



PRÉ-TRATAMENTO DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR EM SOLVENTES EUTÉTICOS PARA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Luiz Felipe Barletta Ferreira

Pedro Guido Schiavini

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como parte dos requisitos para conclusão do curso de graduação em Engenharia Química pela Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ.

Orientadores: Rodrigo Pires do Nascimento

Bernardo Dias Ribeiro

Rio de Janeiro

Agosto de 2017

PRÉ-TRATAMENTO DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR EM SOLVENTES
EUTÉTICOS PARA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Luiz Felipe Barletta Ferreira

Pedro Guido Schiavini

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO SUBMETIDO AO CORPO DOCENTE
DA ESCOLA DE QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE
JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A
CONCLUSÃO DA GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Aprovado por:

Prof. Felipe Valle do Nascimento, DEB-EQ/UFRJ

Prof^a. Evelin Andrade Manoel, CCS/UFRJ

Prof^a. Gizele Cardoso Fontes Sant'Ana, IQ/UERJ

Orientado por:

Prof. Rodrigo Pires do Nascimento, DEB-EQ/UFRJ

Prof. Bernardo Dias Ribeiro, DEB-EQ/UFRJ

Rio de Janeiro, RJ - Brasil

Agosto de 2017

Ferreira, Luiz Felipe Barletta e Schiavini, Pedro Guido.

Pré-tratamento da palha de cana-de-açúcar em solventes eutéticos para hidrólise enzimática. Luiz Felipe Barletta Ferreira e Pedro Guido Schiavini. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2017.

vi, 59 p.; il.

(Monografia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2017.

Orientadores: Rodrigo Pires do Nascimento e Bernardo Dias Ribeiro.

1. Líquidos Iônicos. 2. Celulases. 3. Hidrólise Enzimática. 4. Palha de cana-de-açúcar. 5.

Monografia (Graduação – UFRJ/EQ). 5. Rodrigo Pires do Nascimento e Bernardo Dias Ribeiro. I. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos, primeiramente, a nossos pais, pelo amor, carinho e apoio durante toda a nossa graduação.

A nossos orientadores, Prof. Dr. Rodrigo Pires do Nascimento e Prof. Dr. Bernardo Dias Ribeiro, pela orientação, confiança e entusiasmo durante todo o trabalho.

A todos os amigos da Escola de Química, que tornaram essa jornada mais fácil.

Aos laboratórios LEPM e CleanTech e seus integrantes, pela paciência e acolhimento dado durante este período.

Agradecemos a Dra. Ayla Sant'Ana da Silva por abrir as portas do Laboratório de Biocatálise (LABIC/DCAP) do Instituto Nacional de Tecnologia, fornecendo a infraestrutura necessária para a realização de parte deste estudo e ao pesquisador Bruno César da Silva Coelho pela ajuda nas análises e condução de experimentos.

Ao Centro de Tecnologia Canavieira por ter fornecido a matéria-prima para a realização dos experimentos.

Finalmente, a todos, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste projeto, nosso sincero agradecimento.

Resumo do Projeto Final de Curso (TCC) apresentada como parte dos requisitos necessários para a conclusão do curso de Engenharia Química.

PRÉ-TRATAMENTO DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR EM SOLVENTES EUTÉTICOS PARA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Luiz Felipe Barletta Ferreira

Pedro Guido Schiavini

Agosto, 2017

Orientadores: Prof. Rodrigo Pires do Nascimento, D.Sc., DEB-EQ/UFRJ

Prof. Bernardo Dias Ribeiro, D.Sc., DEB-EQ/UFRJ

O pré-tratamento da biomassa lignocelulósica tem a função de alterar as interações nativas entre a celulose, a hemicelulose e a lignina e, em muitos casos, modificar quimicamente estes componentes da biomassa, de forma a tornar a celulose mais acessível à etapa de hidrólise enzimática. O presente trabalho tem por objetivo avaliar o desempenho do pré-tratamento da palha de cana de açúcar em solventes eutéticos para hidrólise enzimática. A realização de pré-tratamento preliminares em escala reduzida indicou que o solvente eutético Cloreto de Colina/Uréia apresentou os melhores rendimentos de solubilização de lignina e celulose. Esse solvente foi então escolhido para a realização de pré-tratamento em escala ampliada. A composição da palha *in natura* e pré-tratada em escala ampliada foram então submetidas a caracterização ácida e constatou-se uma remoção de 40,2% de lignina da composição da biomassa, indicando que o pré-tratamento foi bem sucedido. Contudo, os resultados da hidrólise enzimática da biomassa pré-tratada, utilizando a enzima industrial Celluclast 1.5L, apresentaram rendimentos de glicose de 13%, 17% e 19% para cargas enzimáticas de 10 FPU, 15 FPU E 20 FPU respectivamente. O baixo rendimento de hidrólise, apesar da constatada remoção de lignina, indica um possível erro na condução do experimento de hidrólise ou uma deficiência do solvente eutético na redução do grau de cristalinidade do complexo celulósico.

Abstract of Dissertation presented as a partial fulfillment of the requirements for the Chemical Engineering course conclusion.

SUGARCANE BIOMASS PRETREATMENT USING DEEP EUTECTIC SOLVENT FOR ENZYMATIC HYDROLISIS

Luiz Felipe Barletta Ferreira

Pedro Guido Schiavini

August, 2017

Advisors: Prof. Rodrigo Pires do Nascimento, D.Sc., DEB-EQ/UFRJ

Prof. Bernardo Dias Ribeiro, D.Sc., DEB-EQ/UFRJ

The pretreatment of the lignocelulosic biomass aims to decrease the biomass native recalcitrance due to the interactions amongst cellulose, hemicellulose and lignin, allowing the enzymatic hydrolysis of cellulose. This study evaluated sugarcane straw pretreatment using deep eutectic solvents for enzymatic hydrolysis. Preliminary pretreatment on a reduced scale indicated that the eutectic solvent Choline Chloride / Urea presented the best solubilization yields of lignin and cellulose. This solvent was then chosen to perform pretreatment on an enlarged scale. The straw composition for both in natura and under enlarged scale pretreatment was then obtained by acid characterization and a 40,2% of lignin from the biomass composition was detected, indicating that the pretreatment was successful. However, the results of the enzymatic hydrolysis of the pretreated biomass presented glucose yields of 13%, 17% and 19% for enzymatic charges of 10 FPU, 15FPU and 20FPU respectively. The low hydrolysis yield, despite the observed removal of lignin, indicates a possible error in the conduction of the hydrolysis experiment or a deficiency of the eutectic solvent to reduce the degree of crystallinity of the cellulosic complex to amorphous regions.

ÍNDICE

Capítulo 1. Introdução	1
Capítulo 2. Revisão Bibliográfica	3
2.1. Biomassa e Biorrefinarias.....	3
2.1.1 Biomassa	3
2.1.1.1. Vegetais Não lenhosos.....	3
2.1.1.2. Vegetais Lenhosos	4
2.1.1.3. Resíduos Orgânicos	4
2.1.1.4. Biofluido.....	5
2.1.2. Biorrefinarias	6
2.2. Cana de Açúcar: A biomassa brasileira	7
2.3. Material Lignocelulósico	10
2.3.1. Celulose	11
2.3.2. Hemicelulose	13
2.3.3. Lignina	14
2.4. Pré-Tratamentos.....	15
2.4.1. Pré-Tratamento Físico	15
2.4.2. Pré-Tratamento Químico.....	16
2.4.3. Pré-Tratamento Físico-Químico	18
2.4.4. Pré-Tratamento Biológico.....	19
2.5. Solventes Verdes	19
2.5.1. Líquidos Iônicos (LI's).....	19
2.5.2. Solventes Eutéticos (SE's).....	21
2.5.2.1. Ponto de Fusão.....	24
2.5.2.2. Densidade	24
2.5.2.3. Viscosidade	25
2.6. Hidrólise enzimática e hidrólise ácida da biomassa lignocelulósica	25
Capítulo 3. Justificativa	27
Capítulo 4. Objetivos	27
4.1. Objetivo Geral	27

4.2. Objetivos específicos	27
Capítulo 5. Metodologia	28
5.1. Preparo das amostras.....	28
5.2. Pré-tratamento em pequena escala.....	29
5.3. Caracterização da Lignina	30
5.4. Teste Fenol-Sulfúrico	30
5.5. Pré-Tratamento em escala ampliada.....	31
5.6. Caracterização da palha <i>in natura</i> e pré-tratada	32
5.6.1. Determinação de sólidos totais, umidade e cinzas	32
5.6.2. Determinação de extrativos	32
5.6.3 Determinação de carboidratos e lignina	33
5.7. Dosagem enzimática.....	34
5.7.1 Atividade de FPase	34
5.8. Hidrólise enzimática.....	35
5.9. Quantificação de monossacarídeos do material pré-tratado e <i>in natura</i>	36
Capítulo 6. Resultados e Discussão	37
6.1. Pré-tratamento da palha de cana de açúcar com Solvente Eutético em escala menor	37
6.2. Caracterização química da palha <i>in natura</i> e da palha pré-tratada com solvente eutético	43
6.3. Hidrólise enzimática.....	45
Capítulo 7. Projeto de Processo de Conversão da Biomassa Vegetal..	48
Capítulo 8. Conclusões	52
Capítulo 9. Referências Bibliográficas	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fontes de Biomassa e Destino para diferentes produtos (AGÊNCIA NACIONAL DE ENERGIA ELÉTRICA, 2005).....	6
Figura 2: Representação do aproveitamento da biomassa segundo o conceito de biorrefinaria. Fonte: adaptado da Sociedade Ibero-americana para o Desenvolvimento das Biorrefinarias (VAZ JÚNIOR, 2011).....	7
Figura 3: Desenvolvimento da produção de cana-de-açúcar e açúcar redutor total produzidos por hectare ao longo dos anos (NOVA CANA, 2009).....	8
Figura 4: Destino da safra 2016-2017 (DEPARTAMENTO DE PESQUISAS E ESTUDOS ECONÔMICOS, 2017).....	9
Figura 5: Estrutura da biomassa lignocelulósica (KONDO et al., 1997).....	11
Figura 6: Esquematização das regiões cristalinas e amorfas da celulose (ALVES, 2011).....	12
Figura 7: Representação da molécula de celulose com seu monômero glicose e dímero celobiose (ALVES, 2011).....	12
Figura 8: Representação esquemática da arabinoxilana, um tipo de hemicelulose (fonte: https://www.e-education.psu.edu/egee439/node/664).....	13
Figura 9: Esquematização da estrutura da lignina e principais unidades aromáticas presentes na lignina (fonte: http://www.chem.cmu.edu/groups/washburn/res-lignin.html).....	15
Figura 10: Formação dos componentes inibidores. Adaptado de (PALMQVIST e HAHN-HAGERDAL, 2000).....	17
Figura 11: Representação esquemática do ponto eutético em um diagrama de fase de dois componentes.....	22

Figura 12: : Experimentos do pré-tratamento em pequena escala para seleção do melhor Solvente Eutético.....	30
Figura 13: Esquematização do experimento de remoção de extrativos.....	33
Figura 14: Concentração de lignina pós pré-tratamento em pequena escala.....	38
Figura 15: Concentração em g/l de glicose do meio líquido após o pré-tratamento.....	39
Figura 16: Amostras dos solventes de ureia e de glicerol após o pré-tratamento e adição de solução 50% (v/v) acetona.....	42
Figura 17: Cinética de Formação de Glicose ao longo da Hidrólise Enzimática.....	46
Figura 18: Cinética de Formação de Xilose ao longo da Hidrólise Enzimática.....	47
Figura 19: Etapa do pré-tratamento do processo proposto.....	50
Figura 20: Etapa de obtenção de lignina e hemicelulose do processo proposto.....	51
Figura 21: Etapa de recuperação do solvente do processo proposto.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tipos de SE's, sua fórmula geral e alguns exemplos (fonte: DEGAM, 2017).....	23
Tabela 2: Proporção molar utilizada para a síntese de cada solvente eutético.....	29
Tabela 3: Comportamento dos SE's no pré-tratamento.....	41
Tabela 4: Caracterização química dos componentes das palhas expressa em porcentagem de massa seca.....	43
Tabela 5: Caracterização dos principais constituintes da biomassa em porcentagem de massa seca.....	44
Tabela 6: Rendimento de Glicose na hidrólise enzimática.....	46

LISTA DE ABREVIACOES

FIESP	Federação das indústrias do Estado de São Paulo
SE	Solvente Eutético
LI	Líquido Inico
Gli	Glicerol
HPhAc	cido Fenil acético
HLac	cido Lático
HMAL	cido Malnico
EtGly	Etileno Glicol
HOx	cido Oxálico
HProp	cido Propinico
HAc	cido acético
ChCl	Cloreto de Colina
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
MF1	Microfiltração 1
MF2	Microfiltração 2
NF1	Nanofiltração 1
NF2	Nanofiltração 2

Capítulo 1. Introdução

Ao longo das últimas décadas o que se viu foi uma sociedade cada vez mais dependente da energia proveniente dos combustíveis fósseis. Esta dependência, além de gerar sérios problemas ambientais, como a intensificação do efeito estufa, criou uma forte dependência econômica dos países que não são auto-suficientes nesse quesito. Neste contexto resurge o conceito da utilização de biomassa como fonte de energia e bioprodutos, que havia sido negligenciado ao longo da história pelo uso do carvão e derivados de petróleo. (CORTEZ, LORA e GOMEZ, 2008)

A questão ambiental é bastante discutida, principalmente pelos problemas gerados pela queima de combustíveis fósseis, que geram poluentes como óxidos de nitrogênio (NO_x), óxidos de enxofre (SO_x), óxidos de carbono (CO e CO₂), entre outros. Esses poluentes geram problemas como poluição atmosférica, *smog* fotoquímico, e intensificação do efeito estufa, que tem gerado alguns problemas, até mesmo econômicos, como longos períodos de estiagem, prejudicando o setor agrícola (GUARIEIRO, VASCONCELLOS e SOLCI, 2011). Além disso, o temor pelo fim das reservas de petróleo também contribuiu para a busca de uma solução energética mais sustentável.

A solução encontrada foi a biomassa, usada sobre tudo na produção de biocombustíveis, como etanol e biodiesel. No Brasil, o álcool é largamente utilizado puro ou misturado com gasolina, diminuindo a emissão de gases poluentes na queima desses combustíveis. A principal biomassa brasileira é a cana-de-açúcar, sendo o Brasil, o maior produtor deste vegetal no mundo. Contudo, a cana também é usada para produção de açúcar, havendo uma competição na escolha de qual produto a biomassa será destinada (DEPARTAMENTO DE PESQUISAS E ESTUDOS ECONÔMICOS, 2017). Além disso, com a tendência cada vez maior do uso de energia sustentável, é necessário que a produção de cana acompanhe este crescimento. Contudo, existe uma dificuldade em aumentar o número de hectares plantados com cana-de-açúcar, por questões de preservação ambiental e pela competição com outros cultivos (PORTAL BRASIL, 2017).

Uma forma de aumentar a produção de etanol, ou de outros bioprodutos, é aproveitando os resíduos como o bagaço e a palha gerados no processamento da cana-de-açúcar. Esses resíduos são de composição lignocelulósica, ou seja, um complexo formado por celulose, hemicelulose e lignina. Através da hidrólise enzimática da celulose é possível gerar moléculas de glicose que podem ser fermentadas a etanol. Entretanto, este processo não é

fácil, porque as outras estruturas do complexo funcionam como uma barreira dificultando o acesso das enzimas a celulose (SANTOS, 2012). Para desestruturar esse complexo é necessária uma etapa de pré-tratamento, e assim melhorar os rendimentos da reação.

Existem diversos pré-tratamentos, cada um com suas vantagens e desvantagens, e com princípios de atuação diferentes. Podem ser físicos, químicos, físico-químicos ou biológicos, a escolha depende da finalidade e do produto de interesse (ALVIRA et al., 2010). Nos últimos anos, têm surgido estudos com os chamados solventes verdes, os Líquidos Iônicos (LI's) e os Solventes Eutéticos (SE's).

Os LI's são substâncias iônicas que apresentam ponto de fusão abaixo de 100°C, sendo muitos líquidos a temperatura ambiente. Sua utilização tem aumentado para tornar os processos cada vez mais sustentáveis, gerando menos impacto ambiental, substituindo tratamentos com ácido sulfúrico concentrado, por exemplo (DA SILVA, 2013). Contudo, o uso de LI's costuma encarecer os processos de pré-tratamento, podendo torná-los inviáveis financeiramente. Já os SE's são uma mistura de compostos capazes de auto-associação por meio de ligações de hidrogênio, formando uma mistura eutética (DAI *et al.*, 2013). Os SE's são uma alternativa aos LI's, uma vez que possuem propriedades químicas similares, porém com algumas vantagens, sendo que a principal é o baixo custo de preparo (GUNNY, ARBAIN, *et al.*, 2015).

Logo, o trabalho consiste no estudo de diferentes SE's atuando como pré-tratamento numa fonte lignocelulósica a ser explorada, a palha de cana, buscando numa primeira etapa o SE com maior potencial para ser usado em escala industrial. Posteriormente o solvente escolhido será estudado numa escala maior e a palha pré-tratada levada a etapa de hidrólise enzimática para observar a eficiência do SE.

Capítulo 2. Revisão Bibliográfica

Este capítulo aborda os principais conceitos necessários para o entendimento dos processos que envolvem o pré-tratamento e hidrólise da palha de cana. Apresenta também fundamentos que justificam o estudo proposto com solventes eutéticos.

2.1. Biomassa e Biorrefinarias

2.1.1 Biomassa

Biomassa é todo recurso natural renovável e de origem orgânica que pode ser utilizado para a produção de bioprodutos e biocombustíveis. Ela é considerada renovável pela facilidade e pelo baixo tempo de reposição desses recursos na natureza. Não sendo explorada de forma predatória, a biomassa é reposta naturalmente pelo ciclo do carbono, o que reduz significativamente os impactos ambientais, ainda mais quando comparados com os impactos gerados pelos derivados de petróleo (BIOENERGIA E BIOMASSA, 2016)

Apesar de não ser uma novidade, principalmente na geração de energia, o uso de biomassa vem aumentando nas últimas décadas como uma tentativa de redução tanto dos impactos ambientais quanto da dependência dos derivados de petróleo. As principais fontes pelas quais a biomassa pode ser obtida são: vegetais não lenhosos (plantas em geral), vegetais lenhosos (madeira e seus resíduos), resíduos orgânicos e biofluidos (FIGURA 1). Destas fontes podem-se obter biomassas de diferentes características e origens que podem ser destinadas para aplicações diversas. (CORTEZ, LORA e GOMEZ, 2008)

2.1.1.1. Vegetais Não lenhosos

Os vegetais não lenhosos são, principalmente, de origem agrícola e são classificados em relação a forma na qual a energia se encontra armazenada. Os principais tipos de vegetais não lenhosos são os amiláceos, os sacarídeos, os aquáticos e os celulósicos. As amiláceas, por exemplo, são matérias-primas que através de processos de conversão adequados disponibilizam glicose, antes armazenada na forma de amido. No Brasil, as principais matérias-primas amiláceas para a obtenção de glicose são o milho, o arroz e o sorgo granífero (INSTITUTO DE ENERGIA E AMBIENTE DA USP, 2016).

