



UNICAMP

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**

THAYNARA CORADINI PIN

**AVALIAÇÃO DE LÍQUIDOS IÔNICOS PRÓTICOS PARA O PRÉ-TRATAMENTO
DE BAGACO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Campinas

2017

THAYNARA CORADINI PIN

AVALIAÇÃO DE LÍQUIDOS IÔNICOS PRÓTICOS PARA O PRÉ-TRATAMENTO DE
BAGACO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Orientadora: Profa. Dra. Aline Carvalho da Costa
Co-orientadora: Dra. Sarita Cândida Rabelo

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Engenharia Química.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA THAYNARA CORADINI PIN, E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. ALINE CARVALHO DA COSTA.

Campinas
2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CNPq, 130936/2015-4

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9597-1234>

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Luciana Pietrosanto Milla - CRB 8/8129

P65a Pin, Thaynara Coradini, 1990-
Avaliação de líquidos iônicos próticos para o pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar / Thaynara Coradini Pin. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Aline Carvalho da Costa.
Coorientador: Sarita Cândida Rabelo.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Bagaço de cana. 2. Líquido iônico. 3. Pré-tratamento. 4. Hidrólise enzimática. 5. Etanol 2G. I. Costa, Aline Carvalho da, 1970-. II. Rabelo, Sarita Cândida. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of protic ionic liquids for the pretreatment of sugarcane bagasse

Palavras-chave em inglês:

Sugarcane bagasse

Ionic liquid

Pretreatment

Enzymatic hydrolysis

2G ethanol

Área de concentração: Engenharia Química

Titulação: Mestra em Engenharia Química

Banca examinadora:

Aline Carvalho da Costa [Orientador]

George Jackson de Moraes Rocha

Marcus Bruno Soares Forte

Data de defesa: 21-02-2017

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Thaynara Coradini Pin

Avaliação de líquidos iônicos próticos para o pré-tratamento de bagaco de cana-de-açúcar

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada em 21 de fevereiro de 2017 pela banca examinadora constituída pelos doutores*:

Profa. Dra. Aline Carvalho da Costa
Faculdade de Engenharia Química/Unicamp

Prof. Dr. George Jackson de Moraes Rocha
Escola de Engenharia de Lorena/USP

Prof. Dr. Marcus Bruno Soares Forte
Faculdade de Engenharia de Alimentos/Unicamp

*a Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica da aluna.

DEDICATÓRIA

Dedico este esforço especialmente ao meu anjo da guarda, minha mãe Marinete *In Memoriam*, por sempre acreditar em mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre ao meu lado e por me ajudar a vencer os obstáculos que encontrei no caminho.

A toda minha família que mesmo de longe me apoiou, principalmente meu pai, Ademilson e meu irmão, Arthur, por todo amor, carinho e disposição.

Ao meu noivo, Jáder, pela paciência, apoio, companheirismo, cervejas e principalmente chocolates. Sua companhia e seus abraços me faziam esquecer todos os momentos de ansiedade e estresse.

À minha orientadora, Profa. Dra. Aline Carvalho da Costa, e co-orientadora, Dra. Sarita Cândida Rabelo, pela orientação, confiança, entusiasmo durante todo o trabalho e imensa colaboração na elaboração dessa dissertação.

Aos amigos Henrique e Daniel pelas longas conversas e discussões que me deram força, sem vocês não seria a mesma coisa. Além da Maira, Vinicius, Mariana, Ludmila, Emília, Daniela e muitos outros que estavam sempre se importantando e me incentivando ao longo desses anos, muito obrigada.

A Julcelly Dayara e Ryara, amigas de muitos anos que mesmo longe estavam presentes no meu dia-a-dia dando força.

Aos amigos da casa, os Ratões, que nunca me deixaram abalar pelas dificuldades e sempre estavam dando boas energias e em especial ao Nilton Soares pelas análises de RMN que atribuíram grande valor a essa dissertação.

Aos amigos do LEPFE, Daniele e Pedro por toda a paciência, disponibilidade, ajuda, incentivo nos experimentos, e pelos momentos de descontração ao longo dos dias.

Ao Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE) por ter cedido à estrutura e materiais para a realização desse trabalho e todos os amigos que lá fiz principalmente a Dani, Edilaine e Laerti que me ajudaram ao longo do trabalho.

A colaboração da Prof^a Dr^a Silvana Mattedi e Silva da UFBA pelas sínteses dos LIPs utilizados na triagem e pelas dúvidas sanadas ao longo da dissertação.

Aos funcionários da FEQ, que de forma direta e indireta contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho e estava sempre a disposição.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro e a Fapesp 2016/06142-2.

RESUMO

Muitos pré-tratamentos não apresentam custo/benefício tecnicamente viável, contudo um exemplo promissor é a utilização do líquido iônico prótico (LIP) na dissolução da biomassa lignocelulósica que resulta em rendimentos de hidrólise enzimática superiores aos pré-tratamentos convencionais. Este trabalho foi avaliado em duas etapas, primeiro a otimização do 2HEAA (acetato de 2-hidroximonoetanolamônio) e segundo a triagem de 11 LIPs, ambas para o pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar (10% sólidos) com LIP:H₂O de 5:1 (m/m). As temperaturas determinadas para o pré-tratamento foram utilizadas com base nas análises termogravimétricas dos LIPs e o tempo foi variado para avaliar a eficiência do processo. A eficiência do pré-tratamento foi confirmada por hidrólise enzimática com 10% sólidos (m/m). O 2HEAA foi o mais eficiente para o pré-tratamento do bagaço (150°C, 2 h), cuja hidrólise enzimática resultou em conversão de celulose de 77,4% e hemiceluloses de 69,0%. A celulose não apresentou solubilização e a lignina e as hemiceluloses são parcialmente solubilizadas para o licor. Com o intuito de aumentar a conversão para xiloses foi utilizada uma combinação de coquetel enzimático (Cellic Htec2 e Cellic Ctec2 – Novozymes), logo a conversão aumentou para 80,6% e 77,4% de celulose e hemiceluloses, respectivamente. Em uma segunda etapa foi avaliada a triagem de 11 LIPs que foram baseados em dois grupos de ânion – sulfato e acetato: O grupo do ânion acetato apresentou bons rendimentos em pré-tratamento, o M-2HEAA (Acetato de N-metil-2-hidroxietilamônio) em um pré-tratamento a 160°C por 3 h apresentou o melhor rendimento global de glicose do grupo, com 72,0%, sendo considerado promissor para estudos futuros. Este trabalho credibilizou os pré-tratamento com LIPs como uma alternativa futura para ser economicamente favorável à produção de etanol de segunda geração (2G).

Palavras-chave: bagaço da cana; líquido iônico; pré-tratamento; hidrólise enzimática; etanol 2G.

