar de em 24 h de hidrólise enzimática, a concentração de glicose das biomassas pré-tratadas por 60 min e 120 min seja semelhante, o aumento do tempo de pré-tratamento influenciou a cinética inicial de hidrólise da biomassa pré-tratada, sendo mais rápida, então, na hidrólise da biomassa pré-tratada por 120 min.

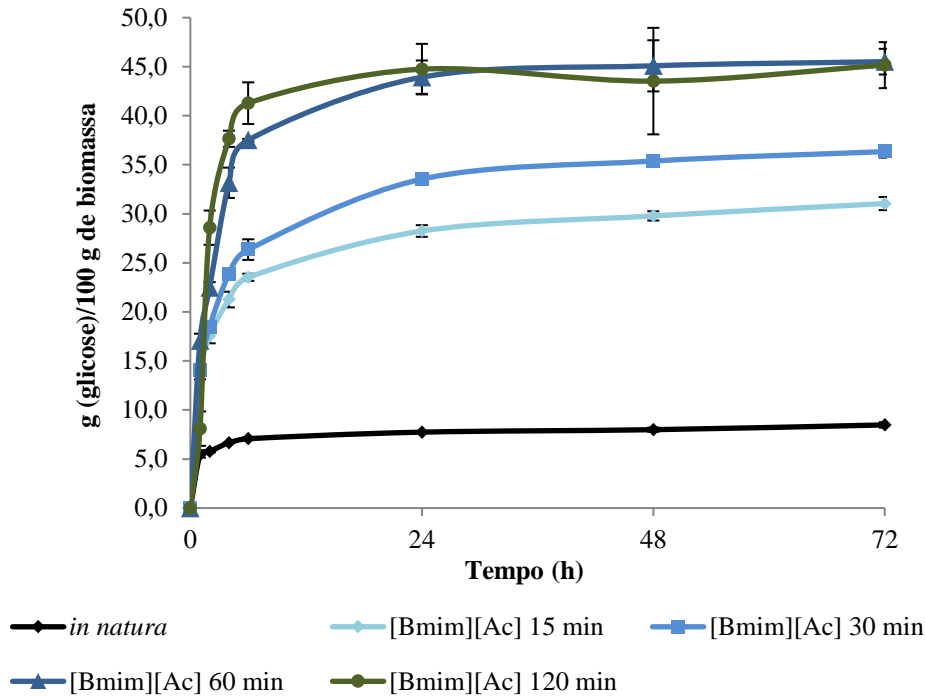


Figura 26. Concentração mássica de glicose liberada durante a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratados com acetato de 1-butil-3-metil-imidazólio ([Bmim][Ac]) por 15, 30, 60 e 120 minutos.

Industrialmente, a condição de pré-tratamento por 60 minutos é a mais viável de ser utilizada porque a diferença entre a glicose obtida na hidrólise enzimática da biomassa pré-tratada nesta condição e a pré-tratada por 120 minutos possivelmente não compensaria a diferença de uma hora de pré-tratamento, que representaria mais custo de equipamento e energia para a indústria. Porém, para fins de estudo, dentre as condições avaliadas, a melhor condição de pré-tratamento com o líquido iônico acetato de 1-butil-3-metil-imidazólio é de 120 °C por 120 minutos, pois minimiza o tempo de hidrólise enzimática necessário para atingir altos valores de conversão em glicose. Nestas condições, a biomassa pré-tratada com [Bmim][Ac] atinge concentração de 41,28 g de glicose/g de biomassa em apenas 6 horas de hidrólise e atinge valores de rendimento de hidrólise enzimática próximos a 98% de conversão em glicose em 24 h. Logo, o [Bmim][Ac] é tão eficiente para o pré-tratamento de biomassa lignocelulósica quanto o acetato de 1-etil-3-metil-imidazólio ([Emim][Ac]), já reportado na literatura (SILVA, 2011). Portanto, esse líquido iônico imidazólico foi usado para comparar a eficiência dos líquidos iônicos triazólicos estudados neste trabalho e a condição de pré-tratamento a 120 °C por 120 min foi utilizada para os pré-tratamentos seguintes.

5.2.2.3. Avaliação da cristalinidade das amostras pré-tratadas com [Bmim][Ac] em diferentes tempos

Para entender melhor a influência do [Bmim][Ac] na estrutura do bagaço, foi realizada a análise da cristalinidade das biomassas por difração de raios-X (DRX) de forma qualitativa. O perfil da celulose cristalina em uma análise de DRX contém duas raia de difração, uma correspondente aos planos cristalinos (1,0,1) e (1,0,-1) aproximadamente em 16° e outra em correspondente ao plano cristalino (0,0,2) em 22° , como demonstra a curva correspondente à biomassa *in natura* na Figura 28. Na biomassa pré-tratada com o [Bmim][Ac] por 15 minutos é possível notar a redução de intensidade de difração nos planos cristalinos relativos ao cristal de celulose. Já na biomassa tratada por 120 minutos, nota-se que a raia de difração correspondente aos planos cristalinos (1,0,1) e (1,0,-1) desaparece e a intensidade da segunda raia de difração é reduzida e está deslocada, apresentando uma maior influência do *background* amorfo deste material, indicando a capacidade deste líquido iônico em reduzir a cristalinidade das cadeias de celulose da biomassa.

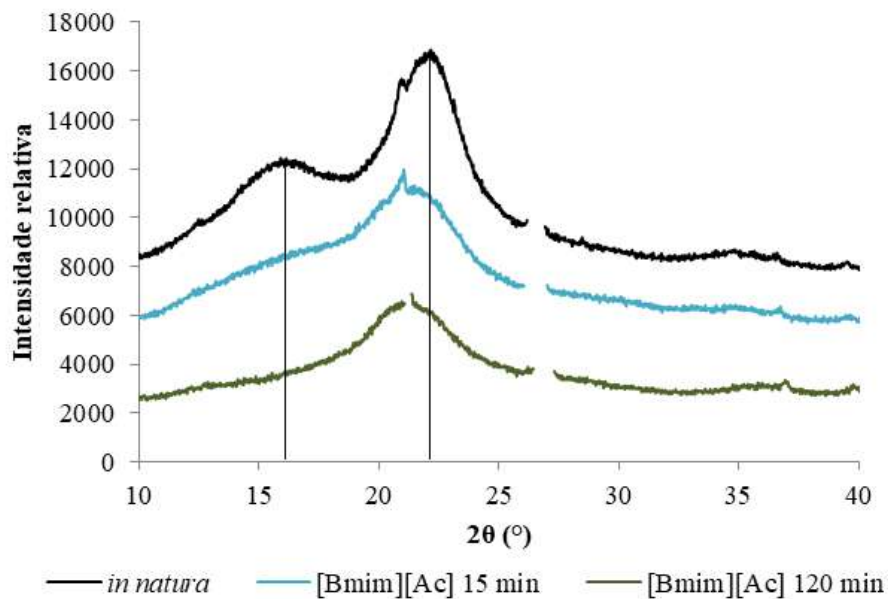


Figura 27. Perfil de difração de raios-X do bagaço *in natura* e pré-tratado com [Bmim][Ac] por 15 e 120 minutos.

Este comportamento de difração da biomassa pré-tratada está de acordo com os resultados obtidos na hidrólise enzimática, uma vez que a hidrólise da biomassa pré-tratada por 15 minutos já apresenta aumento da concentração de glicose liberada durante a hidrólise em comparação à hidrólise enzimática da biomassa *in natura*. Isso se dá porque mesmo em pouco

tempo, o líquido iônico consegue alterar a cristalinidade da biomassa. Além disso, a hidrólise enzimática da biomassa pré-tratada por 120 minutos apresenta valores superiores aos da biomassa pré-tratada por 15 minutos e alcança rendimentos de cerca de 99% de conversão de glucana em glicose. Isso pode ser correlacionado com o fato de que, em 120 minutos, o líquido iônico consegue desestruturar completamente os planos cristalinos (1,0,1) e (1,0,-1), além de alterar o plano cristalino (0,0,2). Essa alteração na cristalinidade da biomassa lignocelulósica é importante para que as enzimas consigam acessar as cadeias de celulose e desestruturá-la, afetando diretamente os resultados da hidrólise enzimática.