Os sacarídeos possuem energia armazenada na forma da sacarose, que é uma molécula formada por glicose e frutose. Atualmente a principal fonte de biomassa sacarídea é a cana de açúcar, podendo ser encontrada também na beterraba (SANTANA e DURÃES, 2013). Já a biomassa proveniente de fontes aquáticas são as que geram energia a partir de algas, microalgas e aguapés. Essas fontes costumam apresentar altas porcentagens de lipídios em suas composições, podendo ser usados para obtenção de biocombustíveis através de uma reação de esterificação. Além desta rota química, esse tipo de matéria prima também pode gerar energia pela queima deste material orgânico (HOLANDA, RAMOS, *et al.*, 2011).

A última classificação das fontes de vegetais não lenhosos é a celulósica, nesse tipo de biomassa a energia é armazenada em sua estrutura morfológica que é constituída pela celulose, hemicelulose e lignina (SANTANA e DURÃES, 2013). Essa matéria-prima também pode ser chamada de lignocelulósica, por ser uma fonte composta por outras estruturas além da celulose.

2.1.1.2. Vegetais Lenhosos

As matérias-primas vindas de vegetais lenhosos, como a madeira, podem gerar energia a partir de processos de conversão. A madeira usada neste processo pode ser de origem florestal e/ou plantada. Nas últimas décadas, devido a exploração e as atividades agropecuárias pôde-se observar um aumento significativo o desmatamento de florestas nativas. Por isso, a produção de florestas plantadas tem crescido tanto para fins de reflorestamento quanto para a exploração energética (INSTITUTO DE ENERGIA E AMBIENTE DA USP, 2016).

2.1.1.3. Resíduos Orgânicos

Os resíduos orgânicos podem ser de origem agrícola, urbana ou industrial. A composição desses resíduos pode variar muito de acordo com a origem. Os resíduos orgânicos de áreas urbanas (lixos), no geral costumam ter uma porcentagem alta de umidade, não apresentando um conteúdo energético muito alto, sendo assim, utilizados basicamente no uso em adubos e fertilizantes. Já os de origem industrial e agrícola, por possuírem um poder calorífico maior, costumam ser aproveitados como fonte energética nos próprios processos de

conversão, para diminuir a dependência de energia, e na cogeração (NOGUEIRA e LORA, 2003).

2.1.1.4. Biofluido

Por fim, a biomassa classificada como biofluido é aquela onde é possível a geração de energia através de óleos contidos em frutos e grãos. As principais matérias-primas que são usadas para a obtenção de óleo são o girassol, a mamona e a soja. No Brasil, esta última corresponde à cerca de 80% da matéria prima utilizada na produção de biodiesel, mesmo não tendo este destino como prioridade. A soja no Brasil é destinada à produção de óleo de cozinha para consumo humano, farelo e grãos para exportação (SANTANA e DURÃES, 2013).

A partir dessa variedade de biomassa são necessários diferentes processos de conversão para se obter um bioproduto. Na Figura 1 é possível observar alguns desses processos, que podem ser físicos, químicos ou biológicos, para a produção de biocombustíveis. Contudo, os processos de conversão não são destinados apenas ao abastecimento do setor energético, a biomassa também é utilizada na geração de produtos como insumos químicos, materiais e produtos finais, que são capazes de atender a diversos setores na economia como: petroquímico, cosmético, farmacêutico, entre outros (CLÍMACO, 2012).

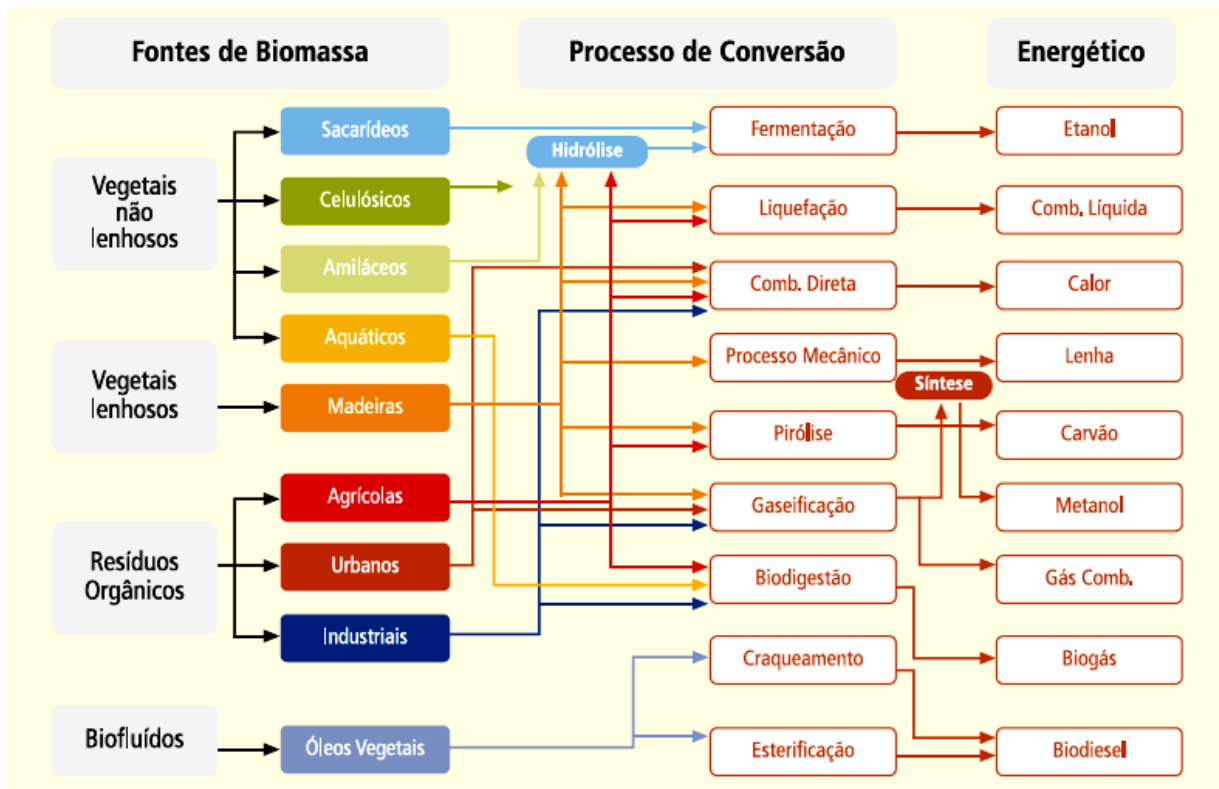


Figura 1: Fontes de Biomassa e Destino para diferentes produtos

(fonte: AGÊNCIA NACIONAL DE ENERGIA ELÉTRICA, 2005)

2.1.2. Biorrefinarias

Na busca por atender às diferentes demandas de vários setores da economia, surge a necessidade de integrar diversos processos de tratamento e conversão de biomassa. As instalações que realizam essa integração são chamadas de Biorrefinarias. De acordo com o *National Renewable Energy Laboratory* (NREL) do Departamento de Energia dos Estados Unidos, biorrefinaria pode ser definida como: “A biorrefinaria é uma instalação que integra os processos e equipamentos de conversão de biomassa para produzir combustíveis, energia e produtos químicos a partir da biomassa, maximizando o valor de biomassa e minimizando os resíduos.” (JONG e VAN REE, 2005).

As biorrefinarias otimizam os processos de forma a aproveitar ao máximo o potencial das biomassas, incluindo o aproveitamento dos resíduos gerados durante o processamento. Assim, é possível obter produtos com diferentes valores agregados na cadeia produtiva (Figura 2). A integração dos processos desde a obtenção da matéria prima até a conversão em

bioprodutos permite que essas instalações atendam não só a setores da economia, como também consigam suprir algumas necessidades na sua própria cadeia produtiva, como a energia (VAZ JÚNIOR, 2011).

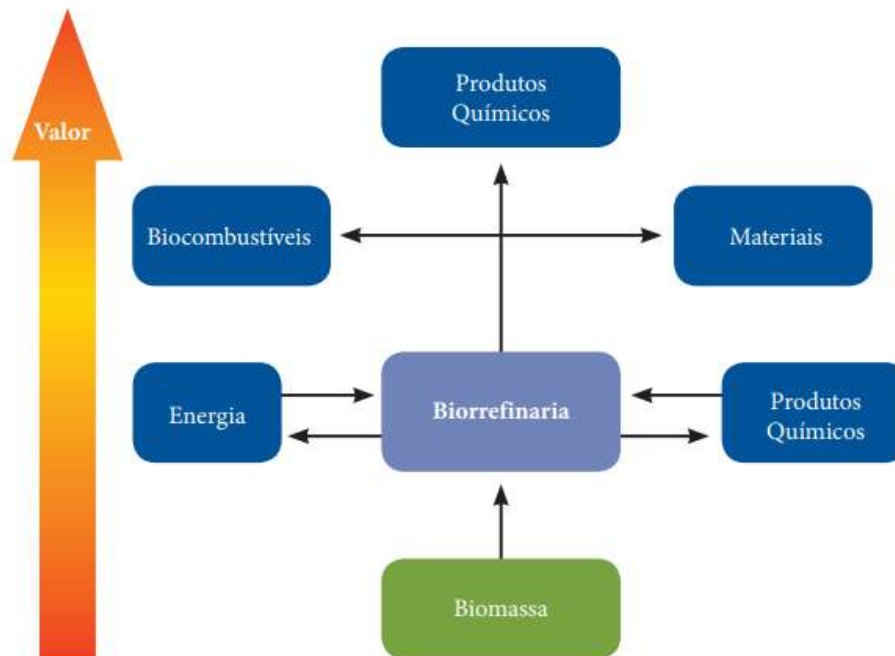


Figura 2: Representação do aproveitamento da biomassa segundo o conceito de biorrefinaria.

(fonte: VAZ JÚNIOR, 2011)

2.2. Cana de Açúcar: A biomassa brasileira

No Brasil, o uso da biomassa através da utilização de matéria orgânica (madeira) para cocção e aquecimento é antigo. Contudo, a intensificação desse tipo de fonte para geração de energia se intensificou nos anos 70. Neste período, o governo brasileiro lançou o programa Proálcool que visava diminuir a dependência do país nas importações dos derivados de petróleo. Este programa incentivou a expansão de ofertas de matérias-primas que eram utilizadas para produção de álcool, aumentando a produção agrícola, além disso, houve a criação de novas instalações e modernização nas destilarias já existentes (BIODIESELBR, 2006). Essa política de expansão agrícola para fomentar a produção de álcool fez com que uma matéria prima em especial se destacasse das outras, a cana-de-açúcar.

A cana-de-açúcar já vinha sendo plantada em larga escala para a produção de açúcar, possuindo um baixo custo de produção. Contudo, os preços desse produto sofriam muitas oscilações por este mercado ser bastante volátil. Arelado a esta instabilidade no mercado, o fato da produção de álcool se diferenciar da produção de açúcar apenas após a obtenção do caldo permite que em certos momentos, quando o preço do açúcar estiver em baixa no mercado, grande parte da produção de cana seja destinada à obtenção de álcool, e vice-versa. Observe o crescimento, a partir do Proálcool, na produção de cana-de-açúcar no Figura 3 (BIODIESELBR, 2006).

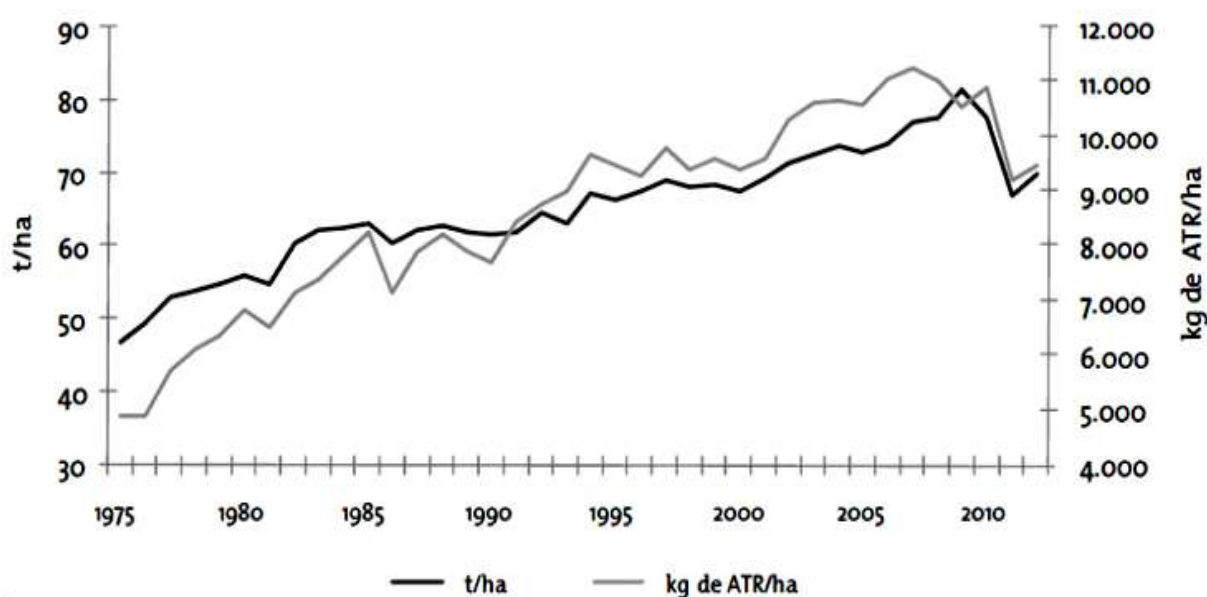


Figura 3: Desenvolvimento da produção de cana-de-açúcar e açúcar redutor total produzidos por hectare ao longo dos anos

(fonte: NOVA CANA, 2009).

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo. Durante a safra de 2016/2017 produziu mais de 680 milhões de toneladas de cana, sendo só o Estado de São Paulo responsável por quase 60% da produção. Neste mesmo período, a cana foi destinada quase que de forma igualitária para a produção de açúcar e de álcool, sendo o primeiro usado majoritariamente para atender o mercado externo, enquanto o álcool para atender as necessidades internas, observe a Figura 4 (DEPARTAMENTO DE PESQUISAS E ESTUDOS ECONÔMICOS, 2017).

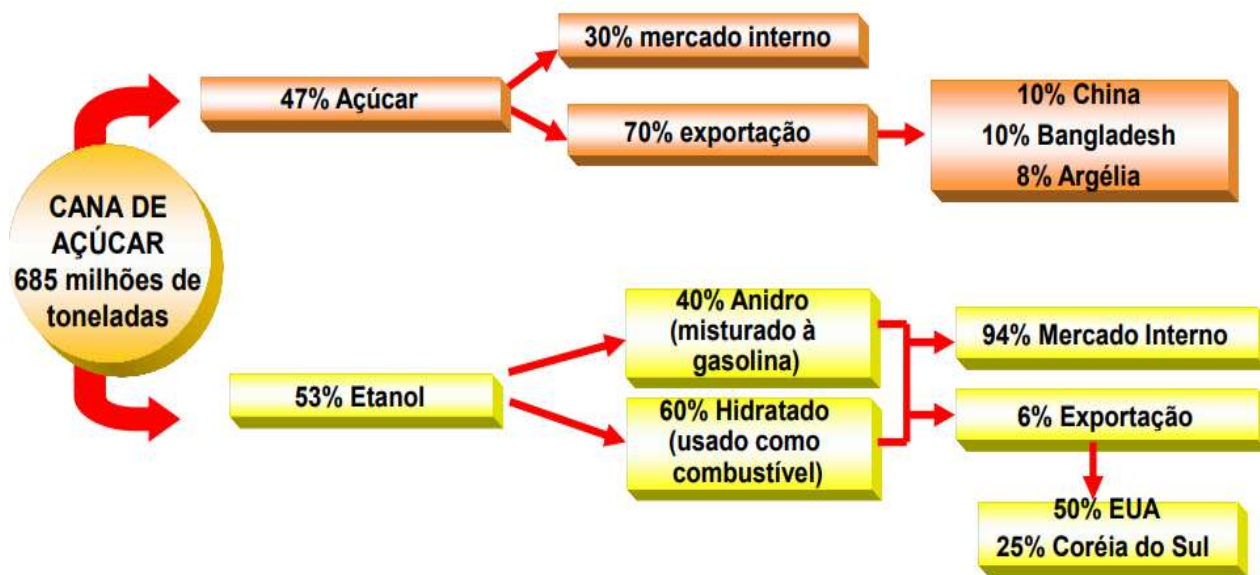


Figura 4: destino da safra 2016-2017

(fonte: DEPARTAMENTO DE PESQUISAS E ESTUDOS ECONÔMICOS, 2017)

O processamento da cana para a produção dos bioprodutos gera resíduos, como o bagaço e palha. Estes resíduos são destinados às termoeletricas onde são queimados e geram energia elétrica, suprimindo as necessidades energéticas do processo e o excedente, vendido, tornando o processo mais sustentável. Em 2016, a biomassa foi responsável por 8,8% de toda energia elétrica produzida no Brasil, sendo que desta quantidade, 67% vieram da queima do bagaço e palha de cana (PORTAL BRASIL, 2017).

No entanto, o desenvolvimento tecnológico, fez com que esses resíduos, principalmente o bagaço, não fossem destinados apenas à geração de energia elétrica. Estes resíduos são materiais lignocelulósicos, possuindo, portanto uma fonte de energia em potencial, a celulose. Sua utilização não é simples, principalmente pela presença da lignina e da hemicelulose em sua estrutura, sendo necessária a realização de pré-tratamentos para melhor disponibilização da celulose. O Brasil já é capaz de utilizar essa biomassa lignocelulósica do bagaço para geração de etanol, ou Etanol de 2ª geração (2G). O volume de produção ainda não é o esperado, com as poucas usinas existentes operando com uma taxa de ocupação abaixo dos 10% (NOVA CANA, 2017).

A palha de cana residual, atualmente, não tem seu potencial completamente explorado, sendo queimada, uma prática utilizada para facilitar a colheita da cana. Porém, a implementação da Lei da Queima da Cana (Lei nº 11.241/2002), que visa o controle das queimas nas colheitas de cana-de-açúcar até sua gradual eliminação, mudou a forma como a palha era tratada. A extinção da prática deverá ocorrer em 2021 para áreas mecanizadas e em 2031 para as não mecanizadas (ROSSETTO, 2017). A redução gradual da queima da palha evidencia a necessidade do aproveitamento desta biomassa, para que ela não seja tratada apenas como resíduo. A cada 1000 kg de cana-de-açúcar processada é possível gerar cerca de 165 kg de palha, levando em consideração a safra de 2016/2017, são quase 112 milhões de toneladas de palha gerados e que não tiveram seu potencial aproveitado (NOVA CANA, 2017). Uma projeção feita pelo FIESP indica que em 2023/2024 o Brasil precisará obter uma colheita de aproximadamente 862 milhões de toneladas de cana-de-açúcar para atender o mercado interno e externo de açúcar e álcool. É inevitável o aumento de hectares das áreas plantadas para se suprir esta demanda. Contudo se existir um máximo aproveitamento dos resíduos, principalmente a palha, aumentando a produtividade por hectare, pode-se evitar uma maior expansão de plantio de cana e menor impacto ambiental (NOVA CANA, 2017).

O aproveitamento da palha não se baseia apenas na geração de etanol, mas também é capaz de disponibilizar além de celulose (usada na produção do etanol), hemicelulose e lignina, estruturas essas que, se recuperadas, podem abrir opções na geração de outros bioprodutos com maior valor agregado, tornando este setor cada vez mais atrativo e sustentável.