ABSTRACT

Several pretreatments do not present a feasible cost/benefit relationship, however, a promising solution is the use of protic ionic liquids (PIL) in the pretreatment of lignocellulosic biomass which leads to higher enzymatic hydrolysis yields compared to conventional pretreatments. This work was performed in two steps, first, the optimization of 2HEAA biomass pretreatment (2-hydroxy ethylammonium acetate), and second, the screening of 11 PILs, both using sugarcane bagasse pretreatment (10% of solids loading) with PIL:H₂O ratio of 5:1 (w/w). The working pretreatment temperatures were chosen considering the thermogravimetric analysis of PILs and the batch time was varied to evaluate the process efficiency. Pretreatment efficiency was confirmed by enzymatic hydrolysis with 10% solids loading (w/w). The PIL 2HEAA was the most efficient in sugarcane bagasse pretreatment (150°C, 2 h), whose enzymatic hydrolysis led to 77.4% of cellulose conversion and 69.0% of hemicelluloses. There was no cellulose solubilization, whereas there was partial lignin and hemicelluloses solubilization. In order to increase xylan conversion, a combination of enzymatic cocktails (Cellic Htec 2 and Cellic Ctec 2 – Novozymes) was employed; the conversion was increased to 80.6% and 77.4% of cellulose and hemicelluloses respectively. The screening of 11 PIL's was done by splitting the PIL in 2 groups based on the anion – sulfate and acetate: The acetate-anion group, presented the highest yields in the pre-treatments, the M-2HEAA (2-hydroxy-N-methylethanaminium acetate) in a pretreatment of 160 °C for 3 h showed the highest glucose yield of the group, with 72.0%, being considered the most promising for further optimization studies. This work has shown that pretreatments with PILs can be an alternative to a more economically feasible 2G ethanol production.

Keywords: sugarcane bagasse; ionic liquid; pretreatment; enzymatic hydrolysis; 2G ethanol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Estrutura de uma fibra lignocelulósica.	21
Figura 2.2 - Representação esquemática da celulose.	22
Figura 2.3 - Representação da cadeia da celulose (celobiose e glicose).....	22
Figura 2.4 - Estrutura das hemiceluloses.	23
Figura 2.5 - Representação dos açúcares que compõem as hemiceluloses.	24
Figura 2.6 - Representação da estrutura da lignina.	25
Figura 2.7 - Estruturas precursoras da lignina.....	26
Figura 2.8 - Mecanismo ilustrativo de interação do LIP com a celulose.....	33
Figura 2.9 - Fluxograma de pré-tratamento do bagaço utilizando LIPs.....	35
Figura 2.10 - Ação das enzimas na celulose.....	38
Figura 3.1 - Sistema de síntese do LI.....	42
Figura 3.2 - Bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i>	44
Figura 3.3 - Exemplo do cálculo para o tempo útil da reação de pré-tratamento.	45
Figura 3.4 - Licor resultante do pré-tratamento com 2HEAA.....	48
Figura 3.5 - Bagaço lavado após o pré-tratamento com 2HEAA.....	48
Figura 4.1 – LIPs a partir de ácido acético.	51
Figura 4.2 - LIPs a partir de ácido sulfúrico.....	52
Figura 4.3 - RMN ¹³ C de LIs com ácido acético (1) 2HEAA, (2) M-2HEAA, (3) E-2HEAA, (4) DEAA, (5) BEAA e (6) TEAA.....	54
Figura 4.4 - RMN ¹ H de LIs com ácido acético (1) 2HEAA, (2) M-2HEAA, (3) E-2HEAA, (4) DEAA, (5) BEAA e (6) TEAA.....	55
Figura 4.5 - RMN ¹³ C de LIs com ácido sulfúrico (1) 2HEAHS, (2) M-2HEAHS, (3) E-2HEAHS, (4) DEAHS, (5) BEAHS e (6) TEAHS.....	56
Figura 4.6 - RMN ¹ H de LIs com ácido sulfúrico (1) 2HEAHS, (2) M-2HEAHS, (3) E-2HEAHS, (4) DEAHS, (5) BEAHS e (6) TEAHS.....	57
Figura 4.7 - Curva padrão de TG.	59
Figura 4.8 – TG dos PLIs com ácido acético. (1) 2HEAA, (2) M-2HEAA, (3) E-2HEAA, (4) DEAA, (5) BEAA, (6) TEAA.....	60
Figura 4.9 - TG dos LIPs com ácido sulfúrico. (1) 2HEAHS, (2) M-2HEAHS, (3) E-2HEAHS, (4) DEAHS, (5) BEAHS, (6) TEAHS.....	61
Figura 4.10 - Solubilização dos componentes no pré-tratamento com 2HEAA.....	65
Figura 4.11 - Bagaço após pré-tratamento com 2HEAA.	68
Figura 4.12 - Lignina repolimerizada do licor de pré-tratamento com 2HEAA.....	68
Figura 4.13 - Relação de conversão de celulose com a solubilização da lignina para o planejamento experimental com 2HEAA.....	74

Figura 4.14 - Superfície de resposta para a conversão de celulose em glicose e a solubilização de lignina.	76
Figura 4.15 - Cinética da hidrólise enzimática da concentração de glicose versus tempo de hidrólise para os diversos tempos de pré-tratamento com 2HEAA.	77
Figura 4.16 - Cinética de hidrólise enzimática da concentração de xilose versus tempo de hidrólise para os diversos tempos de pré-tratamento com 2HEAA..	78
Figura 4.17 - Balanço de massa para o pré-tratamento (10% sólidos) com 2HEAA:H ₂ O (5:1 m/m) por 2 h a 150°C e hidrólise enzimática (10% sólidos) com Cellic Ctec2 e Cellic Htec2.	80
Figura 4.18 - Eficiência dos LIPs do grupo do ácido acético com base no rendimento global de glicose (calculado em 48 h de hidrólise) para os três tempos de pré-tratamento testados.....	83
Figura 4.19 - Eficiência dos LIPs do grupo do ácido sulfúrico com base no rendimento global de glicose (48h de hidrólise) para os três tempos de pré-tratamento testados.....	87
Figura 4.20 - Comparação do rendimento global de glicose dos LIPs utilizados.	92
Figura 4.21 - Comparação do rendimento global de xiloses dos LIPs	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Principais métodos de pré-tratamento.....	28
Tabela 2.2 – Exemplos de cátions e ânions utilizados na síntese de LIs.....	31
Tabela 3.1 - LIPs utilizados ao longo do estudo.....	41
Tabela 3.2 - Planejamento Fatorial.	46
Tabela 4.1 - Propriedades físico-químicas dos LIPs.	52
Tabela 4.2 - Temperaturas consideradas no pré-tratamento.	63
Tabela 4.3 – Composição do bagaço <i>in natura</i> e após o pré-tratamento com 2HEAA.	64
Tabela 4.4 - Resultados de hidrólise enzimática do planejamento experimental com 2HEAA.	70
Tabela 4.5 - ANOVA para o modelo de conversão de celulose em glicose e solubilização de lignina com variação de tempo e temperatura.	75
Tabela 4.6 - Variação de coquetel enzimático para a melhor condição de pré- tratamento com 2HEAA.....	79
Tabela 4.7- Resultados da triagem dos LIPs com ácido acético. Hidrólise enzimática com 10% (m/v) de sólidos e 15 FPU/g de Celic Ctec2.....	84
Tabela 4.8 - Resultados da triagem dos LIPs com ácido sulfúrico.....	88

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ASTM - *American Society for Testing and Material*