5.3. PRÉ-TRATAMENTO COM LÍQUIDOS IÔNICOS TRIAZÓLICOS

Devido à limitação da quantidade disponível dos líquidos iônicos triazólicos, os pré-tratamentos foram realizados apenas na melhor condição avaliada para o líquido iônico comercial [Bmim][Ac]. Então as condições de pré-tratamento adotadas foram 120 °C por 120 min.

O líquido iônico acetato de 4-hidroximetil-3-propil-1-propil-1*H*-1,2,3-triazol (LI 117) seria estudado com o objetivo de comparar diretamente o efeito do cátion na eficiência de pré-tratamento, pois este apresenta o mesmo ânion acetato que o líquido iônico [Bmim][Ac], porém a síntese deste composto resultou em um reagente que não se mostrou na forma líquida a temperaturas inferiores a 120 °C, o que descaracterizaria a substância como um líquido iônico, além de impedir que o pré-tratamento fosse realizado.

Assim, os pré-tratamentos foram feitos com os líquidos iônicos iodeto de 4-hidroximetil-3-metil-1-propil-1*H*-1,2,3-triazol (LI 83), iodeto de 4-hidroximetil-3-metil-1-hexil-1*H*-1,2,3-triazol (LI 100) e brometo de 4-hidroximetil-3-propil-1-propil-1*H*-1,2,3-triazol (LI 112). O objetivo foi, portanto, analisar o potencial de desestruturação da biomassa lignocelulósica quando pré-tratada por esses líquidos iônicos e comparar a influência do tamanho da cadeia alquila ligada ao nitrogênio de posição 1 do cátion triazólico entre -propil e -hexil do LI 83 e LI 100, respectivamente. Além disso, um dos líquidos iônicos mais estudados na literatura para desestruturação da celulose é o cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio ([Bmim][Cl]). Portanto, o trabalho também teve o objetivo de estudar os íons brometo e iodeto, também pertencentes à série química dos halogênios, e comparar a influência do brometo como ânion do LI 112, no lugar do ânion iodeto do LI 83, ao mesmo tempo em que avaliou a influência da cadeia propil ou metil no terceiro nitrogênio do cátion.

5.3.1. Avaliação da composição química das amostras pré-tratadas com líquidos iônicos triazólicos

Na Tabela 5 encontram-se os resultados da composição química das biomassas pré-tratadas a 120 °C por 120 min por três líquidos iônicos triazólicos em comparação à biomassa *in natura*.

Tabela 5. Composição química, em base seca, do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratado com os líquidos iônicos triazólicos nas condições de 120 min a 120 °C.

Componentes	<i>In natura</i> (com extrativos)	<i>In natura</i> (livre de extrativos)	LI 83	LI 100	LI 112
Glucana	37,78 ± 0,66	40,27 ± 0,71	40,71 ± 2,86	38,71 ± 0,26	37,40 ± 0,07
Hemicelulose	25,22 ± 2,68	26,88 ± 1,85	22,06 ± 1,07	26,28 ± 0,96	13,83 ± 0,96
Lignina IA ^a	22,29 ± 0,74	23,75 ± 0,78	25,72 ± 0,39	23,80 ± nd	26,71 ± nd
Extrativos	6,18 ± 0,24	-	-	-	-
Cinzas totais	3,05 ± 0,61	3,25 ± 0,65	6,31 ± nd	4,58 ± nd	5,56 ± nd
Total	94,52	94,15	96,24	93,37	83,5

nd: valor não determinado; ^aInsolúvel em ácido

Através da análise da composição química, pode-se afirmar que a biomassa pré-tratada com o líquido iônico triazólico 83 apresentou redução do teor de hemicelulose, enquanto o LI 100 não se mostrou eficiente em alterar a composição do material. O LI 112 apresentou expressiva redução do teor de hemicelulose, com 13,83%, porém, seu balanço de massa total igual a 83,5% é muito inferior aos 94% da biomassa *in natura* livre de extrativos e sem contabilizar a lignina solúvel em ácido. É possível que o LI 112 tenha gerado uma maior desestruturação no material, de modo que durante o processo de caracterização, a ação do ácido sulfúrico tenha gerado um percentual de degradação maior do que aquele contabilizado pelos padrões de recuperação de açúcares. Para avaliar essa hipótese, será necessário quantificar a concentração de furfural nos hidrolisados dos procedimentos de caracterização dessa amostra.

Quanto à composição de glucana e lignina do material, como não foi realizado o estudo de perda mássica no pré-tratamento, não é possível afirmar que houve variação de suas composições.

5.3.2. Avaliação da hidrólise enzimática das amostras pré-tratadas com os líquidos iônicos triazólicos

A Figura 29 representa a quantidade de glicose liberada durante a hidrólise enzimática do bagaço *in natura* e pré-tratado pelos líquidos iônicos triazólicos. Os resultados de hidrólise da biomassa tratada pelo LI 83 não foram satisfatórios dado que o valor máximo de glicose alcançado foi de 11,9 g/100 g de biomassa, enquanto a hidrólise da biomassa *in natura* tem valor máximo de 8,5 g de glicose/100 g de biomassa. Carmo *et al.* (2014) sintetizou o LI 83 e avaliou ação deste líquido iônico no bagaço de cana-de-açúcar através de imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de forma qualitativa, concluindo que fibras da biomassa lignocelulósica ficavam mais expostas. A partir dessa observação, o LI 83 foi indicado como um potencial solvente para o pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar, devido à possibilidade de aumentar a acessibilidade das enzimas, porém foi visto no presente trabalho que esse líquido iônico não consegue favorecer a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. Dessa forma, é importante ressaltar que imagens de MEV, que visem avaliar a morfologia de biomassas pré-tratadas, são auxiliares para a discussão do efeito do pré-tratamento e devem ser sempre interpretadas em conjunto com resultados de hidrólise enzimática.

O mesmo acontece com a biomassa pré-tratada pelo LI 100, que apresentou valores de rendimento de hidrólise de 25,3% (10,5 g de glicose/ 100 g de biomassa). Em contrapartida, o uso do LI 112 se destacou por favorecer altos rendimentos, resultando em amostras pré-tratadas que chegaram a 98,7% de conversão de glucana em glicose em 24 h de hidrólise enzimática. Além da rápida cinética enzimática, que resultou em rendimento de conversão em glicose de 75,8% em 4 h de hidrólise e 36 g de glicose/100 g de biomassa em 6 h de reação enzimática.

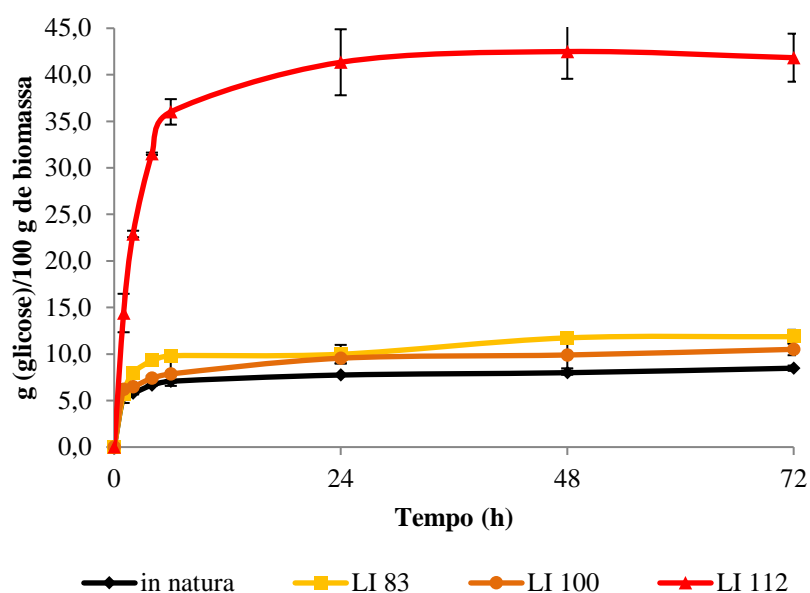


Figura 28. Concentração mássica de glicose liberada durante a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratados com iodeto de 4-hidroxi-3-metil-1-propil-1*H*-1,2,3-triazol (LI 83), iodeto de 4-hidroxi-3-metil-1-hexil-1*H*-1,2,3-triazol (LI 100) e brometo de 4-hidroxi-3-propil-1*H*-1,2,3-triazol (LI 112).