2.3. Material Lignocelulósico

A biomassa lignocelulósica é o material vegetal mais abundante do planeta (BRAGA *et al.*, 2009) e é um dos principais recursos renováveis para a produção de energia, produtos químicos e materiais. Essa biomassa refere-se à parede celular das plantas que é majoritariamente composta por celulose, hemicelulose e lignina. Dentro do complexo de lignocelulose, a celulose retém a estrutura fibrosa cristalina, sendo o núcleo do complexo. A hemicelulose está posicionada tanto entre micro e microfibrilas de celulose. A lignina proporciona um papel estrutural da matriz na qual celulose e hemicelulose estão incorporadas (FAULON *et al.*, 1994). 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) (SANTOS, 2012). A composição destes constituintes pode variar de uma espécie de planta para outra. As madeiras duras, por exemplo, possuem maiores quantidades de celulose, enquanto a palha e folhas de trigo têm mais hemicelulose (BAJPAI, 2016). A Figura 5 apresenta um esquema ilustrativo dos três constituintes principais dessa matriz lignocelulósica.

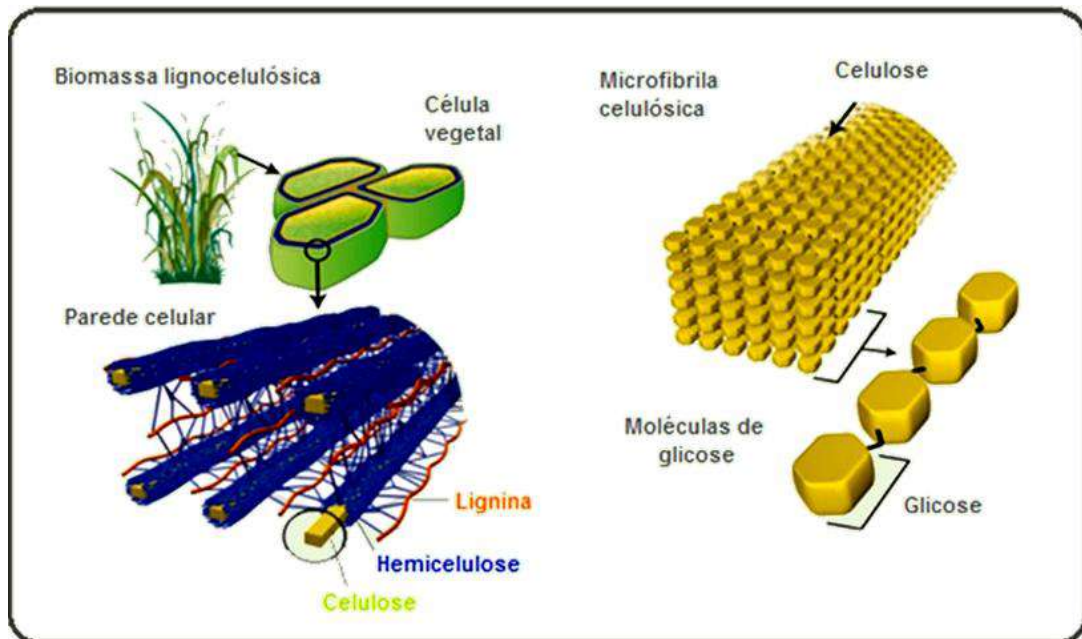


Figura 5: Estrutura da biomassa lignocelulósica

(fonte: KONDO *et al.*, 1997)

2.3.1. Celulose

A celulose é mais comumente considerada como um polímero de glicose porque a celobiose consiste em duas moléculas de glicose, dessa forma, é um composto químico orgânico de fórmula $(C_6H_{10}O_5)_n$. É classificado como um polissacarídeo que consiste de uma cadeia linear de várias centenas ou milhares de β -D-glicose ligadas através de ligações β -1,4-glicosídicas. É constituída por dímeros de glicose em repetição, denominados celobiose, onde a união das moléculas de glicose é disposta com rotação de 180° entre si. A estrutura da molécula possui regiões amorfas – suscetíveis à atuação de enzimas celulolíticas - intercaladas a regiões cristalinas (Figura 6). Tal fato se deve a existência de ligações intermoleculares de hidrogênio entre as cadeias poliméricas de glicose. A

cristalinidade exerce grande influência durante a hidrólise enzimática da biomassa. O grau inicial de cristalinidade da celulose desempenha um papel importante na taxa inicial da reação de hidrólise uma vez que amostras que apresentem significantes regiões amorfas são hidrolisadas muito mais rapidamente do que uma celulose de alta cristalinidade (ZHANG *et al.*, 2014). Assim, surge a hipótese de que os domínios amorfos em uma amostra de celulose parcialmente cristalina são hidrolisados primeiro, deixando as partes cristalinas para serem hidrolisadas por último (OOSHIMA *et al.*, 1983).



Figura 6: Esquemática das regiões cristalinas e amorfas da celulose

(fonte: ALVES, 2011)

O tamanho da cadeia é expresso em graus de polimerização segundo o número de unidades de glicose anidra em cada fibra (ALVES, 2011; SANTOS, 2012). A Figura 7 apresenta a molécula da celulose formada a partir de monômeros de glicose e seu dímero, celobiose.

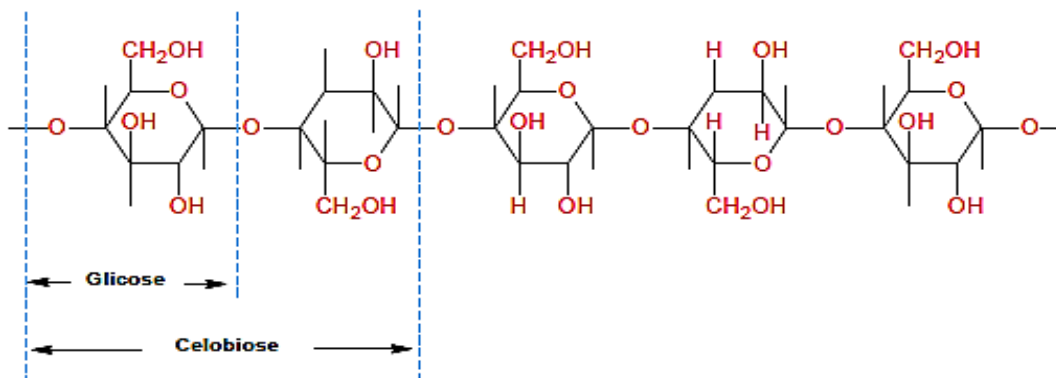


Figura 7: Representação da molécula de celulose com seu monômero glicose e dímero celobiose

(fonte: ALVES, 2011)

2.3.2. Hemicelulose

O composto hemicelulose é usado para representar uma família de polissacarídeos heterogêneos (Figura 8), como xilanas, glucomananas, galactanas e outras que são encontrados na parede celular da planta e têm diferentes composições e estruturas dependendo da fonte e do método de extração (ALVES, 2011). A hemicelulose é o segundo polímero mais abundante da biomassa lignocelulósica correspondendo a cerca de 20-50% de sua composição. Sua estrutura não é quimicamente homogênea como a celulose, apresentando estrutura ramificada de cadeias laterais curtas que consistem em diferentes tipos de açúcares. Estes monossacarídeos incluem pentoses (xilose e arabinose), hexoses (glicose, manose e galactose) e ácidos urônicos. Devido à sua estrutura ramificada e à presença de grupos acetil ligados a cadeia polimérica, um aspecto importante da sua estrutura é a pouca presença de cristalinidade (HARMSEN et al., 2010). Hemicelulose é insolúvel em água a baixas temperaturas. No entanto, a sua hidrólise ácida é iniciada a uma temperatura menor que a da celulose, o que a torna solúvel a temperaturas elevadas.

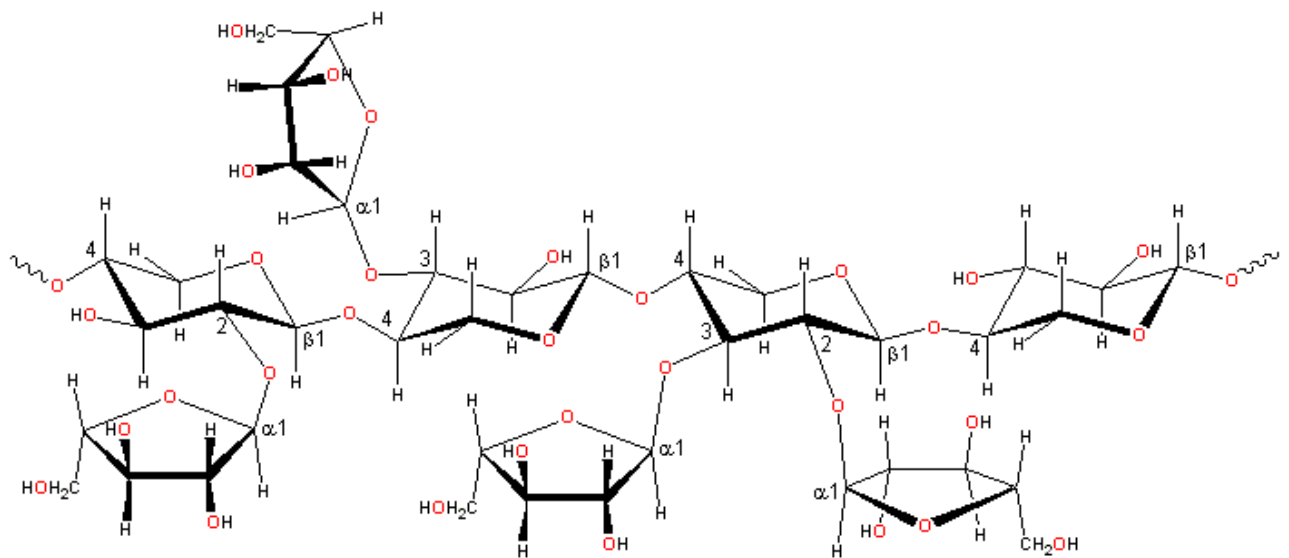
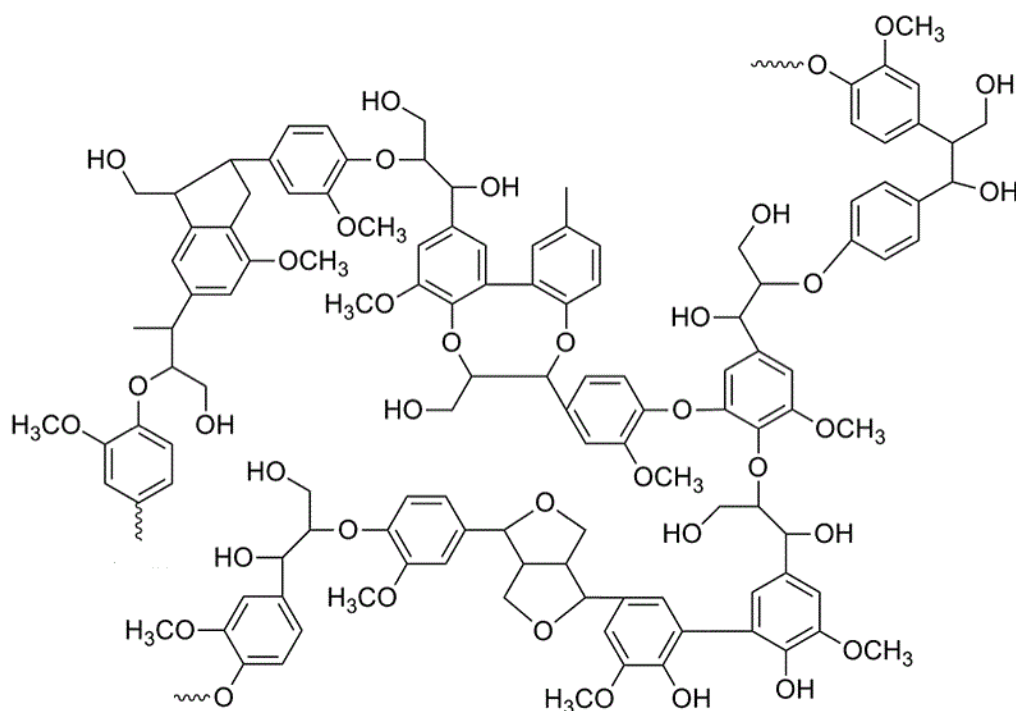


Figura 8: Representação esquemática da arabinoxilana, um tipo de hemicelulose

(fonte: <https://www.e-education.psu.edu/egee439/node/664>)

2.3.3. Lignina

A lignina é a responsável pela rigidez, impermeabilidade e resistência contra ataques microbianos à parede celular vegetal da biomassa. Além disso, está envolvida também com o transporte interno da água, nutrientes e metabólitos (BRISTOW e KOLSETH, 1986). Os monômeros predominantes da sua estrutura tridimensional amorfa são três alcoóis fenilpropiônicos: o álcool coniferílico, o sinapílico e o álcool p-cumarílico (HARMSEN et al., 2010). A lignina é geralmente referida como a conectora que liga os diferentes componentes polissacarídeos da biomassa lignocelulósica, tornando-a insolúvel na água. É reconhecida como um grande impedimento para a hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica devido à sua estreita associação com microfibrilas de celulose (AVEGERINOS e WANG, 1983). Chang e Holtzaple (2000) provaram que a digestibilidade da biomassa aumenta com o a remoção de lignina. As moléculas aromáticas mais comuns em sua estrutura são exibidas na Figura 9.



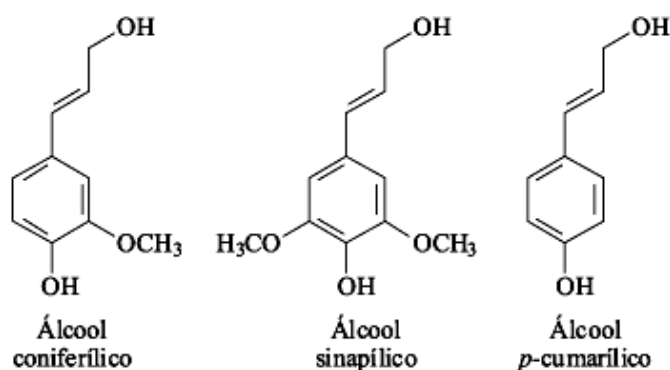


Figura 9: Esquematização da estrutura da lignina e principais unidades aromáticas presentes na lignina

(fonte: <http://www.chem.cmu.edu/groups/washburn/res-lignin.html>)

2.4. Pré-Tratamentos

Para que a biomassa lignocelulósica, como a palha, possa ser usada como matéria-prima é necessário promover a desconstrução da estrutura complexa da parede celular, principalmente no que tange à remoção da estrutura da lignina, uma barreira físico-química que dificulta o acesso à celulose. A desestruturação do complexo lignocelulósico é chamada de pré-tratamento, sendo de grande importância para a extração do produto de interesse, seja este a celulose, a hemicelulose ou a lignina. O tipo de pré-tratamento utilizado irá depender da finalidade para quais estas estruturas serão utilizadas após o processamento, visto que diferentes pré-tratamentos alteram de forma distinta o complexo lignocelulósico. Os pré-tratamentos podem ser classificados em físicos, químicos, físico-químicos e biológicos (DE CASTRO, 2009). Observe a tabela abaixo alguns desses pré-tratamentos

2.4.1. Pré-Tratamento Físico

Os pré-tratamentos físicos atuam modificando a estrutura da biomassa, diminuindo seu tamanho de partícula e aumentando a superfície de contato. Não ocorre alteração na composição química do material, contudo este processo pode promover a diminuição do grau de polimerização e de cristalinidade, o que facilita a atuação de enzimas em etapas posteriores (OGEDA e PETRI, 2010). Moagem, extrusão, micro-ondas e congelamento são exemplos dos principais pré-tratamentos físicos que podem ser utilizados.

A moagem é geralmente utilizada como primeira etapa em um processo que combinam diferentes pré-tratamentos. Existem diferentes tipos de moagens, como a de disco e a de bolas, que diminuem o tamanho das partículas por cisalhamento. Estes pré-tratamentos não formam inibidores, que atrapalhariam a etapa seguinte de hidrólise, entretanto, são processos que demandam muita energia, e por isso se tornam caros. Para reduzir a demanda energética foi desenvolvida a moagem de disco úmida, que reduz em 20% os gastos energéticos, contudo, é observado uma diminuição no rendimento da etapa subsequente de hidrólise (MOOD, GOLFESHAN, *et al.*, 2013).

A extrusão é um tratamento termo-físico que altera a estrutura da biomassa por cisalhamento, mistura e aquecimento. Uma vantagem em relação às moagens é que por se tratar de um processo contínuo, aumenta a capacidade de processamento, obtendo-se uma biomassa mais uniforme. Em biomassas lignocelulósicas se faz necessário uso de aditivos, como o glicerol, para dar mais fluidez e evitar entupimento na extrusora. Caso o aditivo utilizado interfira em alguma etapa subsequente, é necessária uma etapa de lavagem, aumentando os custos de pré-tratamento (MORO, 2015).

2.4.2. Pré-Tratamento Químico

Os pré-tratamentos químicos modificam o complexo lignocelulósico da biomassa devido a ação de compostos químicos, que degradam a lignina e a hemicelulose diminuindo a cristalinidade e o grau de polimerização da biomassa. A alteração na estrutura da biomassa depende do tipo de tratamento químico utilizado, dentre os quais se destacam: pré-tratamento ácido, pré-tratamento alcalino e organosolv (BEHERA, ARORA, *et al.*, 2014).

Os ácidos degradam principalmente a hemicelulose, originando monossacarídeos como a xilose, galactose, manose e glicose (Figura 10) (CHEN, XU, *et al.*, 2011). Devido a sua alta eficiência, o pré-tratamento com ácido sulfúrico (H_2SO_4) é o mais utilizado, entretanto pode ser realizado também com ácido nítrico, clorídrico, fosfórico e alguns ácidos orgânicos. O tratamento com H_2SO_4 pode ser realizado com ácido concentrado ou diluído. Quando concentrado, apresenta bons rendimentos na formação de glicose em baixas temperaturas, entretanto os monossacarídeos formados no processo estão suscetíveis à formação de furfural e de 5-hidroximetil-furfural (5-HMF), que são inibidores em processos de fermentação (Figura 10) (BEHERA, ARORA, *et al.*, 2014).

Além da formação de inibidores, os custos para esse processo são elevados, devido a corrosão de equipamentos e pelos processos de recuperação do solvente. Se o processo for conduzido com ácido diluído (0,1% - 2% m/v), a formação de inibidores é menor, contudo, deve-se operar a temperaturas mais elevadas para que o rendimento do tratamento seja mais eficiente (RABEMANOLONTSOA e SAKA, 2016). Contudo em altas temperaturas, os inibidores que eventualmente serão formados, podem gerar outros produtos indesejáveis, como o ácido fórmico e o ácido levulínico (BEHERA, ARORA, *et al.*, 2014).