BEAA – Acetato de butilamônio

BEAHS – Hidrogenossulfato de butilamônio

CTBE - Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol

C₂min OAc - Acetato de 1-etil-3-metilimidazólio

C₄min OAc - Acetato de 1-butil-3-metilimidazólio

DNS – Ácido dinitro-3,5-salicílico

DEAA – Acetato de dietilamônio

DEAHS – Hidrogenossulfato de dietilamônio

E-2HEAA – Acetato de N-etil-2-hidroxietilamônio

E-2HEAHS – Hidrogenossulfato de N-etil-2-hidroxietilamônio

FEA – Faculdade de Engenharia de Alimentos

FEQ – Faculdade de Engenharia Química

FPU - Filter Paper Units

HMF – 5-Hidroximetilfurfura

HPLC – High pressure liquid column

IQ – Instituto de Química

LEPFE – Laboratório de Engenharia de Processos Fermentativos e Enzimáticos

LEF – Laboratório de Equilíbrio de Fases

LIP – Líquidos iônicos próticos

LIA – Líquidos iônicos apróticos

LRAC - Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração

LSPNF – Laboratório de Síntese de Produtos Naturais e Fármacos

LOG – Laboratório de Óleos e Gorduras

Mmim DMP - 1-methyl-3-methylimidazolium dimethylphosphate

M-2HEAA – Acetato de N-metil-2-hidroxietilamônio

M-2HEAHS – Hidrogenossulfato de N-metil-2-hidroxietilamônio

NREL - National Renewable Energy Laboratory

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

TEAA – Acetato de trietilamônio

TEAHS – Hidrogenossulfato de trietilamônio

TG - Termogravimétrica

Tonset – Temperatura extrapolado do evento

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas

2HEAA – Acetato de 2-hidroximonoetanolamônio

2HEAHS – Hidrogenossulfato de 2-hidroximonoetanolamônio

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	16
INTRODUÇÃO	16
1. OBJETIVOS	19
1.1. OBJETIVO GERAL	19
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
CAPÍTULO 2	20
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	20
2.1.1 Celulose	22
2.1.2 Hemiceluloses	23
2.1.3 Lignina.....	25
2.1.4 Extrativos	26
2.2 PRÉ-TRATAMENTO.....	27
2.2.1 Pré-tratamento com líquidos iônicos (LIs)	29
2.2.1.1 Líquidos iônicos (LIs): Conceitos, propriedades e aplicações.....	29
2.2.1.2 Aplicação do LI no processamento de biomassa lignocelulósica.....	33
2.3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	37
CAPÍTULO 3	40
3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	40
3.1 SÍNTESE E ANÁLISE DOS LIPs	40
3.2 PREPARAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA DO PRÉ-TRATAMENTO	43
3.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO	44
3.4 PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO	44
3.4.1 Rampa de aquecimento do reator	44
3.4.2 Pré-tratamento com LIPs	46
3.4.3 Hidrólise Enzimática.....	49
CAPÍTULO 4	51
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	51
4.1. SÍNTESE E ANÁLISE DOS LIPs.....	51
4.2. PRÉ-TRATAMENTO E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA UTILIZANDO LIPs	63
4.2.1. Efeitos do pré-tratamento com 2HEAA na hidrólise enzimática do bagaço .	63
4.2.2. Análise do planejamento experimental com 2HEAA	74
4.2.3. Cinética de pré-tratamento com o 2HEAA	77

4.2.4. Balanço de massa do pré-tratamento utilizando o 2HEAA.....	78
4.2.5. Estudo dos efeitos de diferentes LIPs no pré-tratamento do bagaço.....	82
4.2.5.1. Efeitos dos LIPs a partir do ânion acetato.....	82
4.2.5.2. Efeitos do LIPs com ânion hidrogenossulfato	87
4.2.5.3. Comparação entre os LIPs estudados	91
CAPÍTULO 5	95
5. CONCLUSÃO	95
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	97
REFERÊNCIAS.....	98
APÊNDICE A - Caracterização dos LIPs	111
APÊNDICE B - Análises de caracterização do bagaço de cana-de-açúcar	113
APÊNDICE C - Atividade enzimática	121
APÊNDICE D - Cálculo de rendimentos do pré-tratamento, conversão e de rendimento global da hidrólise.....	124

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

O etanol produzido a partir da cana-de-açúcar é uma das principais fontes de combustíveis renováveis, sendo pouco poluente quando comparado com o uso de combustíveis de origem fóssil como gasolina e diesel (ALBINO *et al.*, 2006).

O Brasil é o maior produtor da cana-de-açúcar, tendo a safra de 2015/2016 uma produção de 665,6 milhões de toneladas de cana, com um crescimento de 4,9% em relação à safra de 2014/2015. Esse aumento é gerado pela variedade da matéria-prima, condições climáticas favoráveis e a melhoria da eficiência industrial das unidades produtoras (CONAB, 2016).

A produção de etanol a partir da cana-de-açúcar gera grandes quantidades de bagaço. Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2011), para cada tonelada de cana-de-açúcar processada, 270 a 290 kg de bagaço (em base úmida, aproximadamente 50% umidade) são produzidos. Em grande parte das usinas sucroalcooleiras, o bagaço é queimado para produção de calor e energia em caldeiras de vapor com objetivo de suprir a demanda energética requerida pela usina, além do excedente energético poder ser vendido para rede de distribuição em leilões do governo.

O bagaço é uma biomassa lignocelulósica constituída principalmente de celulose, hemiceluloses e lignina, que correspondem a cerca de 90% da composição total do material lignocelulósico. O mesmo tem atraído interesse do mercado devido ao seu baixo custo e abundância, além da possibilidade da sua utilização para produção de etanol de segunda geração (HOFSETZ e SILVA, 2012).

Biomassas lignocelulósicas possuem estruturas complexas, onde a celulose e hemiceluloses estão densamente empacotadas e envoltas por lignina, que confere rigidez, impermeabilidade e resistência a ataques mecânicos e microbiológicos, protegendo assim os tecidos vegetais. A presença da lignina dificulta a conversão da celulose e hemiceluloses em açúcares fermentescíveis.

Portanto, na obtenção de etanol de segunda geração, pode ser desejável remover parte da lignina do material lignocelulósico (ASAKAWA *et al.*, 2015).

A lignina pode ser parcialmente removida através de etapas de deslignificação. Em geral, os pré-tratamentos diminuem a recalcitrância do material, aumentando a superfície da biomassa, o que facilita o acesso das enzimas aos carboidratos. Desse modo, o processo de hidrólise enzimática se torna muito mais eficiente (HARRISON *et al.*, 2013).

O pré-tratamento da biomassa está entre as etapas mais caras na produção de etanol celulósico, o que tem motivado muitos pesquisadores a buscarem alternativas para melhorar a eficiência deste processo (MOSIER *et al.*, 2003). Na literatura são relatados diversos tipos de pré-tratamento, incluindo biológico, físicos, químico ou físico-químico. Entretanto, muitos desses métodos apresentam algumas desvantagens como, por exemplo, longo tempo de reação, elevada demanda energética e alto custo dos solventes usados para o processamento (ASAKAWA *et al.*, 2015).

Alguns líquidos iônicos (LIs) são considerados solventes verdes, e têm sido mencionados como alternativa de pré-tratamento. Segundo Swatloski *et al.* (2002), o LI é capaz de desestruturar a celulose e remover parcialmente as hemiceluloses e a lignina, permitindo, assim, uma maior acessibilidade à celulose. Como consequência, há um aumento da taxa de sacarificação e do rendimento de açúcares.

Os LIs podem ser classificados em duas classes: próticos e apróticos. Ambos são recicláveis e reutilizáveis, possuem baixos pontos de fusão, em geral não são voláteis, são termicamente estáveis e possibilitam uma vasta gama de combinações entre ânions e cátions, resultando em compostos com habilidades únicas, e com uma alta seletividade para dissolver biomassas lignocelulósicas (UJU *et al.*, 2013). Esses solventes verdes têm sido utilizados na dissolução de fibras longas e curtas, na despolimerização de hemiceluloses, e também na deslignificação de eucalipto e bagaço de cana-de-açúcar.