Ainda que os valores da hidrólise enzimática sejam baixos para as biomassas tratadas pelo LI 83 e o LI 100, pode-se perceber que o bagaço pré-tratado pelo LI 100 tem rendimento inferior ao bagaço pré-tratado com o LI 83. O LI 100 apresenta radical hexil enquanto o LI 83 tem o radical propil, podendo-se concluir que o aumento da cadeia alquil interfere negativamente também na eficiência dos cátions triazólicos, assim como reportado por Zhao *et al.* (2012) para os líquidos iônicos imidazólicos. Ainda, ao se comparar estes líquidos iônicos com o LI 112, percebe-se que há grande diferença na eficiência dos mesmos. Isso indica que o ânion brometo torna o líquido iônico mais eficiente do que o íon iodeto, provavelmente pelo brometo ter maior eletronegatividade e conseguir desfazer mais facilmente a rede de ligações de hidrogênio da celulose. Também se deve considerar a mudança na estrutura do cátion do LI 112 que carrega o radical propil no nitrogênio 3, no lugar do radical metil nesta posição nos LI 83 e LI 100, porém, como é sabido que o aumento da cadeia torna o líquido iônico menos eficiente, é provável que a alteração do ânion é que tenha influência significativa na ação do líquido iônico. Seria interessante avaliar também o líquido iônico brometo de 4-hidroxi-3-metil-1-propil-1*H*-1,2,3-triazol para comparar a influência do tamanho da cadeia do radical do nitrogênio 3, a fim de analisar se esta mudança melhoraria a cinética de hidrólise ao bagaço pré-tratado com líquido iônico triazólico.

5.3.3. Avaliação da cristalinidade das amostras pré-tratadas com os líquidos iônicos triazólicos

O perfil de difração de raios-X das biomassas *in natura* e pré-tratadas com os líquidos iônicos triazólicos encontram-se na Figura 30. É possível observar que o LI 83 não alterou a cristalinidade da biomassa, pois seu perfil é parecido ao perfil da *in natura*, assim como o LI 100 que parece apenas ter diminuído levemente a intensidade de difração nos planos (1,0,1) e (1,0,-1). Esta baixa atuação na redução da cristalinidade da celulose justifica os baixos rendimentos de hidrólise dessas biomassas, uma vez que a desestruturação não aconteceu e dificultou a ação enzimática. Por outro lado, o LI 112 resultou na redução de intensidade das duas raias de difração, mostrando alteração nos planos cristalinos. Este líquido iônico, então, consegue alterar a cristalinidade da celulose presente no bagaço de cana-de-açúcar e essa ação propicia os altos rendimentos de conversão em glicose durante a hidrólise enzimática, pois permite que as enzimas consigam atuar de maneira facilitada nas cadeias de celulose.

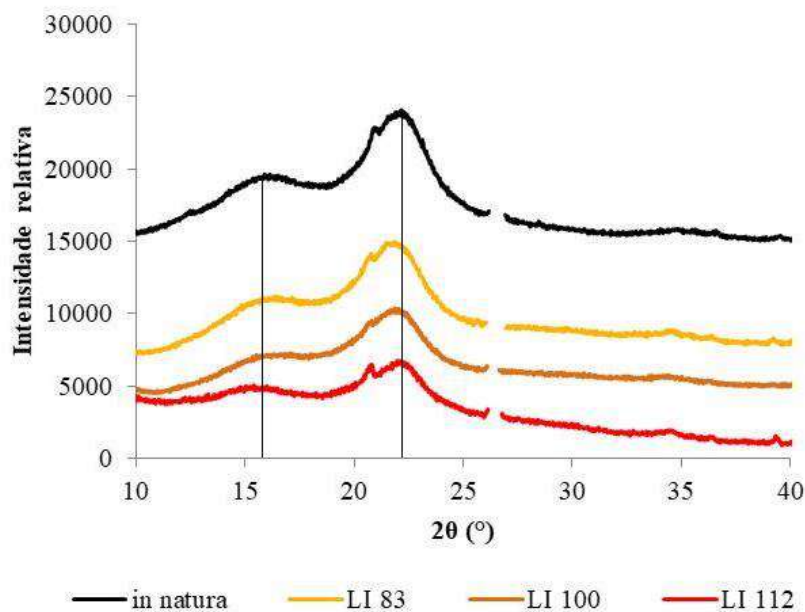


Figura 29. Perfil de difração de raios-X do bagaço *in natura* e pré-tratado com iodeto de 4-hidroximetil-3-metil-1-propil-1*H*-1,2,3-triazol (LI 83), iodeto de 4-hidroximetil-3-metil-1-hexil-1*H*-1,2,3-triazol (LI 100) e brometo de 4-hidroximetil-3-propil-1-propil-1*H*-1,2,3-triazol (LI 112).

Com base nesses resultados, o líquido iônico brometo de 4-hidroximetil-3-propil-1-propil-1*H*-1,2,3-triazol (LI 112) foi selecionado para ser comparado ao líquido iônico [Bmim][Ac] e ao pré-tratamento hidrotérmico.

5.4. COMPARAÇÃO ENTRE OS PRÉ-TRATAMENTOS PROMISSORES

Esta parte do trabalho teve como objetivo avaliar o potencial dos líquidos iônicos frente a um método de pré-tratamento já aplicado em plantas de produção de etanol celulósico em escala de demonstração ou industriais.

5.4.1. Avaliação da composição química das amostras pré-tratadas

A Tabela 6 apresenta a composição química do bagaço pré-tratamento hidrotermicamente, em comparação a das biomassas pré-tratadas com líquidos iônicos estudados nesse trabalho.

O pré-tratamento hidrotérmico é reportado na literatura com a ação de despolimerizar a hemicelulose presente na biomassa lignocelulósica, restando a celulose na porção sólida, o que aumenta o teor de celulose no material. A lignina neste pré-tratamento sofre reações de despolimerização e repolimerização e sua maior parte insolúvel fica retida na parte sólida também, o que pode prejudicar a ação enzimática, tanto pela barreira física, quanto pela adsorção não produtiva das enzimas (ZHUANG, 2016). Pode-se observar que a composição química do bagaço pré-tratado hidrotermicamente reflete esta característica, demonstrando a remoção da hemicelulose do material que, conseqüentemente, aumenta o teor de celulose e lignina do material. O alto teor de cinzas deste material deve-se ao fato desta amostra vir de uma planta de demonstração em grande escala (INBICON) e, por isso, apresentar alto teor de impurezas

Tabela 6. Composição química, em base seca, do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com o líquido iônico [Bmim][Ac], LI 112 e pré-tratado hidrotermicamente.

Componentes	<i>In natura</i>	<i>In natura</i>	[Bmim][Ac]	LI 112	Hidrotérmico
	(com extrativos)	(livre de extrativos)			
Glucana	37,78 ± 0,66	40,27 ± 0,71	42,15 ± 1,94	37,40 ± 0,07	45,85 ± 2,22
Hemicelulose	25,22 ± 2,68	26,88 ± 1,85	26,24 ± 1,55	13,83 ± 0,96	1,80 ± 0,08
Lignina IA ^a	22,29 ± 0,74	23,75 ± 0,78	18,22 ± 3,61	26,71 ± nd	31,70 ± 0,49
Extrativos	6,18 ± 0,24	-	-	-	-
Cinzas totais	3,05 ± 0,61	3,25 ± 0,65	3,32 ± nd	5,56 ± nd	16,37 ± 3,53
Total	94,52	94,15	89,93	83,5	95,72

nd: valor não determinado; ^aInsolúvel em ácido

5.4.2. Avaliação da hidrólise enzimática das amostras pré-tratadas

Os dados de hidrólise enzimática nos permitem avaliar a disponibilidade da biomassa à ação enzimática. Na Figura 31, é possível notar que a hidrólise enzimática das biomassas que passaram pelos três diferentes pré-tratamentos apresentaram elevadas concentrações de glicose. A biomassa pré-tratada hidrotermicamente, porém, apresenta cinética de hidrólise mais lenta, obtendo valores de 37,4 g de glicose/100 g de biomassa a partir de 24 horas e chegando à concentração máxima de 45,9 g de glicose/100 g de biomassa em 72 h de hidrólise. Enquanto isso, as biomassas pré-tratadas com os líquidos iônicos apresentam suas concentrações máximas em 24 h de hidrólise, equivalentes a 36,0 g de glicose/100 g de biomassa e 41,3 g de glicose/100 g de biomassa com 6 horas de hidrólise enzimática quando pré-tratadas com o LI 112 e o [Bmim][Ac], respectivamente. No mesmo tempo de hidrólise enzimática, a concentração de glicose da biomassa pré-tratada hidrotermicamente foi de 21,1 g/100 g de biomassa.