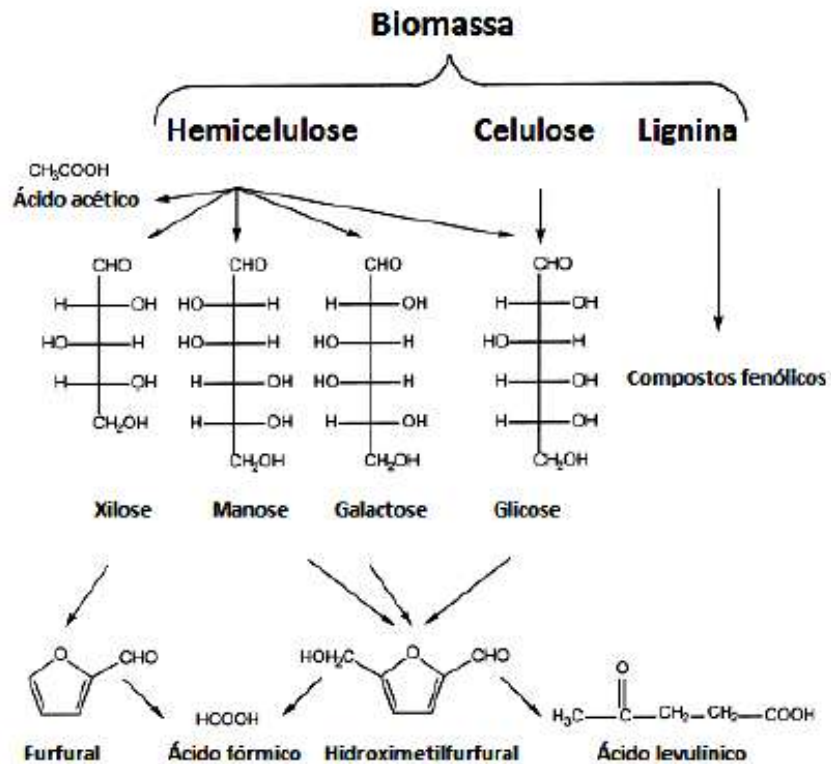


Figura 10: Formação dos componentes inibidores.

(fonte: Adaptado de PALMQVIST e HAHN-HAGERDAL, 2000)

O pré-tratamento alcalino age de forma diferente na desestruturação da biomassa, atuando principalmente na remoção de lignina. A redução na cristalinidade da celulose pode ser proporcionado pelas seguintes bases: hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, hidróxido de cálcio e ureia. O pré-tratamento alcalino pode ser conduzido a temperaturas e pressões mais amenas resultando em menor degradação de açúcares, entretanto, os tempos de reação são longos (RABEMANOLONTSOA e SAKA, 2016).

Organosolv é um método que utiliza uma mistura de solventes orgânicos com catalisadores de ácidos inorgânicos (HCl e H₂SO₄) para solubilizar a lignina e parte da hemicelulose. Este processo remove as ligações internas dessas estruturas promovendo a solubilização das mesmas no solvente. Os solventes usados nesse tratamento são: metanol, etanol, acetona, etilenoglicol, álcool tetrahidrofurfuril, entre outros (RABEMANOLONTSOA e SAKA, 2016).

2.4.3. Pré-Tratamento Físico-Químico

São pré-tratamentos que combinam processos físicos e químicos na dissolução da hemicelulose e na desestruturação na lignina. Estes processos alteram a composição química e física da biomassa, melhorando o acesso a celulose, e torna os processos enzimáticos mais eficazes. Os principais pré-tratamentos físico-químicos são: explosão à vapor, LHW (*Liquid Hot Water*) e AFEX (*Ammonia Fiber Explosion*) (BEHERA, ARORA, *et al.*, 2014).

A explosão a vapor é realizada com vapor saturado em alta pressão (0,69 – 4,83 MPa) e temperatura entre 160 – 260 °C. O vapor entra na biomassa e expande a parede celular, em seguida, a rápida descompressão degrada a hemicelulose e rompe a matriz de lignina (HARMSSEN, HUIJGEN, *et al.*, 2010). Este processo não possui alta demanda energética quando comparado a outros, contudo, pode formar inibidores, principalmente o ácido acético, que apesar de ajudar no tratamento da biomassa como um catalisador, prejudica a etapa subsequente de hidrólise (RABEMANOLONTSOA e SAKA, 2016).

O pré-tratamento LHW é semelhante ao processo anterior, porém ao invés de vapor utiliza água em alta temperatura e pressão, mantendo-a em estado líquido. A água pressurizada penetra na estrutura da biomassa e desestrutura o complexo lignocelulósico, removendo grande parte da hemicelulose. Dependendo das condições do processo, a formação de inibidores é baixa ou quase nula (BEHERA, ARORA, *et al.*, 2014).

Por fim, no processo AFEX é utilizado amônia líquida em alta temperatura e pressão. Este processo é semelhante ao de explosão a vapor, onde a amônia pressurizada entra em contato com a biomassa e é levada a uma rápida descompressão. As ligações da lignina são rompidas aumentando a acessibilidade à celulose e hemicelulose. Este pré-tratamento, assim como a explosão e o LHW, não requer etapa de redução de partículas e não forma produtos tóxicos no final do processo. Entretanto, a recuperação da amônia utilizada no processo é

difícil, e compromete a viabilidade do processo (BEHERA, ARORA, *et al.*, 2014) (RABEMANOLONTSOA e SAKA, 2016).

2.4.4. Pré-Tratamento Biológico

O pré-tratamento biológico ocorre pela degradação enzimática das estruturas que compõem o material lignocelulósico, principalmente a lignina. As enzimas que atuam neste processo são obtidas a partir de micro-organismos, como fungos, actinobactérias e bactérias, e após essa etapa de desestruturação o pré-tratado pode ser utilizado numa etapa posterior de hidrólise enzimática. Este pré-tratamento possui alto rendimento e baixa demanda energética, porém, é extremamente lento quando comparado aos outros (BEHERA, ARORA, *et al.*, 2014).

2.5. Solventes Verdes

A produção de energia a partir da química verde tornou-se uma das principais preocupações das nações ao redor do mundo. Alinhado à essa preocupação, a biomassa lignocelulósica é frequentemente defendida como uma matéria-prima indispensável para uma produção mais ecológica. No entanto, a conversão de biomassa atual não pode ser considerada totalmente verde devido ao uso de ácidos ou bases durante o seu pré-tratamento. Surge então o conceito de solventes verdes como alternativa a utilização dessas substâncias nocivas ao ambiente para o pré-tratamento de materiais lignocelulósicos. Líquidos iônicos e solventes eutéticos se encaixam nessa categoria devido ao seu desperdício mínimo, não volatilidade e baixa toxidez (QIU *et al.*, 2012).

2.5.1. Líquidos Iônicos (LI's)

Os líquidos iônicos (LI's) são denominados "solventes verdes", uma vez que não produzem químicos tóxicos, a grande maioria dos solventes podem ser recuperados (HEINZE *et al.*, 2005) e porque nenhum gás tóxico ou explosivo é formado quando manipulado (ANDERSON *et al.*, 2002), assim o pré-tratamento a partir de LI's pode ser considerado um método verde. LI's são sais que podem existir em forma líquida a

temperaturas inferiores a 100 ° C, assim como a temperatura ambiente (MARSCH *et al.*, 2004). Suas propriedades, que são diferentes de outros solventes orgânicos comuns, podem mudar variando-se o grau de deslocalização da carga aniônica e o comprimento e a simetria dos constituintes alquila dos cátions. Devido a propriedades como baixa toxicidade, baixa hidrofobicidade, alta viscosidade, baixa pressão de vapor, estabilidade térmica e propriedades não inflamáveis, seu uso requer pouca energia e apresenta um impacto ambiental mínimo. Portanto, nos últimos anos, o uso de LI's para dissolver muitos tipos de biomassas lignocelulósicas, como bagaço de cana (QIU *et al.*, 2012), palha de trigo (LI *et al.*, 2009), vem recebendo mais atenção. Em grande parte dos estudos, o pré-tratamento da biomassa a partir de LI's ocorre em pressões ambientais e temperaturas de 90 °C a 130 °C pelo período de 1 h a 24 h (ZHU *et al.*, 2006).

Muitos tipos de LI's vêm sendo testados, mas os LI's formados a partir de imidazol têm recebido a maior atenção. No entanto, nos últimos anos, LI's contendo cátions de colina e anions de aminoácidos, demonstraram ser eficazes para pré-tratamento de diferentes tipos de biomassa lignocelulósica ao remover grande parte da lignina estrutural. Esses LI's são considerados solventes mais ecológicos e econômicos do que o baseado em imidazol, uma vez que são derivados de materiais naturais e renováveis (LIU *et al.*, 2012; HOU *et al.*, 2012).

As características mais marcantes que definem os LI's como solventes verdes são descritas abaixo:

- Não volatilidade: A maioria dos LI's tem pressão de vapor muito baixa a temperatura ambiente. Isso torna os LI's uma alternativa potencial para solventes orgânicos altamente voláteis, reduzindo a quantidade de poluição do ar causada pela evaporação do solvente (BRENNECK e MAGGIN, 2011).
- Baixa toxicidade: Um dos critérios da definição de "solvente verde" é ter uma toxicidade mínima para a saúde humana e para o meio ambiente. LI's podem ser adaptados para terem efeitos tóxicos ou não tóxicos. O comprimento da cadeia alquil no cátion do LI pode ser projetada e adaptada para afetar a toxicidade de LI's (ROMERO *et al.*, 2008)
- Biodegradabilidade: Alguns líquidos iônicos são facilmente biodegradáveis enquanto outros apresentam baixa biodegradabilidade. No entanto, as propriedades inerentes aos LI's permitem que estes sejam sintonizados para aumentar a sua biodegradabilidade. Pieraccini

et al., 2007, relataram que um maior nível de biodegradabilidade pode ser obtido pela introdução de um éster na cadeia alquil dos LI's.

- **Reciclabilidade:** Em comparação com outros solventes orgânicos, um dos benefícios significativos dos LI's é que eles podem ser reciclados e reutilizados (ASIKALLA *et al.*, 2010). A recuperação efetiva do processo em larga escala de LI's pode vir a contornar o problema do seu alto custo.

- **Não corrosivo:** Um dos principais requisitos para a aplicação industrial de LI's é substituir o ácido forte que é corrosivo e precisa de equipamentos especiais que possam suportar essa condição (HERMANUTZ *et al.*, 2008). Assim, a substituição de ácidos por LI's no processo de produção elimina a necessidade de processamento químico agressivo e, portanto, reduz o risco de contaminação do meio ambiente e proporciona um local de trabalho mais seguro.

2.5.2. Solventes Eutéticos (SE's)

Os solventes verdes oferecem a oportunidade de desenvolver novos processos de dissolução de lignina em condições mais suaves. Nos últimos anos, vários estudos se concentraram em líquidos iônicos (LI's) e suas potenciais vantagens para o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica (GRÄSVIK *et al.*, 2014). Embora estes solventes sejam capazes de solubilizar lignina sem produção significativa de inibidores, o seu uso em grande escala é dificultado devido alguns problemas, tais como: o alto custo dos LI's, possível presença de toxicidade e viscosidade. Assim, os solventes eutéticos foram recentemente propostos como alternativa e o seu uso no pré-tratamento de biomassa lignocelulósica está se tornando cada vez mais significativo, pois é considerado um solvente mais verde que os LI's. O emprego de SE's é tido como mais aconselhável ao método de pré-tratamento convencional de LI's porque os SE's apresentam propriedades químicas e físicas similares às dos LI's, mas possuem benefícios adicionais, como o fácil preparo, o uso de materiais renováveis e a sua recuperação requer um método de purificação menos complicado e custoso (GUNNY *et al.*, 2015).

O solvente eutético é um fluido composto por dois ou três componentes relativamente baratos que são capazes de auto-associação via ligações de hidrogênio para formar uma mistura eutética (Figura 11). Dois sais com um alto ponto de fusão são

misturados para obter uma fase líquida com um ponto de fusão inferior ao de cada componente individual (DAI *et al.*, 2013). Sua primeira aparição foi relatada ao misturar um doador de ligação de hidrogênio e um receptor de ligação de hidrogênio, ambas em fase sólida, formando uma mistura eutética em fase líquida após mistura suave a temperatura moderada entre 60-80°C (ABBOTT *et al.*, 2004). Para certificar os SE's como solventes mais verdes do que os LI's, os componentes individuais usados para a sua formação são frequentemente selecionados de componentes não tóxicos e biodegradáveis, como cloreto de colina (ChCl), carboidratos, ácidos carboxílicos, amidas e glicerol.

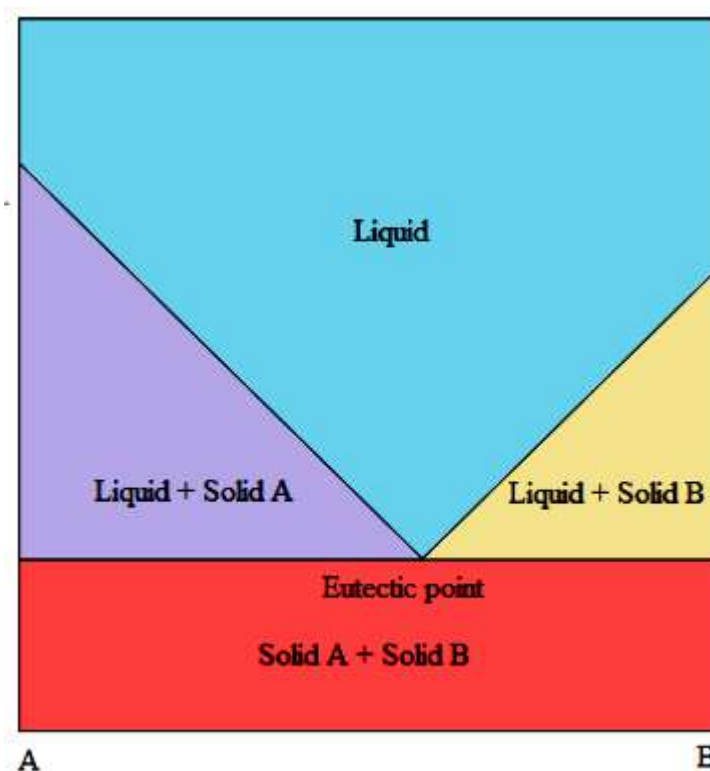


Figura 11: Representação esquemática do ponto eutético em um diagrama de fase de dois componentes.

(fonte: DEGAM, 2017)

A síntese de solventes eutéticos pode ser feita através de dois métodos distintos:

- **Aquecimento com agitação:** A mistura de dois componentes é colocada num recipiente com agitação magnética e aquecida sob a temperatura na faixa de 60-120 °C. Isso é feito até que uma solução líquida limpa homogênea seja formada, dentro de um tempo entre 60 a 90 min (ABBOTT *et al.*, 2004)

- Método de evaporação: Utilizando um equipamento com rotação, os componentes são dissolvidos em água e evaporados a 50°C. O líquido obtido é mantido em um dessecador com gel de sílica até atingir um peso constante (DAI *et al.*, 2013).

A escolha do solvente eutético a ser usado no pré-tratamento da biomassa varia de acordo com a composição percentual da lignina na biomassa lignocelulósica (XIA *et al.*, 2014). As condições de operação manipuladas durante o tratamento da biomassa para se obter a condição ótima são o tempo, a temperatura e a proporção biomassa/solvente (XIA *et al.*, 2014).

Os SE's são classificados em quatro categorias dependendo da natureza dos seus compostos de origem (SMITH *et al.*, 2014). Os SE's do Tipo I são sintetizados a partir de sal de amônio quaternário e cloreto de metal, o tipo II é composto por sal de amônio quaternário e hidrato de cloreto de metal, o tipo III é produzido com sal de amônio quaternário e um composto doador de ligações de hidrogênio e o tipo IV é formado a partir de cloreto de metal e um composto doador de ligações de hidrogênio. A partir dessa divisão, SE's do tipo III se encaixam melhor na definição de solventes verdes uma vez que são fáceis de preparar, baratos, relativamente não-reativos com água, e muitos são não tóxicos e biodegradáveis (SMITH *et al.*, 2014). A tabela 1 contém exemplos de solventes em suas respectivas categorias:

Tabela 1:Tipos de SE's, sua fórmula geral e alguns exemplos.
(fonte: DEGAM, 2017)

TIPOS	Fórmula	Termos	Exemplo
I	$Cat^+X^- + zMCl_x$	M = Zn, In, Sn, Al, Fe	ChCl / ZnCl ₂
II	$Cat^+X^- + zMCl_x \cdot yH_2O$	M = Cr, Ni, Cu, Fe, Co	ChCl / CoCl ₂ ·6H ₂ O
III	$Cat^+X^- + zRZ$	Z = OH, COOH, CONH ₂	ChCl / Uréia
IV	$MCl_x + zRZ$	M = Zn, Al, e Z = OH, CONH ₂	ZnCl ₂ / Uréia

Assim como os líquidos iônicos, os SE's são solventes quimicamente “maleáveis”, uma vez que podem ser produzidos a partir de inúmeras combinações de sais com diferentes doadores de ligação de hidrogênio. Desse modo, SE's específicos podem ser preparados de acordo com a propriedade físico-químicas mais desejada para o seu uso. A seguir, alguma das propriedades físico-químicas dos SE's são descritas.

2.5.2.1. Ponto de Fusão

Os SE's são formados ao se misturar dois sólidos capazes de gerar uma nova fase líquida. Esta nova fase é geralmente caracterizada por um ponto de congelamento inferior ao dos constituintes individuais. Por exemplo, quando o ChCl e a uréia são misturados em uma razão molar de 1 : 2 , o ponto de congelamento do solvente é 12,1 °C, o que é consideravelmente menor do que o de ChCl (302 °C) e uréia (133 °C) individualmente. A variação do ponto de congelamento decorre de uma interação entre o ânion e o componente doador de ligações de hidrogênio – nesse caso a uréia (ABBOTT *et al.*, 2004). Para todos os SE's já sintetizados, o ponto de congelamento nunca ultrapassou a temperatura de 150 °C (PAIVA *et al.*, 2014). Geralmente SE's com um ponto de congelamento inferior a 50 °C são mais atrativos, pois podem ser usado como solventes baratos e seguros em muitos campos de estudo (ABBOTT *et al.*, 2004).

2.5.2.2. Densidade

A densidade é uma das propriedades físicas mais importantes para um solvente. A maioria dos SE's apresenta densidade maior que a água, fato atribuído a diferença da organização molecular (ZHANG *et al.*, 2012). Também foi constatado que as densidades de grande parte dos SE's são maiores do que a de seu composto formador responsável pela doação de ligações de hidrogênio. Esse fenômeno pode ser explicado pela teoria “mar de Dirac” de Paul Dirac (ZHANG *et al.*, 2012). Assim como os LI's formados a partir de Imidazol , os SE's são compostos de buracos ou espaçamentos entre moléculas. Quando ocorre a mistura de compostos, o raio médio desses buracos diminuiu, resultando em um ligeiro aumento da densidade (ZHANG *et al.*, 2012).

2.5.2.3. Viscosidade

Com exceção da mistura eutética entre ChCl / Etilenoglicol a maioria dos SE's exibem viscosidades relativamente altas, se comparada com a da água, na ordem de 100 cP à temperatura ambiente (MORRISON *et al.*, 2009). A alta viscosidade dos SE's é muitas vezes atribuída à presença de uma extensa rede de ligações de hidrogênio entre cada componente, o que resulta em menor mobilidade molecular (MORRISON *et al.*, 2009). Devido às suas potenciais aplicações como solvente verde, o desenvolvimento de SE's com baixa viscosidades é altamente desejável. Badgujar e Bhanage (2015) observaram que uma menor viscosidade beneficiou a acessibilidade entre o solvente e ligações de hidrogênio de celulose.

2.6. Hidrólise enzimática e hidrólise ácida da biomassa lignocelulósica

A hidrólise tem por finalidade a obtenção de monossacarídeos derivados da celulose e da hemicelulose, os quais representam blocos de construção de importantes produtos químicos, como biocombustíveis e polímeros. Assim, corrobora-se o conceito de biorrefinaria celulósica, em que se aproveitam integralmente resíduos agroindustriais em uma determinada cadeia produtiva, agregando valor à mesma (ERIKSSON *et al.*, 2002).