Os LIs próticos têm se mostrado importantes solventes para o fracionamento de biomassas lignocelulósicas por serem mais fáceis de sintetizar,

menos tóxicos e apresentarem menor custo do que os líquidos iônicos apróticos. Além disso, possuem um hidrogênio ionizável que apresenta vantagens frente a um aumento da eficiência da hidrólise enzimática do bagaço para a produção de açúcares fermentescíveis (TRINH *et al.*, 2015).

1. OBJETIVOS

1.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho de 12 líquidos iônicos próticos (LIPs), no pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar, visando maximizar a recuperação de açúcares fermentescíveis durante a etapa de hidrólise enzimática e minimizar a perda de açúcares durante a etapa de pré-tratamento.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Sintetizar o 2HEAA e caracterizar todos os LIPs utilizados para a triagem;
2. Determinar as condições de pré-tratamento que forneçam as maiores conversões de hidrólise com o 2HEAA e avaliar a possibilidade de adicionar água ao LI para diminuir sua quantidade;
3. Avaliar a condição escolhida no pré-tratamento com 2HEAA e utilizar a combinação de Cellic Ctec2 e Cellic Htec2 na hidrólise enzimática para confirmar uma maior conversão de celulose e hemicelulose;
4. Realizar os ensaios de pré-tratamento com os LIPs escolhidos para a triagem para verificar o desempenho na etapa de hidrólise enzimática através do rendimento global da hidrólise utilizando o bagaço de cana-de-açúcar.

CAPÍTULO 2

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo apresenta uma visão geral de conceitos básicos e faz o uso de uma abordagem teórica necessária para o desenvolvimento da pesquisa. Além disso, é destacada a abordagem de tópicos específicos de utilização do LIP na dissolução da celulose.

2.1 BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

O bagaço de cana-de-açúcar é uma fração de biomassa resultante dos procedimentos de limpeza, preparo e extração da sacarose para fins de produção de etanol e de açúcar. É um subproduto fibroso heterogêneo, apresentando variações em sua composição química e na sua estrutura morfológica em função dos procedimentos de processamento industrial (SOARES, 2012).

Estima-se que na safra de 2015/2016 foram geradas em torno de 186 milhões de toneladas em base úmida (50% de umidade) de bagaço (CONAB, 2016). Essa biomassa pode ter diversos usos, tais como incorporação ao solo, produção de energia através da sua queima, produção de etanol de 2ª geração, dentre outras.

Após a extração da sacarose e outros nutrientes, obtem-se o bagaço de cana, biomassa rica em celulose e hemiceluloses, com baixo teor de cinzas quando comparado a outros resíduos agroindustriais, como palha de arroz, de cana e de trigo. Segundo Georges (2011), a composição do bagaço varia em torno de 38 a 50% de celulose, 25 a 27% de hemiceluloses, 20 a 30% de lignina e por fim, 5 a 8% de extrativos. Segundo Peres (1999), esta composição varia de acordo com a cana-de-açúcar, o solo, as técnicas de colheitas, o manuseio e armazenagem do mesmo.

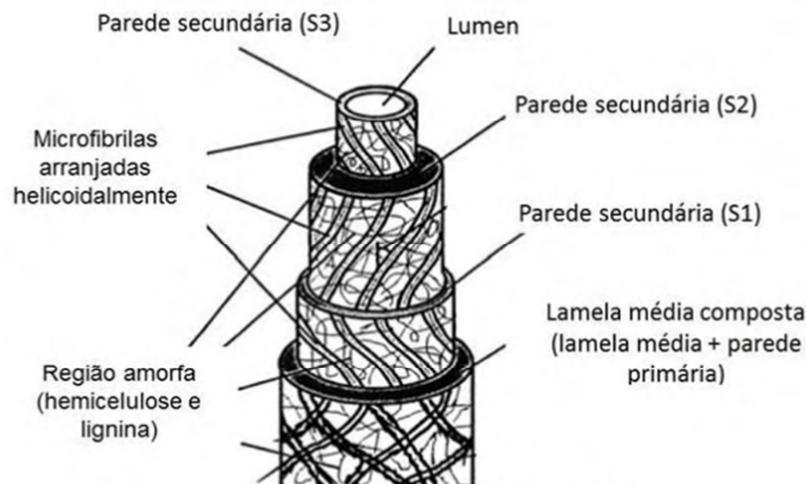
Os açúcares presentes na biomassa podem ser obtidos através de uma etapa de hidrólise enzimática, sendo especialmente advindos da celulose, e são posteriormente fermentados, pela ação de microrganismos, para a obtenção do etanol de 2ª geração (CLARKE *et al.*, 1988; PANDEY *et al.*, 2000; REIN, 2007; ARIEDI Jr. e MIRANDA, 2013). A fração de hemiceluloses também pode ser

convertida em etanol, embora os processos e microrganismos selvagens que fermentam pentoses ainda precisem de melhoras no seu desempenho.

Muitos estudos visam a produção de etanol de 2ª geração e para a maior parte do país, nas áreas tropicais e subtropicais, o bagaço é um dos principais materiais lignocelulósicos disponíveis para este fim (SANTOS *et al.*, 2009).

Uma estrutura típica de fibra lignocelulósica é apresentada na Figura 2.1. O bagaço apresenta na estrutura camadas distintas química e morfologicamente.

Figura 2.1 - Estrutura de uma fibra lignocelulósica.



Fonte: Adaptado de Thomas *et al.* (2011).

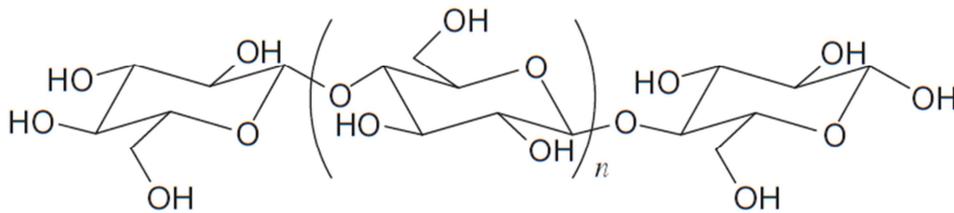
A parede primária, inicialmente presente enquanto a célula está crescendo, torna-se espessa e consideravelmente lignificada, circundando a parede secundária. Já a parede secundária é constituída de uma sequência de três lamelas (S1, S2 e S3), onde a camada central, S2, determina as propriedades mecânicas da fibra e usualmente é mais espessa que as outras lamelas por apresentar microfibrilas, helicoidalmente formadas por longas cadeias de celulose e organizadas no sentido da fibra (SILVA *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2012).

A partir da organização das fibras lignocelulósicas é gerado o modelo estrutural dos principais componentes do material. Essas fibras celulósicas são recobertas por hemiceluloses e por lignina, formando uma estrutura complexa que confere resistência mecânica à planta (SOARES, 2012).

2.1.1 Celulose

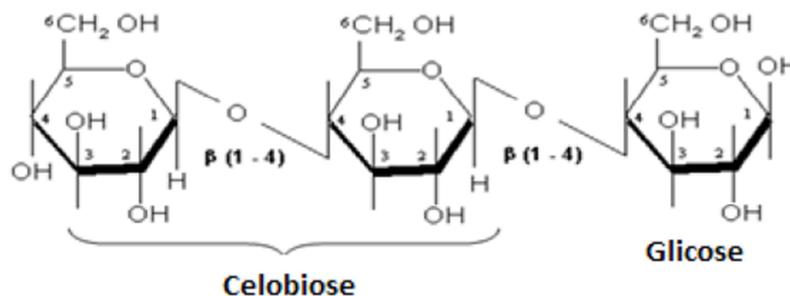
A celulose é o polímero natural de maior abundância nas plantas de toda a superfície terrestre, sendo encontrada em proporções que variam desde 20% até 90% nas espécies (SOUZA *et al.*, 2002). A celulose é uma estrutura linear, cristalina e com partes amorfas, que resulta de ligações de hidrogênio entre as moléculas de glicose e apresenta fibras compactas e resistentes à degradação, como mostrado na Figura 2.2 (OLIVEIRA, 2012).