É importante também analisar o rendimento de hidrólise enzimática, pois apesar da biomassa pré-tratada com [Bmim][Ac] resultar em maior concentração de glicose nas primeiras horas, sua composição química apresenta maior teor de glucana do que o bagaço pré-tratado com LI 112. Ao analisar os rendimentos de conversão em glicose nesses dois materiais pré-tratados, vemos que ambos são muito semelhantes, próximos a 99% em 24 horas de hidrólise. Ainda, apesar do bagaço pré-tratado hidrotermicamente apresentar em 72 h de hidrólise enzimática, 45,9 g de glicose/100 g de biomassa, valor este que é próximo aos das hidrólises dos bagaços pré-tratados com líquido iônico, o rendimento máximo alcançado é de 88,5%, dado o alto teor de glucana neste material. Portanto, líquidos iônicos mostram-se mais eficientes do que o pré-tratamento hidrotérmico no que diz respeito a facilitar a digestibilidade enzimática e melhorar a cinética de hidrólise, necessitando de menos tempo para atingir a concentração obtida no pré-tratamento hidrotérmico.

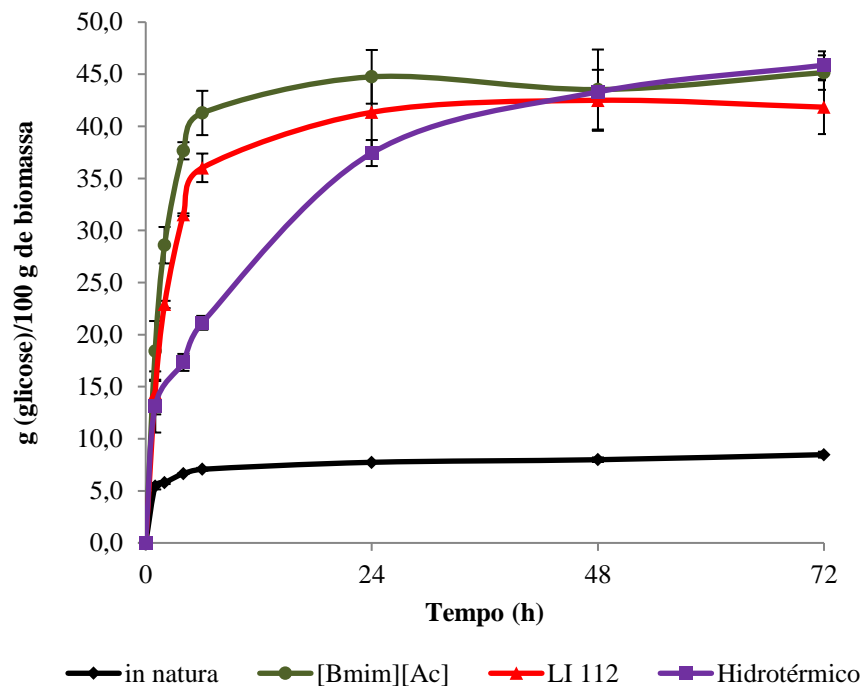


Figura 30. Concentração mássica de glicose liberada durante a hidrólise enzimática de 100 g de bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratado com [Bmim][Ac], brometo de 4-hidroxi metil-3-propil-1-propil-1H-1,2,3-triazol (LI 112) e pré-tratado hidrotérmicamente.

5.4.3. Avaliação da morfologia das biomassas pré-tratadas

Para complementar os resultados de hidrólise enzimática, foram observadas as alterações na morfologia do bagaço de cana-de-açúcar provocadas pelos pré-tratamentos. As biomassas foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG) de alta resolução com aumento de 50.000 vezes para as biomassas *in natura*, pré-tratadas hidrotérmicamente e com o LI 112, e com aumento de 70.000 vezes da biomassa pré-tratada com [Bmim][Ac] (Figura 32). A Figura 32a é dada como referência por ser a biomassa *in natura*, que não recebeu nenhum pré-tratamento e, portanto, tem sua estrutura inalterada. A Figura 32b corresponde à ação do LI 112, na qual é visto que este solvente consegue provocar expressivas alterações na estrutura lignocelulósica conseguindo desconstruí-la, bem como o [Bmim][Ac] (Figura 32c). Estas observações, ainda que qualitativas, vão ao encontro dos resultados obtidos tanto na análise da cristalinidade, onde atestou-se aumento da desorganização das cadeias de celulose, quanto da hidrólise enzimática. Conclui-se, então, que estes dois líquidos iônicos mostram-se eficientes na desestruturação da biomassa lignocelulósica, conseguem alterar a cristalinidade das cadeias de celulose e assim facilitar a digestão enzimática das celulasas durante a etapa de hidrólise, aumentando os rendimentos de

conversão de açúcares. Já a biomassa pré-tratada hidrotêrmicamente (Figura 32d), em consenso com as informações de composição química, demonstra que houve mudança na morfologia da biomassa, havendo uma forma de desconstrução da parede celular, porém não ocorreu de forma tão significativa quanto nas amostras pré-tratadas com líquido iônico, provavelmente devido à baixa remoção da lignina.

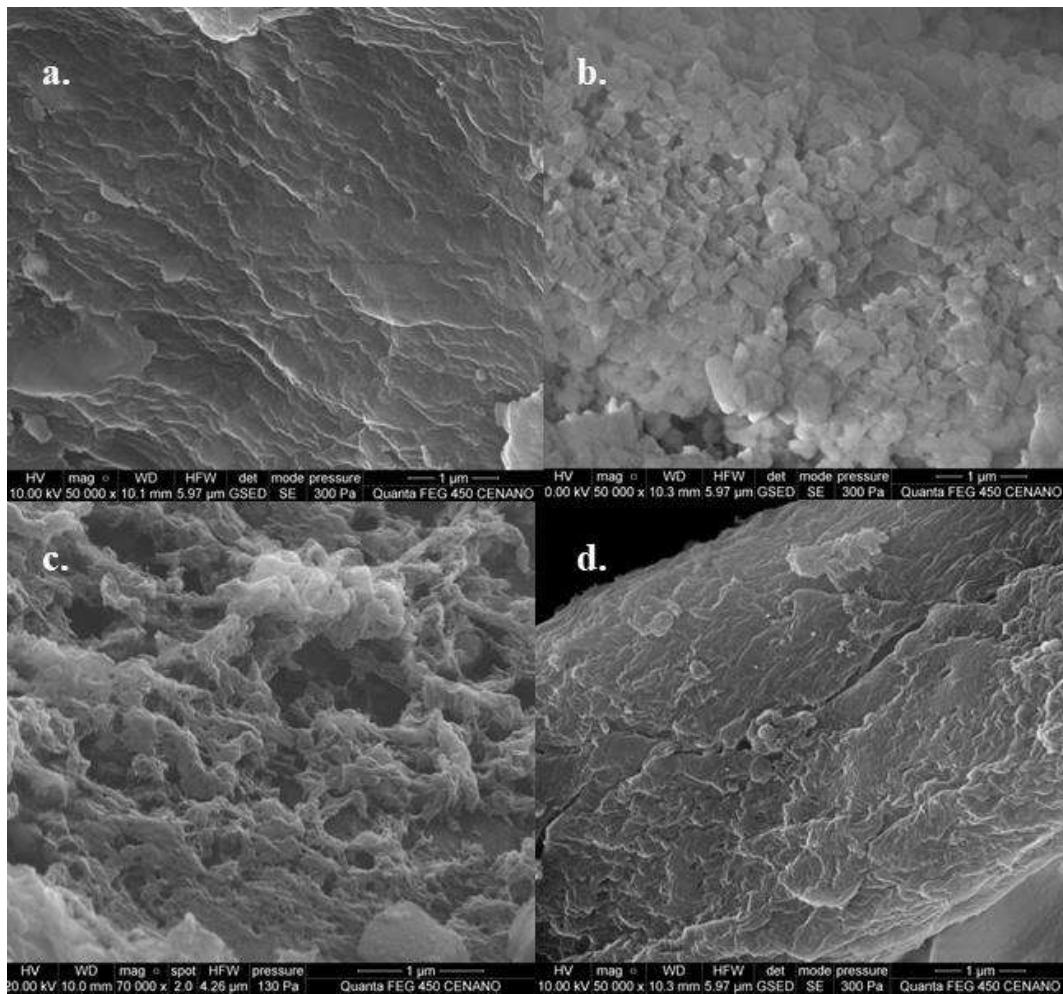


Figura 31. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura do bagaço de cana-de-açúcar. (a) *in natura* (b) brometo de 4-hidroximetil-3-propil-1-propil-1H-1,2,3-triazol (LI 112) (c) acetato de 1-butil-3-metil-imidazólio ([Bmim][Ac]) (d) hidrotêrmico