Embora a composição de celulases no sistema influencie a hidrólise enzimática, o fator primordial é a dependência de características estruturais da celulose tais como cristalinidade, teor de lignina, tamanho de partícula, volume de poros e área de superfície acessível que são específicos de cada substrato (FAN *et al.*, 1980). A velocidade inicial de hidrólise enzimática é relativamente alta e diminui ao longo do tempo (ERIKSSON *et al.*, 2002).

A sacarificação da celulose é promovida por meio de rotas químicas, com ácido diluído ou concentrado, ou por rota enzimática com ação das celulases (endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidase) em conjunto (CASTRO e PEREIRA JR, 2010).

A hidrólise com ácido concentrado é promovida pela aplicação de uma solução aquosa de ácidos minerais fortes, como ácido sulfúrico, clorídrico ou fosfórico a temperaturas inferiores a 100 °C (FAN *et al.*, 1980). Tais ácidos promovem a clivagem da fração hemicelulose e celulose, no entanto a hemicelulose é hidrolisada primeiro e os monossacarídeos por ela liberados ficam expostos por muito tempo a tais condições, se

degradando (FAN et al., 1980). Além do mais, o ácido em altas concentrações gera um rejeito de grande impacto ambiental, demandando equipamentos resistentes a corrosão os quais são muitas vezes mais custosos. Na hidrólise com ácido diluído o ácido tem concentração menor do que 5 % m/v e as condições de hidrólise são otimizadas. A hemicelulose hidrolisada num primeiro momento pode ser retirada. Contudo, o processo envolve altas temperaturas (superiores a 200 °C) responsáveis por degradar os açúcares e a lignina solúvel do meio (AGUIAR, 2010).

As condições de pressão e temperatura no processo de hidrólise enzimática são brandas – pressão na ordem de 1 atm e temperatura próxima de 50°C. A elevada especificidade diminui o risco de contaminação e/ou desvio da reação a qual levaria a formação de substâncias tóxicas (furfurais e derivados de lignina). Entretanto, a alta conversão a açúcares fermentáveis pode demandar altas concentrações enzimáticas, aumentando o custo de produção que mesmo assim é mais baixo do que na hidrólise ácida, visto que a manutenção das condições do meio requer menos gastos energéticos e equipamentos menos específicos (AGUIAR, 2010; CASTRO e PEREIRA JR, 2010).

O processo de hidrólise enzimática é limitado por dois motivos: pela recalcitrância do substrato ou por inativação ou inibição enzima. O substrato influencia a hidrólise de acordo com seu grau de polimerização, cristalinidade, área superficial, porosidade e a sua heterogeneidade, responsáveis pela oferta de ligações β -glicosídicas terminais suscetíveis ao ataque enzimático. Quanto às celulasas, estas têm sua atividade afetada pelo pH, temperatura, concentração e inibição retroativa ocasionada pela concentração de produto final no meio (AGUIAR, 2010; CASTRO e PEREIRA JR, 2010;).

Capítulo 3. Justificativa

A motivação do projeto é avaliar o uso da palha de cana de açúcar para geração de bioprodutos de valor agregado, já que na atualidade, essa biomassa não é aproveitada adequadamente para fins industriais ou energéticos. Na safra 2016/2017 foi obtida uma produção de 685 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, na qual gerou cerca de 113 milhões de toneladas de palha como resíduo, o que mostra um potencial de aproveitamento dessa biomassa. Para isso, dentro do processo de conversão de biomassa a bioprodutos e biocombustíveis, será avaliada a etapa de pré-tratamento. O estudo em questão escolheu o pré-tratamento em solventes eutéticos devido a constante preocupação em eliminar ou reduzir o impacto ambiental dos tradicionais pré-tratamentos existentes, sendo também uma alternativa mais econômica ao tratamento com LI's.

Capítulo 4. Objetivos

4.1. Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho é avaliar a eficiência do pré-tratamento da palha de cana de açúcar em solventes eutéticos e potencial aplicação em grande quantidade de biomassa.

4.2. Objetivos específicos

Os tópicos a seguir apresentam os principais passos seguidos para atingir o objetivo principal desse trabalho:

- Selecionar o solvente eutético mais promissor dentre os estudados a partir de ensaios de pré-tratamento em pequena escala.
- Realizar o pré-tratamento do solvente escolhido numa escala ampliada para observar a fidelidade dos resultados obtidos em escala reduzida.
- Determinar a composição da palha *in natura* e pré-tratada e verificar se houve remoção de lignina.
- Avaliar a performance da hidrólise enzimática na palha pré-tratada.

Capítulo 5. Metodologia

Neste capítulo são apresentados os materiais utilizados nos experimentos, bem como, a descrição detalhada dos procedimentos de pré-tratamento da palha em solvente eutético, de hidrólise enzimática e de caracterização da biomassa antes e após o pré-tratamento.

5.1. Preparo das amostras

A palha de cana-de-açúcar *in natura* utilizada no presente trabalho foi gentilmente cedida pelo CTC (Centro de Tecnologia Canavieira), de Piracicaba, SP. A amostra por sua vez foi triturada e em seguida peneirada em peneiras de 1,19 mm de diâmetro sendo a menor fração armazenada em temperatura ambiente para uso no pré-tratamento. As enzimas aplicadas foram gentilmente cedidas pela empresa Novozymes. Os solventes eutéticos utilizados foram sintetizados e gentilmente cedidos pelo laboratório CleanTech da Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, sendo estes, Ácido Lático/Alanina, Ácido Lático/Glicina, Ácido Lático/Histidina, Ácido Lático/Prolina, Uréia/Prolina, Ácido Oxálico/Prolina, Ácido Propiônico/Prolina, Cloreto de Colina/Ácido Fenil Acético, Cloreto de Colina/Glicerol, Cloreto de Colina/Uréia, Cloreto de Colina/Ácido Lático, Cloreto de Colina/Ácido Malônico, Cloreto de Colina/Etileno Glicol, Cloreto de Colina/Ácido Oxálico, Cloreto de Colina/Ácido Propiônico, Cloreto de Colina/Ácido Acético. Os solventes eutéticos foram sintetizados com base no método de aquecimento com agitação descrito por ABBOTT *et al* (2003). Os diferentes compostos químicos foram adicionados a um béquer em diferentes proporções molares para a produção dos solventes (Tabela 2).

Tabela 2: Proporção molar utilizada para a síntese de cada solvente eutético

SOLVENTE EUTÉTICO	Proporção molar	
ChCl/Uréia	1	2
ChCl/Ác. Acético	1	2
ChCl/Glicerol	1	2
ChCl/Ác. Lático	1	2
ChCl/Ác. Malônico	1	2
ChCl/Ác. Propiônico	1	2
ChCl/Ác. Fenil Acético	1	2
ChCl/Etileno Glicol	1	2
ChCl/Ác. Oxálico	1	2
Ác. Lático/Alanina	9	1
Ác. Lático/Glicina	9	1
Ác. Lático/Histidina	9	1
Ác. Lático/Prolina	2	1
Uréia/Prolina	2	1
Ác. Oxálico/Prolina	1	1
Ác. Propiônico/Prolina	2	1

5.2. Pré-tratamento em pequena escala

Em um tubo de ensaio com tampa de rosca de 12 mL adicionou-se 0,1g de palha *in natura* e em seguida 1g do solvente eutético, a fim de se obter uma relação de 1:10 em massa. Em seguida, o tubo foi fechado e colocado em banho de óleo a uma temperatura de 110 °C durante 90 minutos. A proporção massa:solvente é a indicada para haver boa agitação. Já a temperatura e o tempo de reação são apontados pelo autor como adequados para que haja desconstrução da biomassa minimizando sua degradação. Após esse período, as amostras foram retiradas do banho e recolhidas para posterior análise de caracterização da lignina e quantificação dos açúcares totais. O solvente que apresentou o melhor resultado dentro desses experimentos foi selecionado para o pré-tratamento em maior escala e posterior hidrólise enzimática. Abaixo, na Figura 12, uma demonstração dos pré-tratamentos realizados.



Figura 12: Experimentos do pré-tratamento em pequena escala para seleção do melhor Solvente Eutético

5.3. Caracterização da Lignina

Os espectrogramas da lignina foram obtidos na faixa de 200 a 700 nm no aparelho Espectramax do laboratório CleanTech. Para isso foi procedida a metodologia proposta por Mohamad Ibrahim e Chuah (2004). Uma amostra de 5 mg de lignina foi dissolvida em 10 mL de solução 90% (v/v) de dioxano-água. Dessa alíquota, extraiu-se uma amostra de 1 mL e diluiu-se em 25 mL de uma solução 50% (v/v) de dioxano-água.

A partir da curva padrão de lignina, as amostras pré-tratadas, que apresentaram uma coloração mais escurecida – indicando presença de lignina, também foram submetidas ao aparelho Espectramax na faixa de 200 a 700 nm, para analisar qual solvente foi capaz de solubilizar uma maior quantidade de lignina. Todas as análises foram feitas em triplicata.

5.4. Teste Fenol-Sulfúrico

Para a determinação dos açúcares totais liberados após o pré-tratamento da biomassa empregou-se o método do Fenol-Sulfúrico descrito por Dubois et al (1959) com adaptações

na quantidade dos reagentes. Para isso, adicionou-se 10 mg do sobrenadante dos ensaios de pré-tratamento em um eppendorf de 2 mL. Em seguida, também foram adicionados 270 µL de água destilada, 270 µL de fenol 5% e 1460 µL de H₂SO₄ 98%. A reação foi conduzida por 30 minutos, isto é, o tempo necessário para que a mistura esfriasse até temperatura ambiente.

Os teores de açúcares totais de cada amostra foram determinados utilizando-se espectrofotometria a partir do aparelho Espectramax a um comprimento de onda de 490 nm. Utilizou-se como curva padrão cinco soluções de glicose com concentrações de 0,1 g/L, 0,08 g/L, 0,06 g/L, 0,04 g/L, 0,02 g/L.

5.5. Pré-Tratamento em escala ampliada

Após a determinação do solvente que apresentou o melhor resultado para o pré-tratamento da palha *in natura* em pequena escala, o experimento foi reproduzido em escala ampliada com o propósito de determinar se uma futura aplicação industrial seria viável.

Procurou-se reproduzir as mesmas condições usadas para o pré-tratamento de menor proporção. Para tal, o ensaio foi aquecido em banho de óleo na temperatura constante de 110°C durante 90 minutos. Contudo, para promover a homogeneização da mistura utilizou-se um agitador tipo âncora na rotação de 100 rpm imerso em um béquer de 2 litros. Durante o experimento constatou-se que não era possível reproduzir a proporção de 1:10 em massa de palha:solvente uma vez que a mistura apresentou enorme viscosidade. Dessa maneira adotou-se a proporção mais próxima dos testes em menor escala que tornou o experimento viável. Foram então adicionados 150 g de palha pré-tratada em 1,1 Kg de solvente, obtendo uma relação em massa de 1:7,3. Após o pré-tratamento, a biomassa passou por um processo de lavagem para a retirada de solvente e impurezas solubilizadas na sua estrutura. Para isso foi feita uma filtração em 4 etapas, todas utilizando papel de filtro quantitativo unifil C40 faixa branca. Nas 2 primeiras etapas foram adicionado 200 mL de uma solução 50% (v/v) de acetona-água para uma amostra de 100g de biomassa pré-tratada. A solução foi então filtrada até adquirir aspecto seco. O mesmo procedimento foi feito nas 2 últimas etapas, mas dessa vez, adicionando 200 mL de água para 100g de biomassa.

5.6. Caracterização da palha *in natura* e pré-tratada

Foi realizada uma etapa de caracterização da palha *in natura* e da palha pré-tratada com Cloreto de Colina/Uréia. O procedimento seguiu o protocolo descrito por Sluiter e colaboradores (2011) a fim de se quantificar sólidos totais, cinzas, extrativos, determinação de carboidratos estruturais e lignina insolúvel. A fração de lignina solúvel não pôde ser quantificada nas amostras pré-tratadas uma vez que sua quantificação torna-se imprecisa após o pré-tratamento que leva a alteração da estrutura da lignina.

5.6.1. Determinação de sólidos totais, umidade e cinzas

O teor de sólidos totais foi determinado por meio da perda de umidade, 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, esfriados em um dessecador por 30 min para serem pesados e tarados. A biomassa foi então pesada e posta na estufa, na mesma temperatura *overnight*. Após esse período, a biomassa seca foi pesada e umidade calculada. Para determinação das cinzas totais foi calculada a diferença de massa entre a soma do cadinho com as cinzas e a massa do próprio cadinho, o procedimento é similar ao da umidade, porém em cadinho levado a mufla a 575 °C.

5.6.2. Determinação de extrativos

Nesta etapa, utilizou-se o método por extração de Soxhlet, em que cartuchos de celulose atuam como uma membrana, para que ao final do processo ficasse apenas o complexo lignocelulósico extraído dentro do cartucho. Os cartuchos foram previamente tarados a 105 °C, pesados, e colocou-se a quantidade de 1 grama de biomassa.

A extração foi feita, primeiramente, com água destilada (95 ± 5 mL), sendo a temperatura da manta de aquecimento ajustada de uma maneira que fornecesse 4 a 5 sifonações por hora. O processo perdurou por um intervalo de tempo necessário para que o líquido ao redor do cartucho se tornasse transparente (aproximadamente 6 horas). Após a extração feita com água destilada, o mesmo procedimento foi repetido, porém com álcool etílico 95 %. Seis amostras foram extraídas simultaneamente de forma que, ao término do procedimento, três cartuchos foram levados à estufa a 40 °C, para serem posteriormente

utilizados na hidrólise ácida para determinação de carboidratos e lignina, e outros três cartuchos foram conduzidos à estufa a 105 °C, para a determinação dos extrativos. O cálculo dos extrativos se dá pela diferença de massa entre o bagaço antes e depois do processo de extração. Abaixo, a Figura 13 contém a representação do experimento de extração tanto para água destilada como etanol 95%.



Figura 13: Esquemática do experimento de remoção de extrativos

5.6.3 Determinação de carboidratos e lignina

No procedimento, $0,300 \text{ g} \pm 0,010 \text{ g}$ de amostra com umidade inferior a 10 % foram transferidos quantitativamente para tubos de hidrólise aos quais foram acrescentados 3 mL de H_2SO_4 72 %, e foram postos em banho-maria em temperatura de 30 °C por 1 h agitando-os com o auxílio de uma haste de teflon. Após, as amostras foram retiradas do banho e diluídas para 4 % de H_2SO_4 adicionando $84 \text{ mL} \pm 0,04 \text{ mL}$ de H_2O ultrapura deionizada.

Paralelamente, foi preparada a hidrólise ácida de um padrão de recuperação de açúcares adicionando a tubos de hidrólise 10 mL de solução padrão, contendo 3 g/L de glicose, 2 g/L de xilose, 1 g/L de galactose e arabinose, e $348 \mu\text{L}$ de H_2SO_4 72%, a fim de mimetizar a concentração de açúcares potenciais das amostras. Tal padrão tem por objetivo estabelecer o efeito do ácido ao longo do procedimento em autoclave sobre as soluções de

açúcar de concentrações conhecidas, estimando o percentual de açúcares que deveria ser recuperado da amostra para ao fim aplicar um fator de correção nos cálculos procedentes.

Preparado o padrão e as amostras, os tubos foram autoclavados por 1 h a 121 °C, 1 atm. Transcorrido o tempo de reação, as amostras foram resfriadas em banho de gelo e filtradas a vácuo em cadinho do qual foi feito peso seco após ficar na mufla a 575 °C *overnight*. O primeiro filtrado foi separado, armazenado e em seguida o tubo foi lavado com água até que toda a biomassa fosse recolhida. A amostra foi levada a estufa a 105 °C por 24 h, enquanto que o padrão de recuperação e 20 mL do filtrado separado foram neutralizados com CaCO₃ até que o pH atingisse uma faixa entre 5 e 6. Em seguida, o material neutralizado foi centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos para recolher o sobrenadante. Os padrões de recuperação e as amostras neutralizadas foram separados para análise posterior, assim como uma amostragem do padrão de recuperação de açúcares que não foi hidrolisado. Todos posteriormente foram analisados em HPLC.

5.7. Dosagem enzimática

Foi quantificada a atividade enzimática de FPase da enzima comercial Celluclast 1.5 L. Para a dosagem da concentração dos açúcares redutores liberados nas reações enzimática, foi usada a metodologia DNS (Ácido 3,5-dinitrosalicílico) (MILLER, 1959). O reagente DNS foi preparado misturando-se 10g do Ácido 3,5-dinitrosalicílico, 16g de hidróxido de sódio e 300g de sal de Rochelle (tartarato duplo de sódio e potássio), juntamente com H₂O destilada até ser completado o volume de 1000 ml (TEIXEIRA, SILVA, *et al.*, 2012).

5.7.1 Atividade de FPase

Foi utilizada a metodologia padrão descrita pela IUPAC para se determinar a atividade da celulase em FPU/mL sobre o papel de filtro (GHOSE, 1987). No meio reacional foram colocados 0,5ml de enzima comercial, previamente diluído em tampão citrato de sódio 50 mmol/L e pH 4,8, além de 1,0ml deste mesmo tampão citrato de sódio e uma tira de papel de filtro Whatman n°1 (aproximadamente 50 mg). As soluções foram incubadas a 50°C durante 60 minutos. Após este período foram resfriadas em banho de gelo, e para interromper

a reação adicionou-se 3 ml de DNS, fervendo as soluções durante 5 minutos e novamente resfriado-as em banho de gelo. Após o resfriamento, foram adicionados 20 ml de H₂O destilada em cada uma das soluções e feita a leitura da absorbância em 540 nm. Para a determinação da concentração de açúcares, uma curva padrão de glicose foi construída de acordo com o recomendado por Ghose (1987).

5.8. Hidrólise enzimática

Neste estudo foi realizada a hidrólise de amostras de bagaço pré-tratado com o solvente eutético Cloreto de Colina/Uréia a fim de determinar a eficiência do pré-tratamento para diferentes cargas enzimáticas. Para tal, foram realizados ensaios com a quantidade de biomassa fixada em 10% (p/p), na presença do sistema aquoso contendo tampão e enzima Celluclast 1.5L, em diferentes proporções de acordo com as cargas enzimáticas usadas.

Foi preparada uma solução mãe com tampão citrato de sódio 50 mM, mantendo o pH a 4,8, e enzima Celluclast 1.5L diluídas em tampão, cuja dosagem da FPase foi variada de 10, 15 e 20 FPU/g de biomassa. As amostras de palha pré-tratada foram pesadas diretamente em *Erlenmeyers* de 250 mL onde foram acrescidas as devidas proporções da solução mãe. Para garantir ausência de possíveis contaminantes microbianos, foi adicionado ao sistema 0,02% (p/v) de azida sódica de modo que o meio reacional fosse de 50g. Após a montagem do sistema, os *Erlenmeyers* foram vedados e incubados em *shaker* com agitação orbital de 180 rpm a 50 °C. Alíquotas foram retiradas com tempos de reação de 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8h, 10h, 24 h, 28h, 32h e 48h. Cada amostra foi armazenada em microtubos de 2,0 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 para posterior análise do sobrenadante por cromatografia líquida de alta performance (HPLC).