Figura 2.2 - Representação esquemática da celulose.



A celulose é formada por dímeros de glicose chamados de celobiose ou anidroglicose sindiotática, que são formados por unidades de D-glicose unidas por ligações do tipo β -D (1 \rightarrow 4) glicosídicas, como observado na Figura 2.3.

Figura 2.3 - Representação da cadeia da celulose (celobiose e glicose)



As ligações do tipo β -D (1 \rightarrow 4) glicosídicas na estrutura da celulose são caracterizadas pelas distâncias das ligações, os respectivos ângulos formados, e pelos grupos hidroxila que estabelecem interações do tipo ligações de hidrogênio

intra e intermoleculares (SOUZA *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2012).

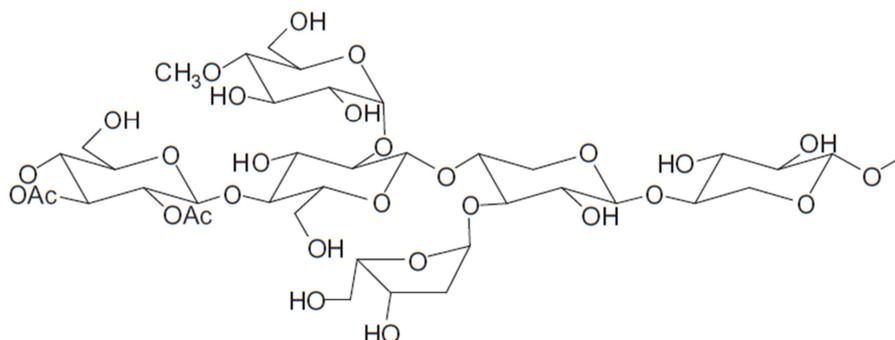
As ligações de hidrogênio atribuem à celulose uma forte tendência de formar regiões cristalinas, o que a torna altamente resistente à hidrólise ácida, alcalina ou enzimática. Essa formação é a principal influência para a celulose apresentar baixa solubilidade, além de poder exibir reatividade e cristalinidade, sendo que o grau de cristalinidade encontrado pode variar de acordo com seu processamento. As celulosas originadas das árvores apresentam cerca de 40% de cristalinidade (SILVA *et al.*, 2009).

Além das ligações de hidrogênio, a presença de hemiceluloses e lignina também dificulta o acesso de reagentes e catalisadores à celulose, sendo necessário um tratamento prévio para a remoção parcial destes componentes, facilitando o acesso das enzimas à celulose (BUCKERIDGE *et al.*, 2010).

2.1.2 Hemiceluloses

As hemiceluloses são polímeros heterogêneos de massas molares relativamente baixas, que estão associados à celulose em paredes celulares, na forma da estrutura da Figura 2.4. Elas representam cerca de 15 a 35% de biomassa vegetal.

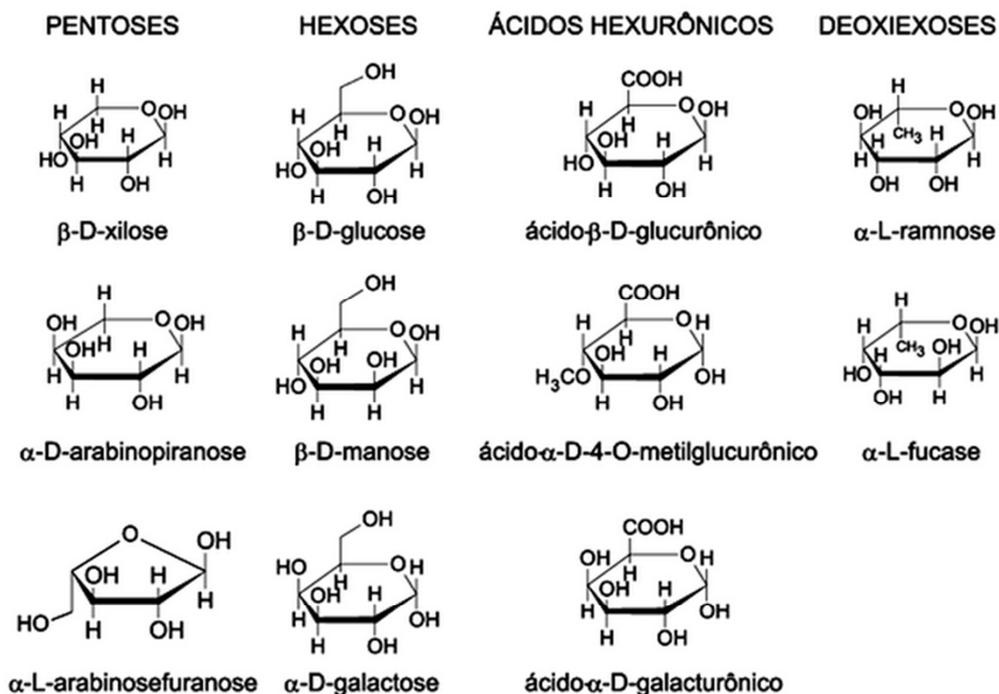
Figura 2.4 - Estrutura das hemiceluloses.



O termo hemiceluloses está ligado a uma classe de compostos poliméricos presentes em vegetais fibrosos, sendo que cada composto apresenta uma propriedade particular e sua proporção pode variar de acordo com a

procedência da biomassa. As hemiceluloses são compostas por diferentes açúcares, formando cadeias mais curtas e com ramificações, cuja estrutura pode ser condensada em proporções variadas, como apresentado na Figura 2.5 (MORAIS *et al.*, 2005). Os açúcares geralmente encontrados nas hemiceluloses dos vegetais são as pentoses (xilose e arabinose), hexoses (glucoses, manoses e galactoses) e ácidos urônicos (4-O-metil-D-glucurônico, ácido D-galacturônico, e ácido D-glucurônico).

Figura 2.5 - Representação dos açúcares que compõem as hemiceluloses.



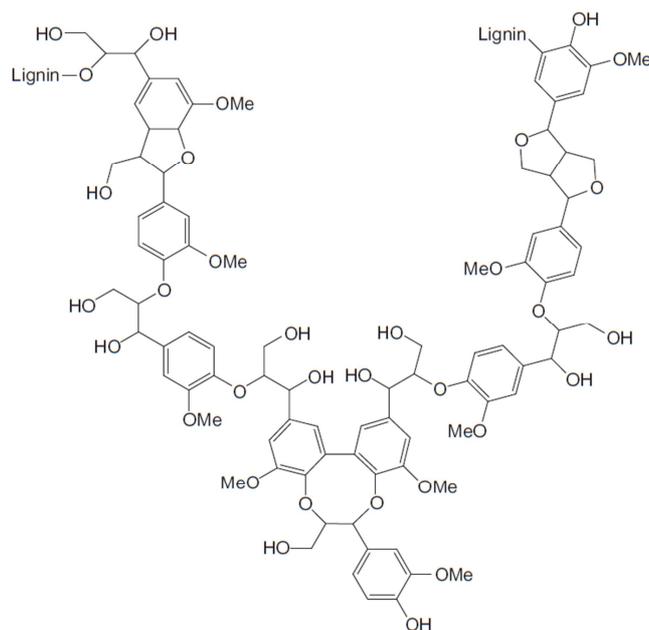
As hemiceluloses interagem mais facilmente com a celulose, pois apresentam ramificações na sua estrutura que são semelhantes à celulose e não à lignina. Além disso, as hemiceluloses não são cristalinas, logo são mais vulneráveis a ataques químicos e enzimáticos. Possuem uma estrutura bastante hidrofílica e apresentam considerável reatividade na sua cadeia com caráter amorfo (AYALA, 2012; SANTOS *et al.*, 2012).