6. CONCLUSÃO

O líquido iônico acetato de 1-butil-3-etil-imidazólio ([Bmim][Ac]) utilizado neste trabalho mostrou-se um eficiente solvente imidazólico para a desestruturação da biomassa lignocelulósica, com resultados semelhantes aos já reportados na literatura para líquidos iônicos deste tipo. O [Bmim][Ac] atua no pré-tratamento removendo parcialmente a lignina e diminuindo a cristalinidade da biomassa. Quando estudadas as melhores condições de pré-tratamento, este líquido iônico promove o máximo de rendimento de hidrólise enzimática já com 60 minutos de pré-tratamento a 120 °C, após 24 h de hidrólise. Quando pré-tratada por 120 minutos, a biomassa tem sua cinética de hidrólise melhorada e apresenta concentrações de glicose de 41,3 g de glicose/100 g de biomassa em 6 h de hidrólise enzimática.

O pré-tratamento com os líquidos iônicos triazólicos se deu a 120 °C por 120 minutos e concluiu-se que o ânion iodeto não tem boa eficiência em desfazer as redes de ligações de hidrogênio da cadeia celulósica, mantendo sua estrutura cristalina, assim como não consegue remover a lignina. Portanto, as biomassas pré-tratadas com os líquidos iônicos iodeto de 4-hidroximetil-3-metil-1-propil-1*H*-1,2,3-triazol (LI 83) e iodeto de 4-hidroximetil-3-metil-1-hexil-1*H*-1,2,3-triazol (LI 100) conseguiram disponibilizar pouca glicose durante a hidrólise enzimática, apresentando valores próximos à biomassa *in natura* e, por isso, não são indicados para pré-tratamento de biomassas lignocelulósicas.

Por outro lado, a biomassa pré-tratada com o líquido iônico brometo de 4-hidroximetil-3-propil-1-propil-1*H*-1,2,3-triazol (LI 112) alcançou cerca de 99% de conversão de glucana em glicose em 24 h de hidrólise enzimática. Resultado este que pode ser explicado pela capacidade desse líquido iônico em alterar a morfologia da estrutura lignocelulósica como observado pelas imagens geradas por MEV-FEG, além da aparente diminuição do teor de hemicelulose em sua composição e diminuição da cristalinidade do material.

Quanto ao pré-tratamento hidrotérmico, nota-se que a biomassa que passou por este pré-tratamento apresentou concentrações altas de 45,9 g de glicose/100 g de biomassa durante a hidrólise enzimática, com rendimentos de 88,5% em 72 h de hidrólise. Porém, a hidrólise enzimática das biomassas pré-tratadas com líquidos iônicos apresentou cinética mais rápida, apresentando concentrações semelhantes a essa já em 6 h de reação. Ainda, conseguiu rendimentos de conversão em glicose próximos a 99%.

Desta forma, ainda que a tecnologia de pré-tratamento com líquidos iônicos apresente gargalos em relação ao custo, consumo de água, recuperação dos líquidos iônicos e biodegradabilidade, estes se mostraram promissores para o pré-tratamento de biomassas lignocelulósicas, uma vez que apresentam rendimentos de hidrólise superiores a outro pré-

tratamento já mais desenvolvido neste campo em poucas horas de reação. Por isso, conclui-se que a aplicação de líquidos iônicos para a desestruturação biomassa lignocelulósica é um campo de estudo com grande potencial, porém que ainda requer investigações cada vez mais detalhadas a fim de viabilizar a sua utilização em maior escala.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADNEY, B.; BAKER, J. Measurement of Cellulase Activities. **Laboratory Analytical Procedure (LAP) NREL**, 2008. p. 8. NREL/TP-510-42628.

AITA, G.M. KIM, M. Pretreatment technologies for the conversion of lignocellulosic materials to bioethanol. In: EGGLESTON, G. **Sustainability of the Sugar and Sugar-Ethanol Industries**. American Chemical Society, 2010. v. 1058, p. 117–145.

AKHTAR, N. *et al.* Biodiversity of cellulase producing bacteria and their applications. **Cellulose chemistry and technology**, 2016. v. 50, n. 9–10, p. 983–995.

AKIBA, S. *et al.* Purification and characterization of a protease-resistant cellulase from *Aspergillus niger*. **Journal of fermentation and bioengineering**, 1995. v. 79, n. 2, p. 125–130.

ALCARDE, A. R. Agência Embrapa de Informação Tecnológica. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_108_22122006154841.html>. Acesso em: 14 ago. 2017, 16:20:00.

ALVES, R. E. **Caracterização de fibras lignocelulósicas pré-tratadas por meio de técnicas espectroscópicas e microscópicas ópticas de alta resolução**. Tese de mestrado. Universidade de São Paulo, Escola de engenharia de São Paulo, São Paulo, 2011.

ALVIRA, P. *et al.* Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource technology**, 2010. v. 101, n. 13, p. 4851–4861.

AMARASEKARA, A. S. Acidic Ionic Liquids. **Chem. Rev.** 2016. v. 116, n. 10, p. 6133–6183.

ANASTAS, P. T. WARNER, J. C. (Ed.). **Green chemistry: theory and practice**. New York: Oxford University Press, 1998.

ANP, **Boletim do Etanol**, n. 9, fev. 2017.

ARANTES, V. SADDLER, J. N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for biofuels**, 2010. v. 3, n. 1, p. 4.

ATALLA, R. H. ISOGAI, A. Celluloses. In: LIU H-W. MANDER L. **Comprehensive natural products II**. Oxford: Elsevier, 2010. p. 493–539.

AVELLAR, B. K. GLASSER, W. G. Steam-assisted biomass fractionation. I. Process

considerations and economic evaluation. **Biomass and Bioenergy**, 1998. v. 14, n. 3, p. 205–218.

BADGUJAR, K. C. BHANAGE, B. M. Factors governing dissolution process of lignocellulosic biomass in ionic liquid: Current status, overview and challenges. **Bioresource Technology**, 2015. v. 178, p. 2–18.

BAJAY, S. V. CARVALHO, E. B. FERREIRA, A. L. Energy from biomass in Brazil. In: FRANK ROSILLO-CALLE, F. BAJAY, S. V. ROTHMAN, H. **Industrial Uses of Biomass Energy: The Example of Brazil**. 1 ed. CRC Press, 2000. cap. 2.

BAUGH, K. D. MCCARTY, P. L. Thermochemical pretreatment of lignocellulose to enhance methane fermentation: I. Monosaccharide and furfurals hydrothermal decomposition and product formation rates. **Biotechnology and Bioengineering**, 1988. v. 31, n. 1, p. 50–61.

BHARDWAJ, V. DEGRASSI, G. BHARDWAJ, R. K. Bioconversion of cellulosic materials by the action of microbial cellulases. **International research journal of engineering and technology (IRJET)**, 2017. v. 4, n. 8, p. 494–503.

BHAT, M. K. BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnology advances**, 1997. v. 15, n. 3/4, p. 583–620.

BHOWMICK, G. SARMAH, A. K. SEN, R. Lignocellulosic biorefinery as a model for sustainable development of biofuels and value added products. **Bioresource technology**, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.163>>.

BIOENERGY, IEA. Task 42 Biorefining. **Biomass and bioenergy**, 2014.3950084703.

BOZELL, J. J. PETERSEN, G. R. Technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates—the US Department of Energy’s “Top 10” revisited. **Green Chemistry**, 2010. v. 12, n. 4, p. 525–728.

BRANDT, A. *et al.* Structural changes in lignins isolated using an acidic ionic liquid water mixture. **Green Chemistry**, 2015. v. 17, p. 5019–5034.

BRETHAUER, S. WYMAN, C. E. Review: Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. **Bioresource technology**, 2010. v. 101, n. 13, p. 4862–4874.