Para determinação do rendimento de hidrólise, é utilizada a seguinte equação (SIQUEIRA *et al.*, 2016):

$$R(\%) = \frac{[Glicose]}{[Celulose]} \times 0,9$$

Onde:

R: rendimento da hidrólise

[Glicose]: concentração de glicose da biomassa (g/l)

[Celulose]: concentração de celulose da biomassa (g/l)

0,9: fator de conversão da celulose

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

As amostras foram quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), sendo injetadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu (Shimadzu Corporation, Japão- modelo LC-10AT), equipado com os seguintes módulos: degaseificador (modelo DGU-14A), bomba (modelo LC-10AT), autoinjeter (modelo SIL-20A), forno para coluna (modelo CTO-10AS) e detector UV-VIS (modelo SPD-10AV) conectado em série com detector de índice de refração (modelo RID-10A). A aquisição e o tratamento dos dados foram realizados pelo software Class VP 6.1 (Shimadzu Corporation, Japão). Foi utilizada a coluna Aminex HPX-87P sendo a fase móvel uma solução 5mM de ácido sulfúrico com vazão de operação de 0,8 mL/min e temperatura de 60°C.

Capítulo 6. Resultados e Discussão

Neste capítulo são apresentados os principais resultados e análises referente ao pré-tratamento em pequena escala da palha de cana-de-açúcar com os solventes eutéticos, assim como o pré-tratamento em escala aumentada e os resultados da hidrólise enzimática para o SE previamente escolhido.

6.1. Pré-tratamento da palha de cana de açúcar com Solvente Eutético em escala menor

A palha de cana-de-açúcar foi submetida ao pré-tratamento com os 16 diferentes solventes eutéticos descritos na seção 5.1 para estudos sobre a interação desses solventes junto ao complexo lignocelulósico. O pré-tratamento para ser eficiente deve ser capaz de interagir, sobretudo, com as estruturas de lignina, que funcionam como barreiras ao acesso à celulose (DE CASTRO, 2009). Para observar o comportamento de cada um dos 16 SE's estudados, analisou-se a fase líquida das amostras após o pré-tratamento através de espectrogramas em diferentes comprimentos de onda. Os espectros apresentaram características de lignina, com absorvância máxima em 280nm, como era esperado (FENGEL e WEGNER, 1984), e assim foi possível determinar as concentrações de lignina solubilizadas após o pré-tratamento. Os resultados obtidos podem ser verificados na Figura 14.

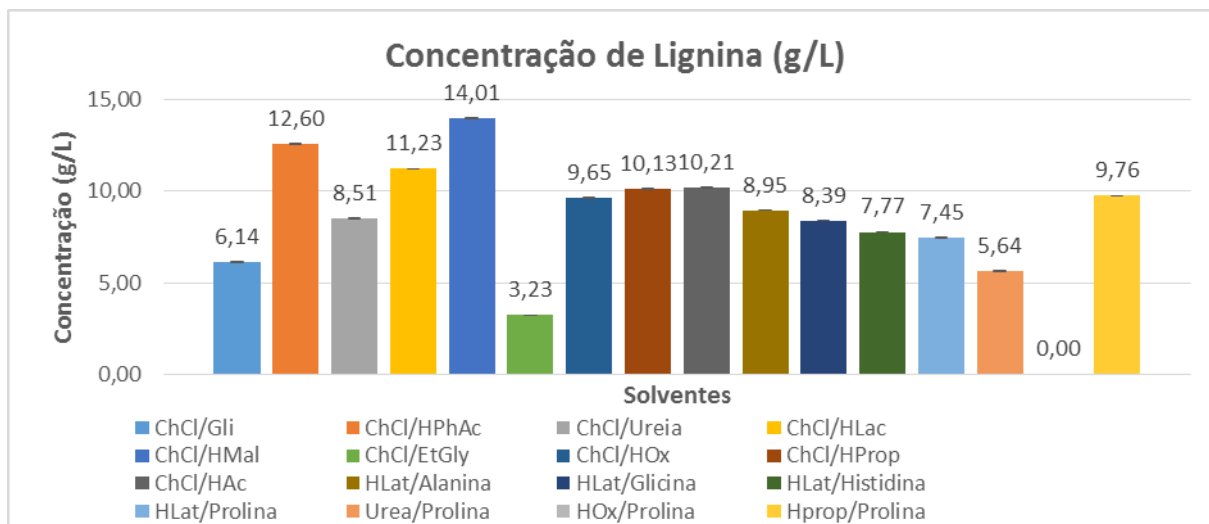


Figura 14: Concentração de lignina pós pré-tratamento em pequena escala

Os solventes que mostraram melhores resultados no pré-tratamento foram o ChCl/HMal, com $14,01 \pm 0,0297$ g/L de lignina solúvel, ChCl/HPhAc, com $12,60 \pm 0,0152$ g/L e ChCl/HLac com $11,23 \pm 0,0167$ g/L. Grande parte dos solventes apresentaram resultados numa faixa média de 7,5 a 10 g/L.

Os solventes baseados em cloreto de colina tendem a ter melhores resultados do que os solventes compostos somente por ácidos orgânicos, isso porque o íon Cl^- são fortes aceptores de ligação de hidrogênio e interagem intensamente com os grupamentos doadores de ligação de hidrogênio presentes na lignina. Essas ligações formadas são capazes de desestruturar o complexo lignocelulósico rompendo as ligações existentes, principalmente entre a lignina e hemicelulose (LIU, CHEN, *et al.*, 2017).

Além de se estudar a interação dos solventes com a lignina, também foi analisada a remoção de celulose. A solubilidade desse biopolímero foi avaliada indiretamente a partir da quantificação de açúcares totais do líquido sobrenadante dos mini ensaios de pré-tratamento com os solventes eutéticos pelo teste do fenol sulfúrico. Em consequência de a celulose ser um polímero de monômeros de glicose, esse açúcar foi escolhido como o sacarídeo representativo do ensaio. A Figura 15 contém os resultados da concentração de glicose obtidos após o pré-tratamento:

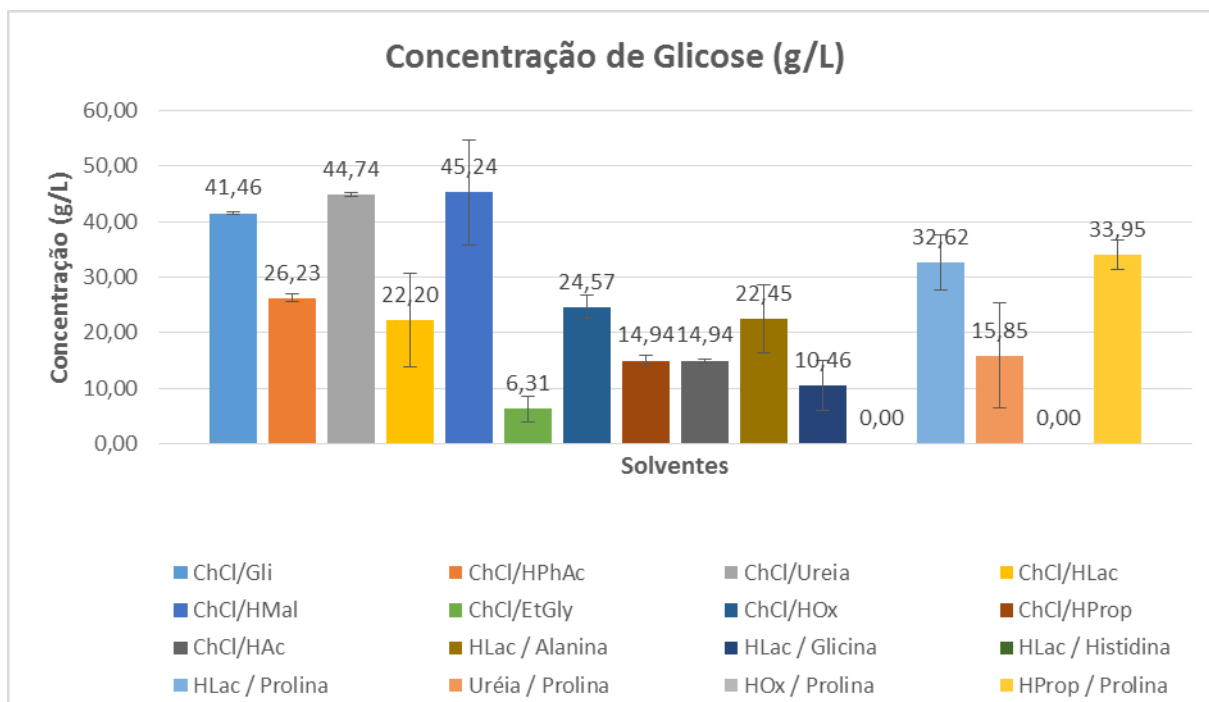


Figura 15: Concentração em g/L de glicose do meio líquido após pré-tratamento

Como é possível observar, os solventes eutéticos que obtiveram o melhor resultado para a dissolução de lignina foram ChCl/Glicerol, ChCl/Uréia, ChCl/Ácido Malônico e Ácido Oxálico/Prolina. Vale destacar que as amostras contendo ácido oxálico formaram uma mistura de solvente e palha pouco úmida, provocando a presença de fibras de palha durante a análise de ART pelo fenol sulfúrico, o que sugere um aumento na concentração de glicose acima do normal, portanto seu valor foi desconsiderado..

Em geral, a maioria dos solventes eutéticos não apresentam boa dissolução de celulose (Dominguez de Maria, 2014), contudo ensaios recentes de Ren et al.(2016) demonstraram que solventes eutéticos a base de cloreto de colina apresentaram solubilidades de celulose relativamente elevadas para a sua razão molar otimizada. Entre estes, os que apresentaram melhores resultados foram ChCl/Imidazol, ChCl/Tiocianato de Amônio e ChCl/Uréia. A essência da dissolução de celulose é a quebra de ligações de hidrogênio da sua estrutura molecular (Ren et al., 2016). Com base no mecanismo de doador e receptor de elétrons, a acessibilidade das ligações de hidrogênio para um solvente está associada à sua capacidade de dissolução (Pinkert et al., 2010; Liu et al., 2011). Portanto, a basicidade da ligação de hidrogênio de solventes eutéticos a base de

cloreto de colina controla a solubilidade da celulose, se comparado aos seus efeitos de polarização (Ren et al., 2016).

Diante dos resultados obtidos, eleger um único solvente como o melhor não é uma tarefa fácil. Isso porque o melhor vai depender da finalidade visada aos produtos obtidos pela palha. O principal objetivo do pré-tratamento é a deslignificação da biomassa para aumentar a acessibilidade da celulose que representa às biorrefinarias uma potencial fonte de carbono renovável com aplicações em processos de bioconversão de açúcares a biocombustíveis (BRAGA et al., 2009).

Entretanto, tem crescido o interesse na otimização dos recursos para agregar valor a todas as substâncias envolvidas no processo, como é o caso da lignina. Nos solventes analisados, observa-se a existência dos que tem maior capacidade de dissolução de polissacarídeos e de lignina ao mesmo tempo, dos que possuem apenas uma dessas características e dos que não apresentaram capacidade de dissolução em nenhuma das análises. Observe a Tabela 3.

Solventes que apresentaram uma alta dissolução de polissacarídeos e baixa de lignina podem ser interessantes mesmo que não tenha causado uma grande deslignificação. Isso porque é possível recuperar os polissacarídeos dissolvidos apenas com a adição de H₂O (XU, SUN, *et al.*, 2007), além de ter desestruturado o complexo lignocelulósico, esperando-se melhores rendimentos numa hidrólise enzimática.

SE's nos quais a dissolução de polissacarídeos não é muito alta, porém apresentam uma boa deslignificação, podem ser úteis, isso porque a principal estrutura que dificulta o acesso enzimático a celulose consegue ser removida de forma considerável. Contudo é possível que estes solventes não se mostrem capazes de grandes modificações na cristalinidade do material, o que pode não gerar rendimentos satisfatórios na etapa de hidrólise.

Tabela 3: Comportamento dos SE's no pré-tratamento

Solventes	Elevada/Satisfatória	Alta
	concentração de glicose	Solubilização de
	(< 30 g/L)	Lignina
		(< 7 g/L)
ChCl/Gli	SIM	NÃO
ChCl/HPhAc	NÃO	SIM
ChCl/Ureia	SIM	SIM
ChCl/HLac	NÃO	SIM
ChCl/Hmal	SIM	SIM
ChCl/EtGly	NÃO	NÃO
ChCl/HOx	NÃO	SIM
ChCl/HProp	NÃO	SIM
ChCl/HAc	NÃO	SIM
HLac / Alanina	NÃO	SIM
HLac / Glicina	NÃO	SIM
HLac / Histidina	NÃO	SIM
HLac / Prolina	SIM	SIM
Uréia / Prolina	NÃO	NÃO
HOx / Prolina	SIM	NÃO
HProp / Prolina	SIM	SIM

Pode-se dizer que os solventes cuja dissolução de polissacarídeos e de lignina apresentaram bons resultados, possivelmente causaram maior desestruturação no complexo lignocelulósico, removendo tanto lignina quanto hemicelulose. Este

fracionamento pode ser interessante para a indústria, agregando valor a essas substâncias ao longo da cadeia produtiva, além de se esperar melhores rendimentos em uma etapa de hidrólise enzimática. Entretanto a separação deste material tende a ter um custo maior, já que se faz necessária lavagem com H₂O (remoção de polissacarídeos) e uma lavagem alcalina, com acetona (remoção de lignina) (DI MARINO, STOCKMANN, *et al.*, 2016). Observe na Figura 16, a diferença das soluções obtida com a adição de solução 50% (v/v) de acetona em SE de uréia e de glicerol. É possível observar maior deslignificação na primeira amostra, da uréia, evidenciado pelo escurecimento do sobrenadante.



Figura 16: amostras dos solventes de ureia e de glicerol após o pré-tratamento e adição de solução 50% (v/v) acetona

Para o pré-tratamento em maior escala, foi escolhido o solvente que apresentou as características descritas no parágrafo acima, justamente pela variedade de possibilidades de bioprodutos que podem ser obtidos a partir da obtenção desses componentes lignocelulósicos. Os solventes que apresentaram essas características foram ChCl/Uréia, ChCl/Ácido malônico, HLaC/Prolina e HProp/Prolina, entretanto os dois primeiros apresentaram os melhores resultados nas análises, sobretudo na dissolução de polissacarídeos. Foi escolhido o solvente ChCl/Uréia para a realização do pré-tratamento em escala maior, isso porque apesar do solvente formado por Ácido malônico ter apresentado resultado melhor em relação a deslignificação, ele possui uma maior

viscosidade, o que dificulta o manuseio principalmente em escalas maiores. À 25°C, a viscosidade do SE de ChCl/Ureia é 750 cP enquanto o do ChCl/Ácido Malônico é de 1124 cP (ZHANG, VIGIER, *et al.*, 2012). Outro fator relevante para a escolha do solvente foi o custo da matéria-prima, para a sua produção. Como a ureia possui um valor de mercado mais baixo que o ácido malônico, o SE de ChCl/Ureia foi o escolhido.

6.2. Caracterização química da palha *in natura* e da palha pré-tratada com solvente eutético

Após o pré-tratamento, foi recuperada uma quantidade de 105g de palha pré-tratada e a partir dela foi realizada a caracterização química que permitiu quantificar os constituintes estruturais da palha pré-tratada com solvente eutético comparando com a caracterização da palha *in natura*, possibilitando assim a avaliação do efeito do pré-tratamento na estrutura da biomassa. Na Tabela 4 estão dispostos o percentual de massa seca de carboidratos estruturais, da lignina, cinzas e extrativos presentes nas diferentes biomassas. Enquanto que na Tabela 5 encontram-se os percentuais obtidos dos constituintes principais da biomassa lignocelulósica - celulose, hemicelulose e lignina – para ambas as palhas.

Tabela 4: Caracterização química dos componentes das palhas expressa em porcentagem de massa seca

Composição (%)	Palha <i>in natura</i>	Palha Pré-tratada
Lignina	24,70 ± 0,50	14,75 ± 2,03
Glucana	32,01 ± 0,37	36,90 ± 3,00
Xilana	17,75 ± 0,48	21,11 ± 1,43
Arabinana	1,42 ± 0,05	1,77 ± 0,02
Cinzas	5,94 ± 0,31	8,66 ± 0,33
Extrativos	10,45 ± 0,81	-
TOTAL	92,28	83,19

Tabela 5: Caracterização dos principais constituintes da biomassa em porcentagem de massa seca

Composição (%)	Palha <i>in natura</i>	Palha Pré-tratada
Lignina	24,70 ± 0,50	14,75 ± 2,03
Celulose	32,01 ± 0,37	36,90 ± 3,00
Hemicelulose	19,17 ± 0,53	22,88 ± 1,43
Cinzas	5,94 ± 0,31	8,66 ± 0,33
Extrativos	10,45 ± 0,81	-
TOTAL	92,28	83,19

A glucana, xilana e arabinana expressas nos resultados correspondem a polissacarídeos compostos por monômeros de glicose, xilose e arabinose, respectivamente, que são os principais açúcares presentes na biomassa lignocelulósica. Nota-se que os valores percentuais de todos esses açúcares aumentaram após a palha passar pelo pré-tratamento, indicando que a desestruturação do complexo recalcitrante da biomassa *in natura* foi promovida principalmente pela remoção lignina. Esse fato confirma a literatura uma vez que como parte da lignina está na forma de composto fenólico, os solventes eutéticos que tem cloreto de colina como base são particularmente úteis na separação desses compostos (Tang *et al.*, 2015). Além disso, solventes eutéticos são associados à deslignificação e à redução da cristalinidade da celulose porque são capazes de doar e aceitar prótons e elétrons (Vigier *et al.*, 2014). Esta característica dos SE's possibilitou a formação de ligação de hidrogênio com outros compostos, aumentando a sua capacidade de solvatação (Paiva *et al.*, 2014).

Apesar do aumento da proporção de glucanas após o pré-tratamento, observa-se que essa elevação foi pequena. Recentes estudos mostram que a maioria dos SE's não apresenta uma boa dissolução de celulose (Dominguez *et al.*, 2014). De acordo com Virgier *et al.* (2015), o motivo poderia ser a existência de fortes redes de ligações de hidrogênio, tanto pela celulose como pelo SE, na qual a dissolução da celulose no solvente requer que duas

redes de ligações de hidrogénio sejam dissociadas para formar um sistema termodinamicamente estável (Vigier *et al.*, 2015). Devido à forte energia coesiva da celulose, a sua dissolução é difícil.

Outro dado relevante é que a quantificação dos extrativos no material pré-tratado foi desprezada imaginando que somente o pré-tratamento seria necessário para a sua remoção. Contudo, com o valor da composição total correspondendo a 83,19%, bem abaixo dos 92,28% da *in natura*, é muito possível que o pré-tratamento não foi capaz de removê-los. Como o processo de caracterização da biomassa adotado envolve muitas etapas, é aceitável que o balanço de massa fique em torno de 80-100%.

A partir dos dados da caracterização, constatou-se uma remoção de cerca de 40,2% da lignina após o pré-tratamento. Com relação a estrutura do complexo celulósico, não é possível fazer alguma afirmação acerca da quebra da sua cristalinidade. De modo geral, apenas com os resultados da composição estrutural da biomassa, é possível afirmar que o pré-tratamento foi efetivo, uma vez que a remoção da lignina é o principal impedimento para a hidrólise da celulose.

6.3. Hidrólise enzimática

A partir dos resultados de análise dos solventes, o que apresentou melhores condições para um possível uso em escala industrial foi o ChCl/Uréia. Foram realizados ensaios de hidrólise para se observar a eficiência do pré-tratamento realizado. Para uma carga de massa fixa (10% m/m), realizou-se o ensaio com três condições diferentes de carga enzimática, 10, 15 e 20 FPU.