2.1.3 Lignina

A lignina é o segundo componente mais abundante na maioria das biomassas, e representa cerca de 20 a 35% da massa total, podendo variar de uma espécie para outra. A lignina é uma macromolécula amorfa, hidrofóbica, heterogênea, altamente ramificada e que atua como fortalecedor no interior das fibras, criando uma adesão entre a celulose e as hemiceluloses, gerando uma barreira física no momento da hidrólise enzimática (SILVA *et al.*, 2009).

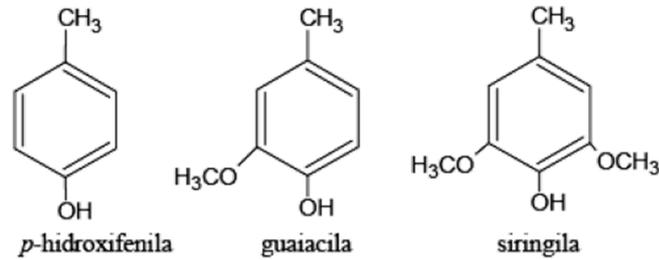
Essa macromolécula é constituída por um arranjo irregular de vários grupos fenilpropano, dando origem a uma estrutura tridimensional muito complexa, como apresentado na Figura 2.6 (MOHAN *et al.*, 2006).

Figura 2.6 - Representação da estrutura da lignina.



Segundo Sanchez (2009), a síntese da lignina ocorre por radicais livres que são liberados pela desidrogenação de três principais unidades aromáticas básicas que são p-hidroxifenila, guaiacila e seringila (Figura 2.7).

Figura 2.7 - Estruturas precursoras da lignina.



Segundo as pesquisas de Koullas *et al.* (1992), quanto maior a remoção de lignina no pré-tratamento, maior será a conversão da biomassa em açúcares. Entretanto, a degradação da lignina envolve múltiplas reações que devem ocorrer simultaneamente (hidroxilações e desmetilações) para que a estrutura seja quebrada. Além disso, não existe um método bem estabelecido para isolar a lignina em sua forma original, o que dificulta a sua retirada por completo dos demais materiais lignocelulósicos.

2.1.4 Extrativos

Os extrativos da planta têm como principal função a proteção contra agentes patogênicos, reserva de energia e ainda oferecem a planta determinadas características, como cor, cheiro, propriedades abrasivas e resistência ao apodrecimento natural (DALMEIDA, 1998).

A biomassa contém pequena quantidade de extrativos, variando de 2 a 8%, dependendo da idade da planta, altura, espécie e condições climáticas. Esses extrativos podem ser constituídos por alguns minerais orgânicos, tais como potássio, sódio, fósforo, cálcio e magnésio; e extratos orgânicos, que incluem gorduras, ceras, proteínas, alcalóides, fenólicos, açúcares simples, pectinas, mucilagens, gomas, resinas, terpenos, amidos, glicosídeos saponinas e óleos essenciais (MOHAN *et al.*, 2006).

Há também frações não extraíveis que representam cerca de 2% do peso seco das biomassas. É constituída por cinzas e resíduos inorgânicos que permanecem depois de queimar o substrato a elevadas temperaturas (FENGEL e

WEGENER, 1989). A baixa degradabilidade de muitos destes compostos pode dificultar a conversão da biomassa.

2.2 PRÉ-TRATAMENTO

Visando alcançar altos rendimentos de açúcares fermentescíveis durante a etapa de hidrólise enzimática, o desenvolvimento de uma etapa de pré-tratamento eficiente é necessário.

O pré-tratamento da biomassa pode solubilizar parcialmente a lignina que atua como uma barreira natural, além de diminuir a cristalinidade da fração celulósica, tornando-a mais acessível ao ataque enzimático e proporcionando maiores concentrações de açúcares após a etapa de hidrólise enzimática. Além disso, dependendo do tipo de pré-tratamento, este pode promover a solubilização da fração hemicelulósica da biomassa (CHEN *et al.*, 2009; TADESSE e LUQUE, 2011). Existem apenas alguns pré-tratamentos capazes de modificar a estrutura da celulose e manter a composição da biomassa inalterada.

Numerosos pré-tratamentos têm sido desenvolvidos, e cada um desses apresentam vantagens e desvantagens que são apresentadas na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 - Principais métodos de pré-tratamento.

Método	Vantagens	Desvantagens
Biológico	<ul style="list-style-type: none"> - Degradação de lignina e hemiceluloses - Baixo consumo de energia 	<ul style="list-style-type: none"> - Baixa diminuição da cristalinidade
Explosão de vapor	<ul style="list-style-type: none"> - Há modificação na estrutura da lignina e solubilização parcial da celulose - Custo efetivo 	<ul style="list-style-type: none"> - Geração de compostos tóxicos - Degradação parcial das hemiceluloses
AFEX (Explosão de amônia)	<ul style="list-style-type: none"> - Aumenta da área superficial - Baixa formação de inibidores 	<ul style="list-style-type: none"> - Grandes quantidades de amônia - Baixa eficiência com matérias primas de alto teor de lignina
Explosão de CO₂	<ul style="list-style-type: none"> - Baixa geração de compostos tóxicos - Custo efetivo - Aumento da área superficial 	<ul style="list-style-type: none"> - Requer alta pressão - Não afeta a lignina e as hemiceluloses
Ácido concentrado	<ul style="list-style-type: none"> - Alto rendimento de glicose - Temperaturas ambientes 	<ul style="list-style-type: none"> - Formação de inibidores - Corrosão no reator ao longo do tempo - Custo elevado do ácido e necessidade de recuperação
Ácido diluído	<ul style="list-style-type: none"> - Baixa formação de inibidores - Baixos problemas de corrosão em comparação ao ácido concentrado 	<ul style="list-style-type: none"> - Geração de produtos de degradação
Organossolve	<ul style="list-style-type: none"> - Recuperação de lignina como um subproduto 	<ul style="list-style-type: none"> - Alto custo - Solventes necessitam de recuperação
Ozônio	<ul style="list-style-type: none"> - Redução na concentração de lignina - Baixa geração de compostos tóxicos 	<ul style="list-style-type: none"> - Alta quantidade de ozônio - Alto custo
Oxidativo	<ul style="list-style-type: none"> - Eficiente remoção de lignina - Baixa formação de inibidores 	<ul style="list-style-type: none"> - Alto custo do catalisador

Fonte: Adaptado de Alvira *et al.* (2010)

A efetividade do pré-tratamento está diretamente relacionada com a baixa degradação da celulose, evitar a formação dos inibidores de fermentação, promover um material altamente hidrolisável, e diminuir o consumo de energia e reagentes.

Segundo Mosier *et al.* (2003), o pré-tratamento é uma das etapas de maior custo no processo de conversão da biomassa lignocelulósica em etanol de 2ª geração. Para diminuição de custos, estudos vêm sendo desenvolvidos para melhorar a eficiência desse processo.