BRUNDTLAND, G. M. Report of the world commission on environment and development: Our common future. **ONU**. 1987.

BUDZIANOWSKI, W. M. Negative carbon intensity of renewable energy technologies involving biomass or carbon dioxide as inputs. **Renewable and sustainable energy reviews**, 2012. v. 16, n. 9, p. 6507–6521.

BUDZIANOWSKI, W. M. High-value low-volume bioproducts coupled to bioenergies with potential to enhance business development of sustainable biorefineries. **Renewable and sustainable energy reviews**, 2016. v. 70, p. 793-804.

CARMO, A. M. L. *et al.* Synthesis of 1,2,3-triazolium-based ionic liquid and preliminary pretreatment to enhance hydrolysis of sugarcane bagasse. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2014. v. 25, n. 11, p. 2088–2093.

CARVALHO, W. *et al.* Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Química Nova**, 2009. v. 32, n. 8, p. 2191–2195.

CASTRO, A. M. PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química nova**, 2010. v. 33, n. 1, p. 181–188.

CEPEA (CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA), Esalq/USP SUCRO/CEPEA. **Preços médios reais da safra 2016/17 superam os da anterior**. Disponível em: <<https://www.cepea.esalq.usp.br/br/releases/sucro-cepea-precos-medios-reais-da-safra-2016-17-superam-os-da-anterior.aspx>>. Acesso em: 24 nov. 2017, 21:10:00.

CERQUEIRA, D. A. FILHO, G. R. MEIRELES, C. S. Optimization of sugarcane bagasse cellulose acetylation. **Carbohydrate polymers**, 2007. v. 69, n. 3, p. 579–582.

CONAB (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO). **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**. v. 4 - Safra 2017/18, n. 1 - Primeiro levantamento. Brasília, 2017. p. 1-57. ISSN: 2318-7921.

DADI, A. P. VARANASI, S. SCHALL, C. A. Enhancement of Cellulose Saccharification Kinetics Using an Ionic Liquid Pretreatment Step. **Biotechnol Bioeng**, 2006. v. 95, n. 5, p. 904–10.

DUFRENSE, A. Nanocellulose - Potential reinforcement in composites. In: JOHN, M. J. SABU, T. (Ed.). **Natural Polymers**, Vol. 2: Natural Polymer Nanocomposites. Londres: RSC Publishing, 2012, p. 1-33.

DWIVEDI, P. ALAVALAPATI, J. R. R. LAL, P. Cellulosic ethanol production in the United States: Conversion technologies, current production status, economics, and emerging

developments. **Energy for sustainable development**, 2009. v. 13, n. 3, p. 174–182.

EARLE, M. J. SEDDON, K. R. Ionic liquids. Green solvents for the future. **Pure and Applied Chemistry**, 2000. v. 7, p. 1391-1398.

ELGHARBAWY, A. A. *et al.* Ionic liquid pretreatment as emerging approaches for enhanced enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Biochemical Engineering Journal**, 2016. 252-267 p. 109 v.

EWANICK, S. BURA, R. The effect of biomass moisture content on bioethanol yields from steam pretreated switchgrass and sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, 2011. v. 102, n. 3, p. 2651–2658.

FAN, L. GHARPURAY, M. M. LEE, Y. **Cellulose hydrolysis**. Springer-Verlag, New York, 1987.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS). Disponível em: < <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em: 14 ago. 2017, 13:25:00.

FARACO, V. HADAR, Y. The potential of lignocellulosic ethanol production in the Mediterranean Basin. **Renewable and sustainable energy reviews**, 2011. v. 15, n. 1, p. 252–266.

FARONE, W. A. CUZENS, J. E. **Strong acid hydrolysis of cellulosic and hemicellulosic materials**. U.S. Patent No. 5597714 A. jan. 1997.

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

FU, D. MAZZA, G. Optimization of processing conditions for the pretreatment of wheat straw using aqueous ionic liquid. **Bioresource Technology**, 2011. v. 102, n. 17, p. 8003–8010.

GÍRIO, F. M. *et al.* Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource technology**, 2010. v. 101, n. 13, p. 4775–4800.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, 1987. v. 59, n. 2, p. 257–268.

HAMELINCK, C. N. HOOIJDONK, G. V. FAAIJ, A. P. C. Ethanol from lignocellulosic biomass: Techno-economic performance in short-, middle- and long-term. **Biomass and Bioenergy**, 2005. v. 28, n. 4, p. 384–410.

HARUN, S. *et al.*, Performance of AFEX™ pretreated rice straw as source of fermentable sugars: the influence of particle size. **Biotechnology biofuels**, 2013. v. 6, p. 40.

HASHMI, M. *et al.* Comparison of autohydrolysis and ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium acetate pretreatment to enhance enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, 2017. v. 224, p. 714–720.

HATTI-KAUL, R. *et al.* Industrial biotechnology for the production of bio-based chemicals - a cradle-to-grave perspective. **Trends in biotechnology**, 2007. v. 25, n. 3, p. 119–124.

HELLSMARK, H. SÖDERHOLM, P. Innovation policies for advanced biorefinery development: key considerations and lessons from Sweden. **Biofuels, bioproducts and biorefining**, 2017. v. 11, n. 1, p. 28–40.

HOLLADAY, J. E. BOZELL, J. J. WHITE, J. F. JOHNSON, D. **Top Value-Added Chemicals from Biomass: Volume II—Results of Screening for Potential Candidates from Biorefinery Lignin**. Pacific Northwest National Laboratory, United States Department of Energy, 2007. PNNL-16983.

HUANG, K. *et al.* Recycling and reuse of ionic liquid in homogeneous cellulose acetylation. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, 2013. v. 21, n. 5, p. 577–584.

HUANG, X. P. MONK, C. Purification and characterization of a cellulase (CMCase) from a newly isolated thermophilic aerobic bacterium *Caldibacillus cellulovorans* gen. nov., sp. nov. **World journal of microbiology and biotechnology**, 2004. v. 20, n. 1, p. 85–92.

INTERNATIONAL ENERGY OUTLOOK 2016. Report Number: DOE/EIA-0484

JEONG, S. LEE, J. Alkaline pretreatment. In: PANDEY, A. BINOD, P. NEGI, S. **Pretreatment of biomass: Process and technologies**. 1 ed. Elsevier, 2015. cap. 5, p. 61.

KAMM, B. GRUBER, P. R. KAMM, M. **Biorefineries - Industrial processes and products: status quo and future directions**. 1 ed. Wiley-VCH, 2010. v. 1, p. 949.

KIM, T. H. Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: YANG, S. EL-ENSHASY, H. A. THONGCHUL, N. (Eds.). **Bioprocessing technologies in biorefinery for sustainable**

production of fuels, chemicals, and polymers. John Wiley & Sons Inc., New Jersey, 2013.

KLEIN-MARCUSCHAMER, D. SIMMONS, B. A. BLANCH, H. W. Techno-economic analysis of a lignocellulosic ethanol biorefinery with ionic liquid pre-treatment. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, 2011. v. 5, n. 5, p. 562–569.

KOLB, H. C. Finn, M. G. Sharpless, K. B. **Angewandte Chemie International Edition**, 2001. v. 40, p. 2004-2021.

KONDA, N. *et al.* Understanding cost drivers and economic potential of two variants of ionic liquid pretreatment for cellulosic biofuel production. **Biotechnology for Biofuels**, 2014. v. 7, n. 1, p. 86.

KUMAR, P. *et al.* Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, 2009. v. 48, n. 8, p. 3713–3729.

LEE, J. *et al.* Biological pretreatment of softwood *Pinus densiflora* by three white rot fungi. **Journal of microbiology**, Seoul, Korea, 2007. v. 45, n. 6, p. 485–491.

LEE, S. H. *et al.* Ionic liquid-mediated selective extraction of lignin from wood leading to enhanced enzymatic cellulose hydrolysis. **Biotechnology and BioEngineering**, 2009. v. 102, p. 1368-1376.

LEWIN, M. GOLDSTEIN, I. S. **Wood structure and composition.** New York, Marcel Dekker, 1991. p. 488.

LI, Q. *et al.* Improving enzymatic hydrolysis of wheat straw using ionic liquid 1-ethyl-3-methyl imidazolium diethyl phosphate pretreatment. **Bioresource Technology** v. 100, n. 14, p. 3570–3575, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.02.040>>.