Foram analisados os cromatogramas obtidos pelo HPLC, e a partir deles foi possível encontrar as concentrações de glicose e xilose ao longo do tempo de reação, e assim entender a cinética de formação desses açúcares (Figuras 17 e 18).

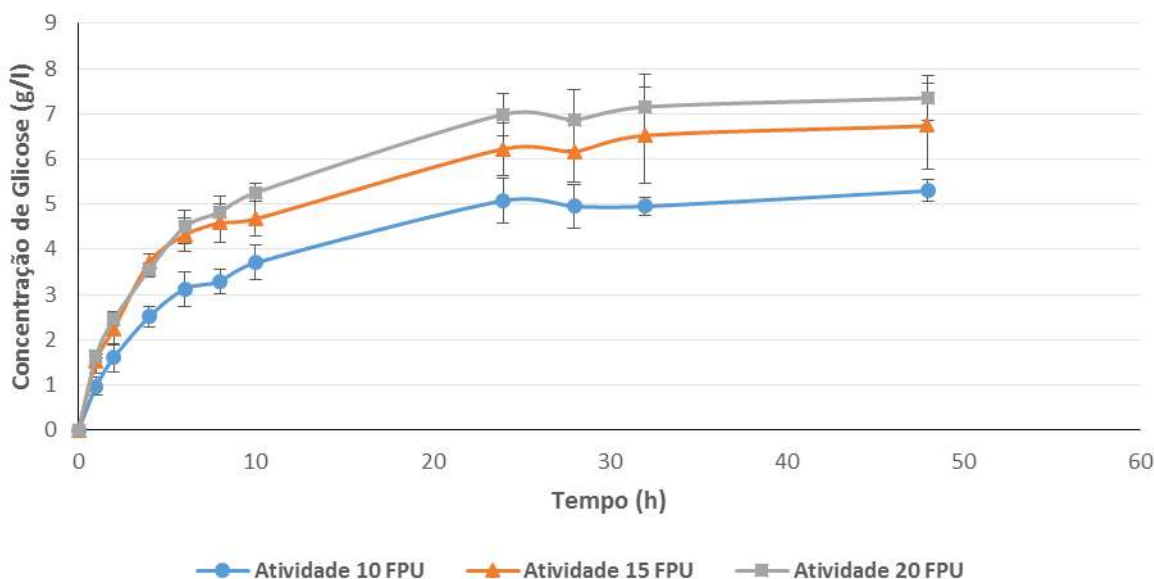


Figura 17: Cinética de Formação de Glicose ao longo da Hidrólise Enzimática.

É possível perceber que nas primeiras 8 horas de reação, os ensaios de atividade 15 e 20 FPU apresentaram um perfil cinético muito parecido e só a partir de 10 horas que os ensaios começaram a apresentar resultados um pouco diferentes. Os rendimentos calculados de hidrólise referente a cada condição estão na Tabela 6.

Tabela 6: Rendimento de Glicose na hidrólise enzimática

Carga Enzimática / g de biomassa	10 FPU	15 FPU	20 FPU
Rendimento de Glicose	13%	17%	19%

A melhor condição para a hidrólise se mostrou a de 15 FPU mesmo a condição de 20 FPU tendo alcançado melhor resultado de rendimento. Isso porque ao analisar o perfil cinético, nota-se que a formação de glicose é praticamente igual nas primeiras horas de reação, e no final da reação os resultados são muito próximos. No tempo de 48h de reação a condição de 15 FPU apresentou uma concentração de glicose de $6,73 \pm 0,9589$ g/L enquanto para 20 FPU a concentração foi de $7,35 \pm 0,48831$ g/L. Portanto como essas condições

apresentam perfis parecidos, considera-se o fator de custo das enzimas ao se escolher a condição de 15 FPU como a mais indicada (usa menos enzima). Para esta atividade obteve-se um valor de rendimento de 17%, este resultado não era esperado, uma vez que foi considerável a deslignificação da palha durante o pré-tratamento, o que aumentaria a disponibilidade da celulose ao ataque enzimático.

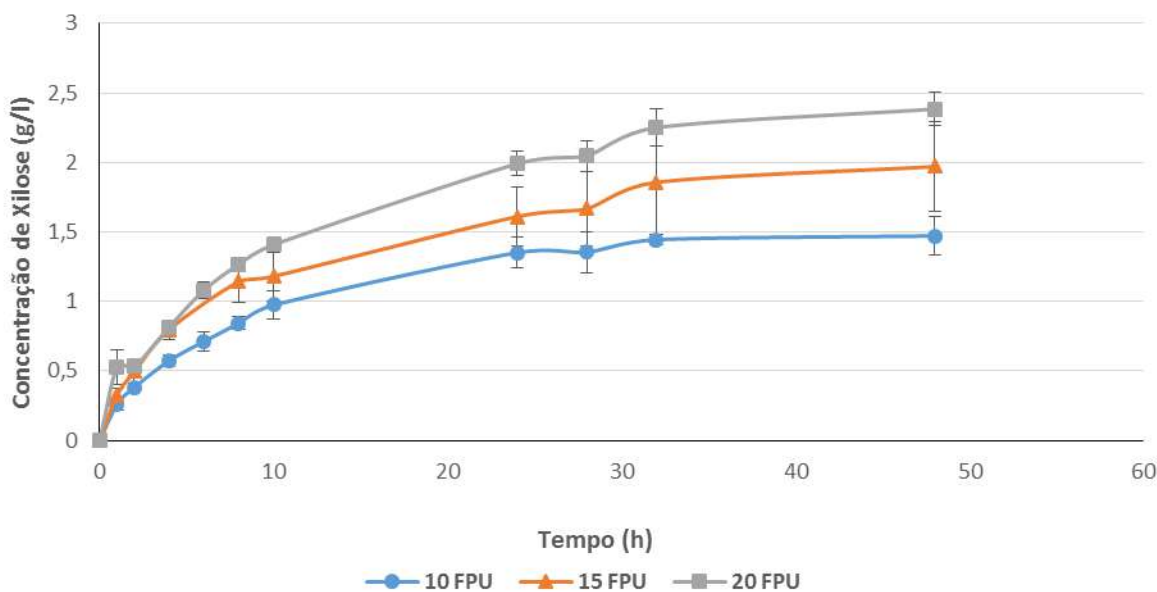


Figura 18: Cinética de Formação de Xilose ao longo da Hidrólise Enzimática

Quando observada a formação de xilose, a condição de 15 FPU também mostrou-se como a mais atraente justamente por apresentar perfis similares a condição de 20 FPU, porém sendo uma condição de menor custo. No ponto de 48h para 15 FPU obteve-se uma concentração de xilose de $1,97 \pm 0,3216$ g/L e para 20 FPU uma concentração de $2,385 \pm 0,1170$ g/L. A condição de 15 FPU apresentou um rendimento de 8%, um valor também abaixo do que se espera para um pré-tratamento.

Em relação à celobiose, sua presença não foi significativa ao longo da hidrólise. Em grande parte do processo não foram detectados picos nos cromatogramas, apenas no final da reação foi percebida a presença deste açúcar e mesmo assim em pequenas concentrações. Assim é possível afirmar a presença da β -glicosidade na enzima utilizada, já que ela é responsável pela clivagem da celobiose em glicose.

Uma possibilidade para a hidrólise não ter apresentado rendimentos satisfatórios é um eventual erro na técnica aplicada, uma vez que o pré-tratamento em escala maior mostrou-se eficaz. Outro ponto percebido ao longo da reação foi a dificuldade de contato, mesmo com agitação, da palha com a fase aquosa, uma vez que o volume ocupado pela palha era considerável em relação ao volume da mistura tampão e enzima. Pode ser que diminuindo a carga de biomassa no pré-tratamento o contato das enzimas com a palha aumente, melhorando os rendimentos de hidrólise.

Capítulo 7. Projeto de Processo de Conversão da Biomassa Vegetal

O objetivo dos processos tecnológicos numa biorrefinaria são a despolimerização e a desoxigenação dos compostos da biomassa para a conversão de matéria-prima em produtos valiosos (CHERUBINI, 2010). A partir dos experimentos do presente trabalho, desde a trituração da palha de cana *in natura* até o início dos procedimentos para a recuperação do solvente utilizado para o pré-tratamento do biomaterial, desenvolveu-se um fluxograma para uma possível aplicação industrial em escalas ampliadas para uma base mássica de 100 Kg.

Dentre os diferentes processos integrados para conversão de biomassa em diversos produtos, o presente trabalho focou sua atenção para o processo de pré-tratamento da biomassa e o processo de recuperação do solvente eutético, uma vez que essas são as etapas responsáveis por determinar a viabilidade desse método tanto pela sua capacidade em propiciar o aproveitamento dos componentes da biomassa e possibilitar a reutilização do solvente no processo. Para facilitar a visualização do projeto, o processo global foi dividido em três etapas: pré-tratamento (Figura 19), obtenção de lignina e hemicelulose (Figura 20), e recuperação do solvente (Figura 21).

O processo é iniciado com os 100 Kg de palha *in natura* passando por um moinho repicador para que ocorra a trituração do material anterior ao pré-tratamento. Essa etapa do processo permite que a biomassa seja uniformizada para o tamanho de partícula de escolha e aumenta a acessibilidade dos solventes eutéticos à estrutura da biomassa lignocelulósica por meio de mudanças na estrutura da biomassa como o aumento da área superficial, desfibrilação e algumas vezes a redução do grau de polimerização e da cristalização, sem alterar sua composição química (ALVIRA *et al.*, 2010). Nessa etapa, não é considerada perda de material, sendo ele todo prosseguido para a etapa de pré-tratamento.

A etapa de pré-tratamento é realizada em um reator industrial CSTR operado em regime batelada com agitação mecânica e manta de aquecimento. A escolha desse modelo de reator foi devido a algumas observações feitas no ensaio de pré-tratamento em escala ampliada. Durante esse experimento observou-se que a mistura entre a palha e o solvente deve ter o maior grau de homogeneidade possível para que a interação entre a palha e o solvente seja o uniforme possibilitando a biomassa possuir a mesma composição mássica em constituintes após o pré-tratamento. A importância de um sistema de aquecimento também se dá pelo mesmo motivo de produção de um material pré-tratado uniforme em relação a sua composição. É indicado o uso de uma camisa externa de aquecimento simples pela sua praticidade e baixo custo e capacidade de manter a mistura reacional sob uma temperatura ajustável, nesse caso 110 °C.

Para um processo de 100 Kg de biomassa é adicionado 1 tonelada de solvente, ou seja, optou-se pela manutenção da proporção da razão 1:10 de biomassa:solvente, uma vez que a reação ocorrendo em um reator, os problemas encontrados com relação a viscosidade no laboratório serão facilmente contornados. As condições de operação foram as mesmas usadas para o pré-tratamento em pequena escala, de razão mássica 1:10, temperatura de 110 °C durante 90 minutos porque são os mais recomendados na literatura.

Considerando que não houve perdas no processo, a corrente de saída do reator batelada será de 1,1 tonelada da mistura palha:solvente. O processo passará por 4 lavagens de forma similar ao realizado durante os experimentos. Para a primeira lavagem serão adicionados 2 L de uma solução 50% (v/v) de acetona-água para cada 1 Kg de material pré-tratada. A solução será filtrada, recolhendo-se o líquido e levando a palha seca para a segunda lavagem, que ocorrerá nas mesmas condições que a anterior (Figura 19). Os lavados 1 e 2 são juntados e conduzidos a uma microfiltração (MF1). Antes, porém, é adicionada uma solução de ácido clorídrico até que a solução atinja pH 2,0 – determinado experimentalmente como o de melhor custo-benefício para o processo - para precipitar a lignina solubilizada em solução, aumentando a quantidade de lignina que será filtrada. O permeado da MF1 passará por uma nanofiltração (NF1) para se recuperar as moléculas de lignina mais finas. Contudo, pelo tamanho das moléculas de hemicelulose que estão solubilizadas, elas também ficam retidas nesses processos de filtração, portanto as correntes recuperadas tanto da MF1 quanto da NF1 (por retrolavagem) são soluções ricas em lignina,

hemicelulose e água. Já o permeado da NF1 será composto basicamente por solvente eutético, água e acetona (Figura 20).

A biomassa que passou pelas 2 primeiras etapas da lavagem – palha lavada - será destinada a 3º e 4º lavagem que será feita dessa vez apenas adicionando 2 L de água para cada 1 Kg de material. O material será filtrado por um filtro prensa, sendo sua fase sólida seca obtida a própria biomassa que será destinada para a hidrólise enzimática e posterior fermentação de acordo com o produto final de interesse. Já a fase líquida das últimas duas lavagens é direcionada, assim como a fase líquida da 1º e 2º lavagens, para uma MF2 e NF2. Nessa etapa do processo, também é adicionada ácido clorídrico, embora em menor quantidade, para recuperar a lignina solúvel. Os recuperados da MF2 e da NF2 pela retrolavagem, contendo lignina, hemicelulose (solubilizada) e água, são juntados aos recuperados do lavado 1 e 2, e são levados a um tanque de decantação onde é possível a separação da lignina da solução de água e hemicelulose. Para a obtenção da hemicelulose, esta corrente aquosa é levada a um destilador (Figura 20). O permeado da NF2 será composto apenas por água que poderá ser reutilizada no processo, e o permeado da NF1 formado por solvente eutético, água e acetona é levado a um destilador onde é possível a recuperação do solvente (Figura 21).

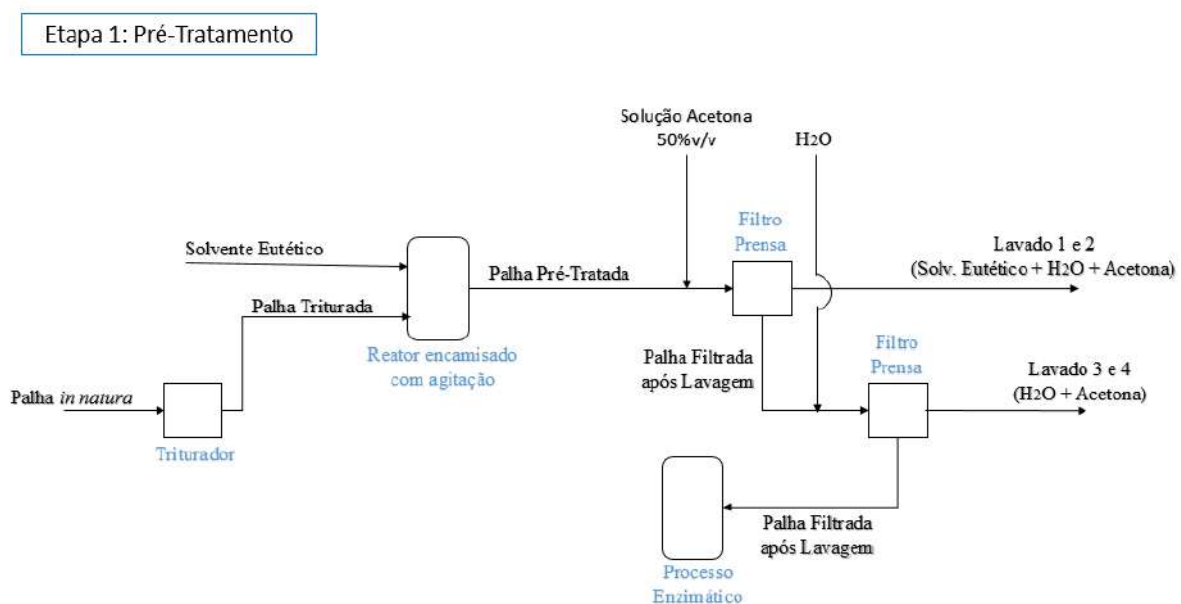


Figura 19: Etapa do pré-tratamento do processo proposto

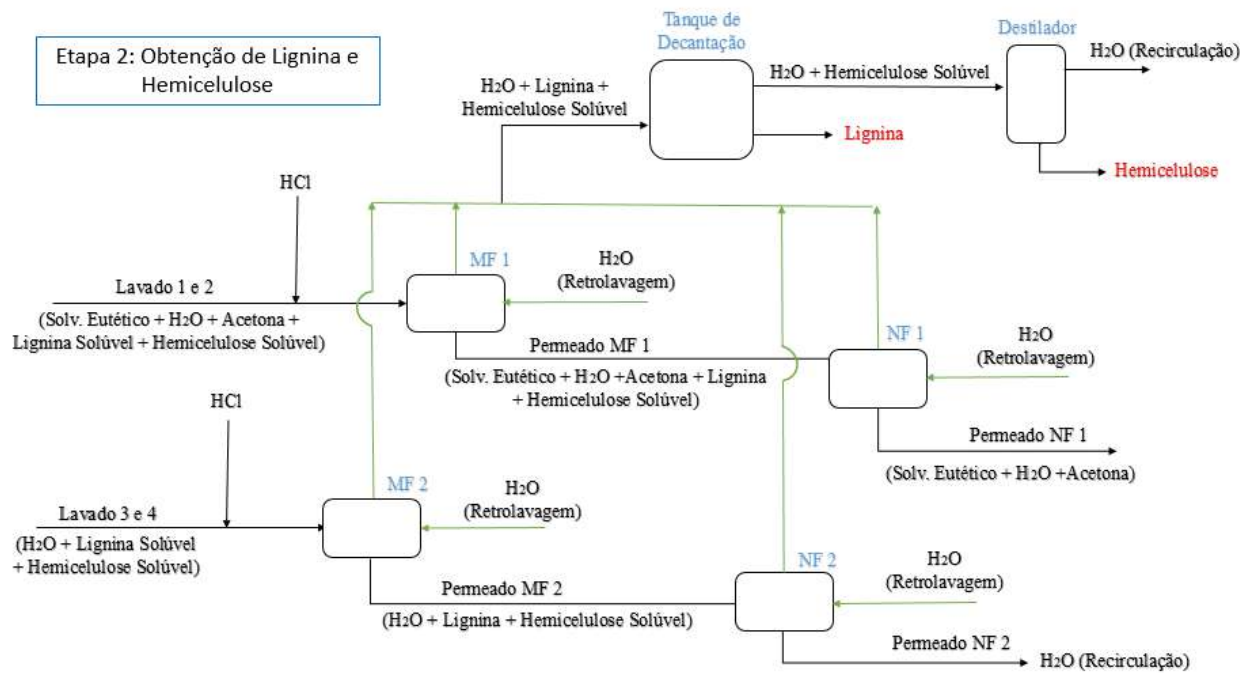


Figura 20: Etapa de obtenção de lignina e Hemicelulose do processo proposto

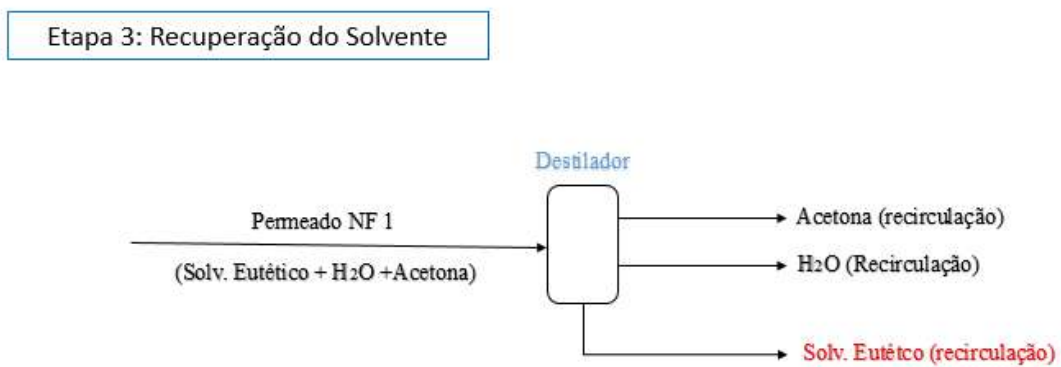


Figura 11: Etapa de recuperação do solvente do processo proposto

Capítulo 8. Conclusões

Neste trabalho pôde-se observar a interação de diferentes SE's com o complexo lignocelulósico da palha-de-cana. Os SE's formados por ChCl, no geral, apresentaram melhores condições de desestruturação do complexo lignocelulósico do que os constituídos de ácidos orgânicos e aminoácidos.