Estudos recentes apontam o processamento de biomassa lignocelulósica com líquidos iônicos (solventes verdes). Esses têm ganhado destaque devido à facilidade do solvente em interagir com a biomassa e, conseqüentemente, alcançar alta efetividade na dissolução da mesma.

2.2.1 Pré-tratamento com líquidos iônicos (LIs)

A utilização de líquidos iônicos (LIs) no pré-tratamento é o mais recente desenvolvimento para a dissolução da biomassa lignocelulósica na hidrólise enzimática. LIs são uma alternativa de grande potencial frente aos demais já estudados, pois apresentam uma alta eficiência na etapa de hidrólise posterior e o solvente é considerado ambientalmente amigável (BRANDT *et al.*, 2013).

Os LIs demonstram diminuir a maior parte da cristalinidade da celulose em condições de menor severidade e, além disso, a recuperação do solvente é atraente ao mercado (TADESSE e LUQUE, 2011).

2.2.1.1 Líquidos iônicos (LIs): Conceitos, propriedades e aplicações.

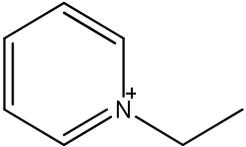
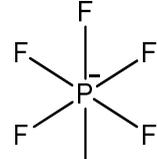
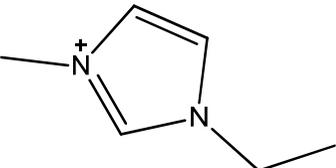
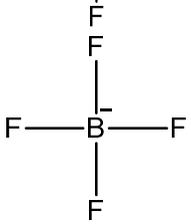
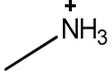
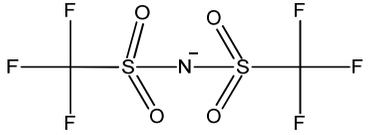
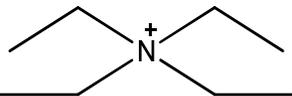
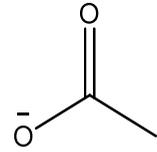
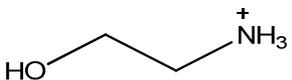
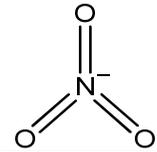
Os líquidos iônicos, também conhecidos como sais fundidos, são compostos formados por um cátion orgânico e um ânion inorgânico ou orgânico e apresentam uma temperatura de fusão inferior a 100°C (TADESSE e LUQUE, 2011). Os LIs são conhecidos desde 1888, quando Gabriel e Weiner descobriram e expuseram o nitrato de 2-hidroxi-etilamônio, mas foi em 1914 que Walden sintetizou o primeiro LI à temperatura ambiente, o nitrato de etilamônio (DUPONT, 2004).

Faraday foi um dos pioneiros na aplicação de LIs na área de eletroquímica para baterias de lítio. Porém, a partir de novas sínteses com um produto líquido à temperatura ambiente, estável no ar e em água, os campos de aplicação dos LIs foram ampliados, tais como: processos de extração, reações de síntese, catálise homogênea e heterogênea em processos eletroquímicos, biocatálise, purificação por extração líquido-líquido, remoção de íons metálicos, purificação de gases, degradação fotolítica de compostos orgânicos, e mais recentemente na valorização da biomassa lignocelulósica, entre outros (DUPONT, 2004; ÁLVAREZ *et al.*, 2010a; TADESSE e LUQUE, 2011).

Os LIs apresentam uma vasta área de aplicação devido à diversidade de características que eles apresentam, tais como: baixas temperaturas de fusão, inflamabilidade e volatilidade, boa condutividade elétrica, alta viscosidade, pressão de vapor desprezível, estabilidade térmica, química e física, anti-corrosividade, e podem ser armazenados por longos períodos sem decomposição. Além disso, alguns LIs são considerados “solventes verdes” por não emitirem compostos orgânicos voláteis (VOC's), serem passíveis de reciclagem e reutilização e por se apresentarem ambientalmente mais favorável devido às reduções em geração de subprodutos, perdas de solvente e uso energético (DUPONT, 2004; ÁLVAREZ *et al.*, 2010a; FRANZOI *et al.*, 2011; SCREMIN, 2013).

Uma das grandes vantagens dos LIs é a grande flexibilidade em suas propriedades e a possibilidade de serem sintetizados por diversas combinações de cátions e ânions, permitindo a obtenção de um solvente que possa se adequar a uma necessidade específica do processo (HUDDLESTON *et al.*, 1998). Alguns exemplos de ânions e cátions que podem ser utilizados para a síntese de novos LIs são apresentados na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 – Exemplos de cátions e ânions utilizados na síntese de LIs.

Cátion	Estrutura	Ânion	Estrutura
Etilpiridínio		Hexafluorofosfato	
1-etil-3-metilimidazólio		Tetrafluoroborato	
Metilamônio		Bis (trifluormetilsulfonil) imida	
Tetrametilamônio		Acetato	
Hidroxietilamônio		Nitrato	

Os LIs podem ser divididos em dois grupos, apróticos (LIAPs) e próticos (LIPs). Os LIAPs são sintetizados por uma reação de adição de um haleto de alquila, diferentemente dos LIPs que são sintetizados a partir de uma transferência do próton a partir de um ácido de Brønsted para uma base de Brønsted (Equação 1), induzindo a doação e recepção de prótons (FEI *et al.*, 2004; GREVES; DRUMMOND, 2008). Neste sentido, os LIPs apresentam, portanto, um hidrogênio ionizável (H^+) em sua estrutura final.



Álvarez *et al.* (2010a), Ghandi (2014) e Greaves e Drummond (2015) enfatizaram que os LIPs são de baixo custo e toxicidade, facilmente sintetizados e sem a formação de subprodutos, além de solúveis em água.

Na literatura podem-se destacar alguns estudos que envolvem a síntese de LIPs. Hirao *et al.* (2000) mostraram uma série de sais de amônio obtidos pela neutralização com ácido tetrafluorbórico. Bicak (2005) sintetizou um LI a partir da neutralização de monoetanolamina com ácido fórmico e Greaves *et al.* (2006) propuseram diferentes LIPs, a partir de aminas primárias com ácidos inorgânicos e orgânicos.

Iglesias *et al.* (2008) e Álvarez *et al.* (2010a) sintetizaram LIPs modificando a cadeia alifática dos ácidos orgânicos e utilizando hidroxiaminas secundárias e terciárias. Verdía *et al.* (2014) sintetizaram LIPs a partir da mistura de 1-butimidazol e ácido sulfúrico, destacando que esse tipo de LI possibilita aplicações em diferentes áreas por possuir prótons com alta mobilidade e facilmente trocáveis.

George *et al.* (2015) realizaram um extenso estudo de síntese com a utilização do ânion hidrogenossulfato e sua combinação com sete cátions: mono, di e trietilamônio, mono, di e trietanolamônio, e diisopropilamônio. Os autores afirmam que esses LIPs possuem uma elevada estabilidade térmica, reduzindo o risco de degradação dos mesmos, além de evitar resíduos associados ao processo.

Todos os autores citados enfatizam o baixo custo e a simplicidade de síntese destes LIPs. Além disso, Verdia *et al.* (2014) e George *et al.* (2015) estudaram a aplicação dos LIPs para o fracionamento de biomassa lignocelulósica.