LIGNOWORKS, What is Lignin? <Disponível em <http://www.icfar.ca/lignoworks/content/what-lignin.html>> . Acesso em 26 nov. 2017, 14:00.

LYND, L. R. *et al.* Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Bioresource Technology**, 2002. v. 66, n. 3, p. 506–577.

MARAFON, A. C. **Análise quantitativa de crescimento em cana-de-açúcar: uma introdução ao procedimento prático**. Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju/SE, 2012. ISSN 1678-1953.

MACFARLANE, D. R. *et al.* Energy applications of ionic liquids. **Energy & Environmental Science**, 2014. v. 7, n. 1, p. 232–250.

MCMILLAN, J. D. Pretreatment of lignocellulosic biomass. **Conversion of Hemicellulose Hydrolyzates to Ethanol**, 1994. p. 292–324.

MIGUEZ, I. S. *et al.* Uso de líquidos iônicos 1,2,3-triazólicos não comerciais para o pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar. **Seminário brasileiro de tecnologia enzimática, ENZITEC**, 2016.

MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. **RenovaBio**. Disponível em: <<http://www.mme.gov.br/web/guest/secretarias/petroleo-gas-natural-e-combustiveis-renovaveis/programas/renovabio/principal>>. Acesso em: 24 nov. 2017, 22:35:00.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Efeito Estufa e Aquecimento Global**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/informma/item/195-efeito-estufa-e-aquecimento-global>>. Acesso em 11 dez. 2017, 17:04:49.

MISTO BRASÍLIA. **Governo libera plantio de cana-de-açúcar transgênica**. Disponível em: <<http://www.mistobrasilia.com.br/noticia-4656-Governo-libera-plantio-de-cana-de-a%C3%A7%C3%ACar-transg%C3%AAnica>>. Acesso em: 13 set. 2017, 14:35:00.

MORJANOFF, P. J. GRAY, P. P. Optimization of steam explosion as a method for increasing susceptibility of sugarcane bagasse to enzymatic saccharification. **Biotechnology and bioengineering** v. 29, n. 6, p. 733–741, 1987.1097-0290.

MORO, M. K. *et al.* Continuous pretreatment of sugarcane biomass using a twin-screw extruder. **Industrial crops and products**, 2017. v. 97, p. 509-517.

MOSIER, N. *et al.* Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover. **Bioresource technology** v. 96, n. 18 SPEC. ISS., p. 1986–1993, 2005.0960-8524.

NARODOSLAWSKY, M. Chemical engineering in a sustainable economy. **Chemical engineering research and design**, 2013. v. 1, p. 2021–2028.

NINOMIYA, K. *et al.* Saccharification and ethanol fermentation from cholinium ionic liquid-pretreated bagasse with a different number of post-pretreatment washings. **Bioresource Technology**, 2015. v. 189, p. 203–209. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.022>>.

NOVA CANA, Segunda usina de etanol de milho a ser construída em MT deve custar R\$ 500 milhões, Disponível em: <<https://www.novacana.com/https://www.novacana.com/n/industria/investimento/usina-etanol-milho-construida-mt-r-500-milhoes-101117/>>. Acesso em: 24 nov. 2017, 09:35:00a.

NOVA CANA, Usinas brasileiras avaliam planta que opera com cana e milho para ampliar ciclo de produção, endereço eletrônico Disponível em: <<https://www.novacana.com/https://www.novacana.com/n/etanol/alternativas/usinas-brasileiras-planta-opera-cana-milho-ampliar-ciclo-producao-091117/>>. Acesso em: 24 nov. 2017, 09:55:00b.

NOVA CANA, Em Mato Grosso, etanol vira alternativa para o milho, endereço eletrônico Disponível em: <<https://www.novacana.com/https://www.novacana.com/n/etanol/alternativas/mato-grosso-etanol-alternativa-milho-061117/>>. Acesso em: 24 nov. 2017, 10:10:00c.

NOVA CANA, As perspectivas para as safras 2017/18 e 2018/19 e para o mercado; Endereço eletrônico Disponível em: <<https://www.novacana.com/n/eventos/perspectivas-safras-2017-18-2018-19-mercado-130917/>>. Acesso em: 24 nov. 2017, 10:25:00d.

OCHOA-VILLARREAL, M. *et al.* Plant Cell Wall Polymers: Function, Structure and Biological Activity of Their Derivatives. In: GOMES, A. S. **Polymerization**. 1 ed, INTECH, 2012. cap. 4.

O'HARA, I. M. The sugarcane industry, biofuel and bioproduct perspectives. In: O'HARA, I. M. MUNDREE, S. G. **Sugarcane-based biofuels and bioproducts**. 1 ed. Wiley-Blackwell, 2016. cap. 1, p. 3-22.

PALMQVIST, E. HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, 2000. v. 74, n. 1, p. 25–33.

PANDE, M. BHASKARWAR, A. N. Biomass conversion to energy. In: BASKAR, C. BASKAR, S. DHILLON, R. S. **Biomass conversion: The interface of biotechnology, chemistry and materials science**. Springer, 2012. cap. 1, p. 1-88.

PARADA M. P. OSSEWEIJER, P. DUQUE, J. A. P. Sustainable biorefineries, an analysis of practices for incorporating sustainability in biorefinery design. **Industrial crops and products**, 2017. v. 106, p. 105–123.

PASSOS, H. FREIRE, M. G. COUTINHO, J. A. P. Ionic liquids solutions as extractive solvents of value-added compounds from biomass. **Green Chemistry**, 2014. v. 16, p. 4786–4815.

PAYAL, R. S. *et al.* Dissolution of cellulose in room temperature ionic liquids: Anion dependence. **Journal of Physical Chemistry**, 2015, v. 119, n. 4, p. 1654–1659.

PAYAL, R. S. BALASUBRAMANIAN, S. Dissolution of cellulose in ionic liquids: an ab initio molecular dynamics simulation study. **Physical Chemistry Chemical Physics**, 2014. v. 16, p. 17458–17465.

PENG, F. *et al.* Comparative study of hemicelluloses obtained by graded ethanol precipitation from sugarcane bagasse. **Journal of agricultural and food chemistry**, 2009. v. 57, n. 14, p. 6305–6317.

PEREIRA JR, N. COUTO, M.A.P.G. SANTA ANNA, L.M.M. Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery. In: **Series on Biotechnology**, Amiga Digital UFRJ, Rio de Janeiro, 2008. v. 2, p. 45.

PETTERSEN, R. C. The chemical composition of wood. In: ROWELL, R. **The chemistry of solid wood**. American Chemical Society, 1984. v. 207, cap. 2, p. 57-126.

PHILP, J. The bioeconomy, the challenge of the century for policy makers. **New biotechnology**, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2017.04.004>>.18716784 (ISSN).

PU, Y. JIANG, N. RAGAUSKAS, A. J. Ionic liquid as a green solvent for lignin. **Journal of Wood Chemistry and Technology** v. 27, n. 1, p. 23–33.

RAJ, T. *et al.* Ionic liquid pretreatment of biomass for sugars production: Driving factors with a plausible mechanism for higher enzymatic digestibility. **Carbohydrate Polymers**, 2016. v. 149, p. 369–381. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.04.129>>.

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

ROCHA, J. D. Plataforma termoquímica. In: VAZ JR, S. **Biomassa para química verde**. 1 ed. Embrapa Agroenergia, Brasília, 2013. cap. 6, p. 139-165.

ROCHA, G. J. M. *et al.* Influence of mixed sugarcane bagasse samples evaluated by elemental and physical-chemical composition. **Industrial Crops and Products**, 2015. v. 64, p. 52–58.

ROCHA-MARTÍN, J. *et al.* Additives enhancing enzymatic hydrolysis of lignocellulosic

biomass. **Bioresource technology**, 2017. v. 244, p. 48–56. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.132>>.

RODRIGUES, D. S. Processos bioquímicos. In: VAZ JR, S. **Biomassa para química verde**. 1 ed. Embrapa Agroenergia, Brasília, 2013. cap. 5, p. 111-132.

SAEMAN, J. F. Key factors in the hydrolysis of cellulose. In: KLASS, D. L. **Biomass as a nonfossil fuel source**. ACS Symposium Series, 1981. v. 144 p. 185–197.

SAHA, B. C. Lignocellulose biodegradation and applications in biotechnology. **ACS symposium series**, 2004. v. 889, p. 2–34. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bk-2004-0889.ch001>>.0-8412-3876-6.