Dentre os solventes analisados, o que apresentou melhores condições num eventual uso em escala industrial foi o ChCl/Uréia. A alta viscosidade desse solvente é um fator que dificulta seu manuseio no processo em escala aumentada, contudo, ele mostrou uma boa capacidade de deslignificação. Estudos futuros de difração por raio X podem indicar se houve redução no grau de polimerização e/ou diminuição da cristalinidade da celulose da biomassa corroborando para a tese de que o pré-tratamento surtiu efeito. Além disso, para que este método de pré-tratamento seja validado, é necessário realizar estudos mais aprofundados sobre a recuperação deste solvente e das substâncias nele solubilizadas. Isso porque uma das vantagens em relação a outros processos, como os LI's por exemplo, é justamente o custo desses solventes, então é necessário que estes processos de recuperação sejam eficientes e não encareçam o processo

A hidrólise enzimática não apresentou bons rendimentos na formação de glicose e xilose, o que não era esperado diante da remoção de lignina observada no pré-tratamento. É importante realizar estudos para que se chegue na melhor relação carga massa de biomassa possível, já que isso foi apontado como um possível problema nesta etapa. A otimização das condições é necessária para uma futura análise de rendimento do processo, e assim, ser possível a validação do processo.

Capítulo 9. Referências Bibliográficas

ABBOTT, A. P. et al. Deep Eutectic Solvents Formed between Choline Chloride and Carboxylic Acids: Versatile Alternatives to Ionic Liquids. **Journal of the American Chemical Society**, Leicester, v. 126, n. 29, p. 5, Julho 2004.

AGÊNCIA NACIONAL DE ENERGIA ELÉTRICA. Biomassa. In: ELÉTRICA, A. N. D. E. **Atlas de Energia Elétrica no Brasil**. 2a. ed. Brasília: Agência Nacional de Energia Elétrica, v. 1, 2005. Cap. 5, p. 15.

AGUIAR, C. M. **Hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos utilizando celulasas produzidas pelo fungo *Aspergillus niger***. Dissertação de Mestrado. Universidade do Oeste do Paraná, Programa de pós-graduação em Engenharia química. Toledo, p. 118. 2010.

ALVES, R. E. **Caracterização de fibras lignocelulósicas pré-tratadas por meio de técnicas espectroscópicas e microscópicas ópticas de alta resolução**. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Interunidades em Ciência e Engenharia de Materiais. São Carlos, p. 117. 2011.

ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. “Pretreatment Technologies for an Efficient Bioethanol Production Process Based on **Enzymatic Hydrolysis**: A Review”, 2010

ANDERSON, J. L. et al. Characterizing Ionic Liquids On the Basis of Multiple Solvation Interactions. **Journal of the american society**, South Kensington, v. 124, n. 47, p. 7, Novembro 2002.

AVGERINOS, G. C.; WANG, D. I. C. Selective solvent delignification for fermentation enhancement. **Biotechnology and Bioengineering**, Cambridge, v. 25, n. 1, p. 16, Janeiro 1983.

BAGDUJAR, K.C.; BHANAGE, B.M. “**Factors governing dissolution process of lignocellulosic biomass in ionic liquid: Current status, overview and challenges**”, *Bioresour. Technol.* 178, 2-18, 2015.

BAJPAI, P. **Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuel Production**. 1. ed. Kanpur: Springer Singapore, v. 1, 2016.

BEHERA, S. et al. Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Punjab, v. 36, p. 15, Agosto 2014.

BIODIESELBR. Biodiesel Br. **www.biodiesel.com**, 2006. Disponível em: <<https://www.biodieselbr.com/proalcool/pro-alcool/programa-etanol.htm>>. Acesso em: Junho 2017.

BIOENERGIA E BIOMASSA. www.biomassabioenergia.com.br. **Biomassa e Bioenergia**, 2016. Disponível em: <<https://www.biomassabioenergia.com.br/imprensa/o-que-e-biomassa-/20110811-103208-u704>>. Acesso em: Julho 2017.

BRAGA, R. M. et al. **Avaliação da Produção de Celulase por Cepas de *Fusarium***. XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos. Natal: SINAFERM. 2009. p. 6.

BRENNECKE, J. F.; MAGINN, E. J. Ionic liquids: Innovative fluids for chemical processing. **AIChE Journal**, Notre Dame, v. 47, n. 11, p. 5, Novembro 2011.

BRISTOW, J. A.; KOLSETH,. **Paper Structure and Properties**. 1. ed. [S.l.]: Taylor and Francis, 1986.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 1, p. 7, Novembro 2010.

CHANG, V. S.; HOLTZAPPLE, M. T. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, College Station, v. 84, n. 1-9, p. 32, Março 2000.

CHEN, W.-H. et al. Pretreatment of rice straw using an extrusion/extraction process at bench-scale for producing cellulosic ethanol. **Bioresource Technology**, Taiwan, v. 102, n. 22, p. 7, Novembro 2011.

CHERUBINI, F. The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. **Energy Conversion and Management**, 2010.

CLÍMACO, F. PE desenvolvimento. **www.pedesevolvimento.com**, 2012. Disponível em: <<https://pedesevolvimento.com/2012/01/27/biorrefinarias-pelo-mundo/>>. Acesso em: Junho 2017.

CORTEZ, L. A. B.; LORA, E. E. S.; GOMEZ, E. O. **Biomassa para energia**. 1a. ed. Campinas: Editora Unicamp, v. 1, 2008.

DA SILVA, A. S. **Pré-tratamento do bagaço de cana-de açúcar com líquidos iônicos: efeito na desestruturação da parede celular e na eficiência da hidrólise enzimática**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química. Rio de Janeiro, p. 152. 2013.

DAI, et al. Ionic Liquids and Deep Eutectic Solvents in Natural Products Research: Mixtures of Solids as Extraction Solvents. **Journal of Natural Products**, Leiden, v. 76, n. 11, p. 11, Novembro 2013.

DE CASTRO, H. F. **Processos Químicos Industriais II**. Universidade de São Paulo - Escola de Engenharia de Lorena. Lorena, p. 30. 2009.

DEGAM, G. “**Deep Eutectic Solvents Synthesis, Characterization and Applications in Pretreatment of Lignocellulosic Biomass**” . Theses and Dissertations. South Dakota State University, 2017.

DEPARTAMENTO DE PESQUISAS E ESTUDOS ECONÔMICOS. Economia em dia. **www.economiaemdia.com.br**, Junho 2017. Disponível em: <https://www.economiaemdia.com.br/EconomiaEmDia/pdf/infset_acucar_etanol.pdf>. Acesso em: Junho 2017.

DI MARINO, D. et al. Electrochemical depolymerisation of lignin in a deep eutectic solvent. **Green Chemistry**, Aachen, v. 18, n. 22, p. 9, Novembro 2016.

DOMINGUEZ DE MARIA, P. Recent trends in (ligno)cellulose dissolution using neoteric solvents: switchable, distillable and bio-based ionic liquids. **Chemical Technology and Biotechnology**, Aachen, v. 89, n. 1, p. 7, Janeiro 2014.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, St. Paul, v. 28, n. 3, p. 6, Março 1956.

ERIKSSON, T.; BÖRJESSON, J.; TJERNELD, F. Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Enzyme and Microbial Technology**, Lund, v. 31, n. 3, p. 11, Agosto 2002.

FAN, L. T.; LEE, Y. H.; BEARDMORE, D. H. Major chemical and physical features of cellulosic materials as substrates for enzymatic hydrolysis. **Advances in Biochemical Engineering**, Manhattan, v. 14, p. 16, Setembro 1980.

FAULON, J.-L.; CARLSON, G. A.; HATCHER, P. G. A three-dimensional model for lignocellulose from gymnospermous wood. **Organic Geochemistry**, Albuquerque, v. 21, n. 12, p. 10, Dezembro 1994.

GHOSE, T. K. Measurement of Cellulase Activities. **Pure and Applied Chemistry**, New Delhi, v. 59, n. 2, p. 11, 1987.

GRÄSVIK, J. et al. Evaluation of four ionic liquids for pretreatment of lignocellulosic biomass. **BMC Biotechnology**, Umeå, v. 14, p. 11, Abril 2014.

GUARIEIRO, L. L. N.; VASCONCELLOS, P. C.; SOLCI, M. C. Solventes Atmosféricos Provenientes da Queima de Combustíveis Fósseis e Biocombustíveis: Uma Breve Revisão. **Revista Virtual de Química (INCT de Energia & Ambiente)**, Salvador, 16 Novembro 2011. 11.

GUNNY, A. A. N. et al. Applicability evaluation of deep eutectic solvents-cellulase system for lignocellulose hydrolysis. **Bioresource Technology**, Kuala Lumpur, v. 181, p. 5, Abril 2015.

HARMSSEN, P. F. H. et al. **Literature Overview of Physical and Chemical Pretreatment Processes for Lignocellulosic Biomass**. Wageningen University & Research centre - Food & Biobased Research. [S.l.], p. 49. 2010.

HEINZE, ; SCHWIKAL, ; BARTHEL,. Ionic liquids as reaction medium in cellulose functionalization. **Macromolecular Bioscience**, Germany, v. 5, n. 6, p. 5, Junho 2005.

HERMANUTZ, F. et al. New Developments in Dissolving and Processing of Cellulose in Ionic Liquids. **Macromolecular Symposia**, Wiesbaden, 26-28 Junho 2008. 182.

HOLANDA, L. R. D. et al. **O cultivo de microalgas para a geração de eletricidade**. VII congresso nacional de excelência em gestão (ISSN 1984-9354). Rio de Janeiro: Inovarse. 2011. p. 13.

INSTITUTO DE ENERGIA E AMBIENTE DA USP. IEE USP. **www.iee.usp.br**, 2016. Disponível em: <<http://www.iee.usp.br/gbio/?q=livro/fontes-de-biomassa>>. Acesso em: Junho 2017.

- JONG, E. D.; VAN REE, R. Biorefineries - International status quo and future directions. **www.biorefinery.nl**, 2005. Disponível em: <http://www.biorefinery.nl/fileadmin/biorefinery/docs/publications/presentations-kickoff/_2__Current_status_on_Biorefineries_IEA42_150307.pdf>. Acesso em: junho 2017.
- LI, B. et al. Factors Affecting Wood Dissolution and Regeneration of Ionic Liquids. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, Helsinki, v. 49, n. 5, p. 7, Janeiro 2010.
- LI, H. et al. Microwave irradiation – a green and efficient way to pretreat biomass. **Bioresource Technology**, Beijing, v. 199, p. 7, Janeiro 2016.
- LIU, C.-Z. et al. Ionic liquids for biofuel production: Opportunities and challenges. **Applied Energy**, Beijing, v. 92, p. 8, Abril 2012.
- LIU, Y. et al. Efficient Cleavage of Lignin–Carbohydrate Complexes and Ultrafast Extraction of Lignin Oligomers from Wood Biomass by Microwave-Assisted Treatment with Deep Eutectic Solvent. **ChemSusChem**, Harbin, v. 10, n. 8, p. 8, Abril 2017.
- MARSH, K. N.; BOXALL, J. A.; LICHTENTHALER, R. Room temperature ionic liquids and their mixtures—a review. **Fluid Phase Equilibria**, Christchurch, v. 219, n. 1, p. 5, Maio 2004.
- MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, Natick, v. 31, n. 3, p. 2, Março 1959.
- MOHAMAD IBRAHIM, M. N. et al. Chemical and thermal properties of lignins from oil palm biomass as a substitute for phenol in a phenol formaldehyde resin production. **Carbohydrate Polymers**, Pulau Pinang, v. 86, n. 1, p. 7, Agosto 2011.
- MOOD, S. H. et al. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Tehran, v. 27, p. 16, November 2013.
- MORO, M. K. **Pré-tratamento da biomassa de cana-de-açúcar por extrusão com dupla-rosca**. COPPE UFRJ. Rio de Janeiro, p. 119. 2015.
- MORRISON, H.G.; SUN, C.; NEERVANNAN, S. “**Characterization of thermal behavior of deep eutectic solvents and their potential as drug solubilization vehicles**”, *Int. J. Pharm.* 378(1-2), 2009.
- NOGUEIRA, L. A. H.; LORA, E. E. S. **Dendroenergia: fundamentos e aplicações**. 2a. ed. Rio de Janeiro: Editora Interciência, v. 1, 2003.
- NOVA CANA. Nova Cana. **www.novacana.com**, 2009. Disponível em: <<https://www.novacana.com/estudos/a-evolucao-da-produtividade-da-cana-de-acucar-160813/>>. Acesso em: Junho 2017.
- NOVA CANA. Nova Cana. **www.novacana.com**, 2017. Disponível em: <<https://www.novacana.com/n/etanol/2-geracao-celulose/etanol-celulosico-encruzilhada-gargalos-usinas-7-capacidade-310517/>>. Acesso em: Junho 2017.

NOVA CANA. Nova Cana. www.novacana.com, 2017. Disponível em: <<https://www.novacana.com/estudos/a-cana-de-acucar-como-fonte-de-energia-eletrica-241013/>>. Acesso em: Junho 2017.

NOVA CANA. Nova Cana. www.novacana.com, 2017. Disponível em: <<https://www.novacana.com/estudos/projecoes-producao-cana-acucar-etanol-safra-2023-2024-fiesp-mb-agro/>>. Acesso em: Junho 2017.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise Enzimática de Biomassa. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 7, p. 10, Junho 2010.

OOSHIMA, ; SAKATA, ; HARANO, Y. Adsorption of cellulase from *Trichoderma viride* on cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, Osaka, v. 25, n. 12, p. 11, Dezembro 1983.

PAIVA, A. et al. Natural Deep Eutectic Solvents – Solvents for the 21st Century. **Sustainable Chemistry and Engineering**, Guimarães, v. 2, n. 5, p. 8, Março 2014.

PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, Lund, v. 74, n. 1, p. 8, Agosto 2000.

PIERACCINI, D. et al. Ecotoxicity of Ionic liquids in an Aquatic Environment. In: LETCHER, T. M. **Thermodynamics, Solubility and Environmental Issues**. South Africa: Elsevier, 2007. Cap. 14, p. 463.

PINKERT, A.; MARSH, K. N.; PANG, S. Reflections on the Solubility of Cellulose. **Industrial and Engineering chemistry research**, Christchurch, v. 49, n. 22, p. 9, Agosto 2010.

PORTAL BRASIL. Portal Brasil. www.brasil.gov.br, 2017. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/infraestrutura/2017/03/em-2016-biomassa-e-a-segunda-maior-fonte-de-energia>>. Acesso em: Junho 2017.

QIU, Z.; AITA, G. M.; WALKER, M. S. Effect of ionic liquid pretreatment on the chemical composition, structure and enzymatic hydrolysis of energy cane bagasse. **Bioresource Technology**, Saint Gabriel, v. 117, p. 5, Agosto 2012.

RABEMANOLONTSOA, H.; SAKA, S. Various pretreatments of lignocellulosics. **Bioresource Technology**, Kyoto, v. 199, p. 8, Janeiro 2016.

REN, H. et al. The Properties of Choline Chloride-based Deep Eutectic Solvents and their Performance in the Dissolution of Cellulose. **BioResources**, Beijing, v. 11, n. 2, p. 17, 2016.

ROMERO, A. et al. Toxicity and biodegradability of imidazolium ionic liquids. **Journal of Hazardous Materials**, Vigo, v. 151, n. 1, p. 5, Fevereiro 2008.

ROSSETTO, R. Agência Embrapa de Informação Tecnológica. <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br>, 2017. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_92_22122006154841.html>. Acesso em: Junho 2017.

SANTANA, C. A. M.; DURÃES, F. O. M. Oferta e Distribuição de Biomassa no Brasil. In: EMBRAPA AGROENERGIA **Biomassa para química verde**. 1a. ed. Brasília: Embrapa, v. 1, 2013. p. 19.

SANTOS, D. D. S. **Produção de etanol de segunda geração por zymomonas mobilis naturalmente ocorrente e recombinante, empregando massa lignocelulósica**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de química, Programa de pós-graduação em tecnologia de processos químicos. Rio de Janeiro, p. 243. 2012.

SANTOS, F. A. et al. POTENCIAL DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA PRODUÇÃO DE ETANOL. **Química Nova**, Viçosa, v. 35, n. 5, p. 6, Janeiro 2012.

SIQUEIRA, Lara Neiva et al. Rendimento de hidrólise e produção de etanol lignocelulósico a partir de biomassa de capim elefante. **Journal of bioenergy and food science**, v.3, n.4, 2016. DOI:10.18067/jbfs.v3i4.112.

SLUITER, A. et al. **Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass**. National Renewable Energy Laboratory. Golden, p. 17. 2008.

SMITH, E. L.; ABBOTT, A. P.; RYDER, K. S. “**Deep eutectic solvents (DESs) and their applications**”. Chem Rev, 2014.

TANG, B.; ZHANG, H.; ROW, K. H. Application of deep eutectic solvents in the extraction and separation of target compounds from various samples. **Journal of Separation Science**, Yonghyun-Dong, v. 38, n. 6, p. 11, Fevereiro 2015.

TEIXEIRA, 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**, Rio de Janeiro, v. 363, p. 4, Dezembro 2012.

VAZ JÚNIOR, S. O Potencial e a Importância de Biorrefinarias para o Brasil. In: EMBRAPA AGROENERGIA **Biorrefinarias: cenários e perspectivas**. 1a. ed. Brasília: Embrapa Agroenergia, v. 1, 2011. Cap. 1.

VIGIER, K. O.; CHATEL, G.; JÉRÔME, F. Contribution of Deep Eutectic Solvents for Biomass Processing: Opportunities, Challenges, and Limitations. **ChemCatChem**, Poitiers, v. 7, n. 8, p. 10, Março 2015.

XIA, S. et al. Aqueous Ionic Liquids and Deep Eutectic Solvents for Cellulosic Biomass Pretreatment and Saccharification. **Royal Society of Chemistry**, Savannah, v. 4, p. 10, Dezembro 2014.

XU, F. et al. Comparative study of water-soluble and alkali-soluble hemicelluloses from perennial ryegrass leaves (*Lolium perenne*). **Carbohydrate Polymers**, Yangling, v. 67, n. 1, p. 9, Janeiro 2007.

ZHANG, Q. et al. Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. **Chemical Society Reviews**, Poitiers, v. 41, n. 21, p. 38, Julho 2012.

ZHANG, Y.-H. P.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, Hanover, v. 88, n. 7, p. 28, Julho 2004.

ZHU, S. et al. Dissolution of cellulose with ionic liquids and its application: a mini-review. **Green Chemistry**, Wuhan, n. 4, p. 3, Março 2006.