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

SEIDL, P. R. GOULART, A. K. Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry Pretreatment processes for lignocellulosic biomass conversion to biofuels and bioproducts. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, 2016. v. 2, p. 48–53. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cogsc.2016.09.003>>.

SILVA, A. S. *et al.* Major improvement in the rate and yield of enzymatic saccharification of sugarcane bagasse via pretreatment with the ionic liquid 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate ([Emim] [Ac]). **Bioresource Technology**, 2011. v. 102, n. 22, p. 10505–10509.

SILVA, A. S. *et al.* Biomassa como fonte de energia renovável. In: REIS, R. A. BERNARDES, T. F. SIQUEIRA, G. R. (Org.). **Forragicultura: Ciência, Tecnologia e Gestão de Recursos Forrageiros**. 1ed. Jaboticabal: Multipress, 2013a, v. 1, p. 629-644.

SILVA, A. S. *et al.* Sugarcane and Woody Biomass Pretreatments for Ethanol Production. In: CHANDEL, A. K. SILVA, S. S. (Org.). **Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization**. 1ed. InTech, 2013b. p. 47-88.

SILVEIRA, M. H. L. *et al.* Current Pretreatment Technologies for the Development of Cellulosic Ethanol and Biorefineries. **ChemSusChem**, 2015. v. 8, n. 20, p. 3366–3390.

SINGH, P. *et al.* Biological pretreatment of sugarcane trash for its conversion to fermentable sugars. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2008. v. 24, n. 5, p. 667–673.

SINGHANIA, R. R. *et al.* Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and microbial technology**, 2010. v. 46, n. 7, p. 541–549.

SLUITER, A. *et al.* Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. **Laboratory Analytical Procedure (LAP) NREL**, 2012.

SLUITER, A. *et al.* Determination of total solids in biomass and total dissolved solids in liquid process samples. **Laboratory Analytical Procedure (LAP) NREL** p. 9 , 2008a. NREL/TP-510-424621.

SLUITER, A. *et al.* Determination of Extractives in Biomass. **Laboratory Analytical Procedure (LAP) NREL** p. 1–9 , 2008b. Disponível em: <<http://www.nrel.gov/biomass/pdfs/42619.pdf>>.

SOARES, P. A. ROSSELL, C. E. V. **Conversão da celulose pela tecnologia organosolv**. NAIPE/USP, São Paulo, 2011. v. 3.

SOCOL, C. R. *et al.* Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, 2010. v. 101, n. 13, p. 4820–4825. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.067>>.0960-8524.

SOUSA, L. C. *et al.* “Cradle-to-grave” assessment of existing lignocellulose pretreatment technologies. **Current Opinion in Biotechnology**, 2009. v. 20, n. 3, p. 339–347.

SOUZA, M. F. *et al.* Chlorine-free biomass processing: enzymatic alternatives for bleaching and hydrolysis of lignocellulosic materials. In: TUNDO, P. LOKTEVA, L. H. E. MOTA, C. **Chemistry Beyond Chlorine**. Springer, 2016. cap. 8, p. 241-268.

SRIVASTAVA, N. *et al.* Applications of fungal cellulases in biofuel production: Advances and limitations. **Renewable and sustainable energy reviews** 2017a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2017.08.074>>.

SRIVASTAVA, N. *et al.* Efficient dark fermentative hydrogen production from enzyme hydrolyzed rice straw by *Clostridium pasteurianum* (MTCC116). **Bioresource technology**, 2017b. v. 238, p. 552–558.

SRIVASTAVA, N. *et al.* Nanomaterials for biofuel production using lignocellulosic waste. **Environmental Chemistry Letters**, 2017c. v. 15, n. 2, p. 179–184.

SZENGYEL, Z. **Ethanol from wood: Cellulase enzyme production**. Tese de Doutorado. Departamento de Engenharia Química, Lund University, Suécia, 2000.

SUN, Y. C. *et al.* Structural comparison and enhanced enzymatic hydrolysis of eucalyptus cellulose via pretreatment with different ionic liquids and catalysts. **Process Biochemistry**, 2013. v. 48, n. 5–6, p. 844–852. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2013.03.023>>.1359-5113.

TEIXEIRA, R. S. S. *et al.* Amino acids interference on the quantification of reducing sugars by the 3,5-dinitrosalicylic acid assay mislead carbohydrase activity measurements. **Carbohydrate research**, 2012. v. 363, p. 33–37.

U.S. DEPARTMENT OF ENERGY. Modeling tomorrow ' s biorefinery — the NREL biochemical pilot plant. **Energy efficiency and renewable energy** , 2005. Disponível em: <<https://www.nrel.gov/docs/fy08osti/41334.pdf>>.

VALDIVIA, M. *et al.* Biofuels 2020: Biorefineries based on lignocellulosic materials. **Microbial biotechnology**, 2016. v. 9, n. 5, p. 585–594.

VASCONCELOS, J. N. Ethanol fermentation. In: SANTOS, F. BORÉM, A. CALDAS, C. **Sugarcane: Agricultural production, bioenergy and ethanol**. 1 ed. Academic Press, 2015. cap. 15, p. 311-340.

VAZ, S. Sugarcane - Biorefinery. **Advances in biochemical engineering/biotechnology**, 2017. Doi: 10.1007/10_2016_70.

VAZ JR, S. **Biorrefinarias: Cenários e Perspectivas**. 1 ed. Embrapa Agroenergia, Brasília, 2011. p. 176.

VAZ JR, S. Processos Químicos Catalíticos. In: VAZ JR, S. **Biomassa para química verde**. 1 ed. Embrapa Agroenergia, Brasília, 2013. cap. 4, p. 87-103.

VAZ JR, S. A renewable chemistry linked to the Brazilian biofuel production. **Chemical and biological technologies in agriculture**, 2014a. v. 1, n. 1, p. 13.

VAZ JR, S. Perspectives for the Brazilian residual biomass in renewable chemistry. **Pure and applied chemistry**, 2014b. v. 86, n. 5, p. 833–842.

VERARDI, A. *et al.* Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass: Current Status of Processes and Technologies and Future Perspectives. In: LIMA, M. A. P. **Bioethanol**. InTech, 2012; cap. 5, p. 95-112.

VERMERRIS, W. ABRIL, A. Enhancing cellulose utilization for fuels and chemicals by genetic modification of plant cell wall architecture. **Curr. Opin. Biotechnol**, 2015. v. 32, p. 104–112.

VISSER, E. M. *et al.* Increased enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse from enzyme recycling. **Biotechnology for biofuels**, 2015. v. 8, n. 1, p. 5.

SIVERS, M. V. ZACCHI, G. A techno-economical comparison of three processes for the production of ethanol from pine. **Bioresource Technology**, 1995. v. 51, n. 1, p. 43–52.

VRIES, B. J. M. PETERSEN, A. C. Conceptualizing sustainable development: An assessment methodology connecting values, knowledge, worldviews and scenarios. **Ecological economics**, 2009. v. 68, n. 4, p. 1006–1019.

WALDRON, K. W. **Advances in biorefineries: Biomass and waste supply chain exploitation**. 1 ed. Woodhead Publishing, 2014. p. 936.

WANG, H. GURAU, G. ROGERS, R. D. Ionic liquid processing of cellulose. **Chemical Society Reviews**, 2012. v. 41, n. 4, p. 1519–1537. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=c2cs15311d>>.0306-0012.

XU, F. *et al.* Determination of cell wall ferulic and p-coumaric acids in sugarcane bagasse. **Analytica chimica acta**, 2005. v. 552, n. 1–2, p. 207–217.

YOO, C. G. PU, Y. RAGAUSKAS, A. J. Ionic liquids: Promising Green Solvents for Lignocellulosic Biomass Utilization. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cogsc.2017.03.003>>.

ZHANG, Y. H. P. LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and bioengineering**, 2004. v. 88, n. 7, p. 797–824.

ZHAO, X. CHENG, K. LIU, D. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2009. v. 82, n. 5, p. 815–827.

ZHAO, Y. *et al.* Effects of cationic structure on cellulose dissolution in ionic liquids: A molecular dynamics study. **ChemPhysChem**, 2012. v. 13, n. 13, p. 3126–3133.

ZHOU, Z. *et al.* Enhancement of enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse by pretreatment combined green liquor and sulfite. **Fuel**, 2017. v. 203, p. 707–714.