2.2.1.2 Aplicação do LI no processamento de biomassa lignocelulósica

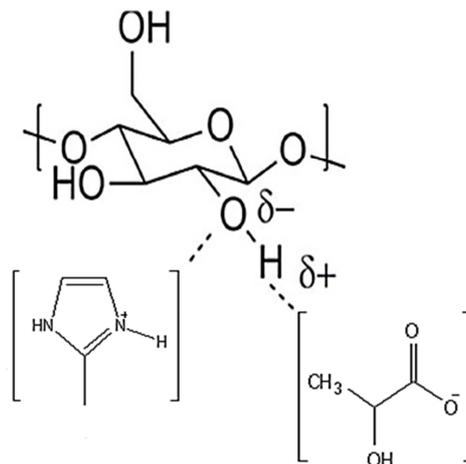
Os atuais métodos para dissolução de materiais lignocelulósicos são processos nos quais os solventes e produtos muitas vezes são voláteis, tóxicos ou de difícil recuperação. Uma alternativa são os LIs, considerados boas opções pelas grandes vantagens já mencionadas (MÄKI-ARVELA *et al.*, 2010).

A vantagem na utilização do LI em relação a outros métodos de pré-tratamento é a sua capacidade de desestruturar a celulose e solubilizar a lignina, alcançando altas conversões de açúcares fermentescíveis (VERDÍA *et al.*, 2014)

Os cátions possivelmente têm a facilidade de interagir com a superfície da celulose por meio de forças de dispersão e ligações de hidrogênio entre os átomos de oxigênio nas ligações glicosídicas e grupos hidroxilas, reduzindo a cristalinidade da celulose (BRANDT *et al.*, 2013).

A força e a direcionalidade de interações entre os LIs e a celulose ainda é objeto de debate. A Figura 2.8 ilustra um mecanismo de interação do LIP lactato de 1-metilimidazólio na estrutura da celulose.

Figura 2.8 - Mecanismo ilustrativo de interação do LIP com a celulose.



Fonte: Adaptado de Meenatchi *et al.* (2016).

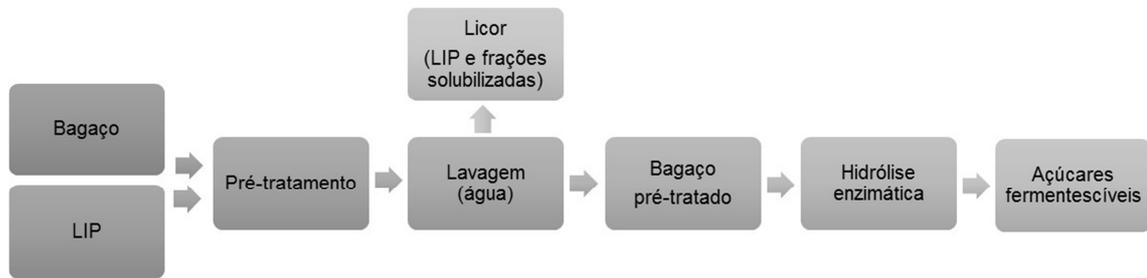
O ânion também apresenta interação com a biomassa e sua seleção deve ser levada em consideração. Angell *et al.* (2007), D'Andola *et al.* (2008), Greaves e Drummond (2008), Mäki-Arvela, *et al.* (2010), Olivier-Bourbigou *et al.* (2010) e Brandt *et al.* (2013) afirmam que o hidrogênio ionizável gerado na síntese dos LIPs utilizando ânions acetato, formiato, propionato ou lactato, possivelmente interagem mais facilmente com grupos hidroxila a partir da formação de fortes ligações de hidrogênio. Em contrapartida, o hidrogênio também pode competir com o grupo hidroxila do cátion, se houver, diminuindo o ataque às hidroxilas.

Greaves *et al.* (2008); Greaves e Drummond (2008), Brandt *et al.* (2013) e Meenatchi *et al.* (2016) estudaram ânions com cadeia orgânica pequena, com ligações de hidrogênio e cátion pequenos, e verificaram que o LIP pode interagir de forma mais eficiente com grupos hidroxilas da celulose. Os ânions podem interagir com os grupos hidroxilas equatoriais, competindo com as interações entre as lamelas da celulose, separando as cadeias e seus vizinhos laterais.

A interação da celulose com o LIP pode diminuir pela alta viscosidade obtida da combinação do ânion e do aumento da cadeia do cátion. Tal combinação gera interações de Van der Waals e ligações de hidrogênio mais intensas (CONSORTI *et al.*, 2001, MEENATCHI *et al.*, 2016). A viscosidade dos LIs pode ser diminuída com o aumento da temperatura ou a adição de um co-solvente, no caso dos LIPs, a água (MÄKI-ARVELA *et al.*, 2010).

Na Figura 2.9 é apresentado um fluxograma do pré-tratamento seguido da hidrólise enzimática. O processo de dissolução do bagaço com LIPs é baseado em duas etapas: pré-tratamento, onde ocorre a dissolução total ou parcial da biomassa no LIP sob aquecimento; lavagem, onde o bagaço tratado é lavado por adição de um co-solvente (água) para eliminar traços de LIP e inibidores das etapas subsequentes. Em alguns casos as hemiceluloses podem ser solubilizadas pelo LIP e, assim, os açúcares precisariam ser recuperados no meio (Rocha, 2016).

Figura 2.9 - Fluxograma de pré-tratamento do bagaço utilizando LIPs.



Durante a etapa de lavagem, há a formação de um sistema bifásico no qual a celulose apresenta uma diminuição de cristalinidade e recalcitrância, o que propicia o aumento da conversão da celulose durante o processo de hidrólise enzimática, além disso, a lignina pode ser recuperada durante a precipitação desse licor extraído (BRANDT *et al.*, 2013).

A recuperação da lignina no licor é uma das vantagens do pré-tratamento com LI. Essa fração de lignina é considerada pura e pode ser convertida em produtos químicos de maior valor agregado e o LI utilizado também pode ser recuperado por meio de evaporação da água no licor (YAN *et al.*, 2015).

A celulose é o componente da biomassa lignocelulósica mais amplamente investigado para a dissolução com LI. Uma série de estudos sobre a dissolução seletiva com LIAs é encontrada na literatura, entretanto o baixo custo dos LIPs vem estimulando um interesse em sua utilização para o pré-tratamento da biomassa.

Em um recente estudo de Verdía *et al.* (2014) foi utilizado o hidrogenossulfato de 1-butilimidazólio [C₄mim:H₂SO₄] com razões molares ácido-base de 1,00:0,99, e diluídos (20% água e 80% LI v/v) para pré-tratar a biomassa *Miscanthus giganteus*. Após um pré-tratamento a 120°C por 2, 4 e 24 h, seguido de hidrólise enzimática de 96 h, foram obtidos 65, 80 e 84% de conversão de glicose, respectivamente. Observou-se que a adição de água e tempos de pré-tratamento mais longos resultaram em conversões de glicose mais elevadas.

D'Andola *et al.* (2008) combinaram o cátion DBU (1,8-diazabicyclo[5,4,0]undec-7-eno) com os ânions acetato hidrogenossulfato, lactato, entre outros. Todos eles se apresentaram eficientes na solubilização da lignina e

parcialmente da celulose com variações de 24 à 48h e temperaturas de 100 a 150°C.

Eta *et al.* (2014) também estudaram o DBU, mas combinado com a dietanolamina e CO₂ para o fracionamento de chips de bétula por 30 h a 120°C. Após o pré-tratamento em um reator em modo batelada, a porcentagem de teor mássico de celulose no material pré-tratado aumentou 20% quando comparado à biomassa *in natura*.

Meenatchi *et al.* (2016) alcançaram uma dissolução da celulose em 5% (m/m) com o LIP lactato de 1-etil imidazolio em 20 minutos de reação a 80°C. Concluíram que a cristalinidade da celulose foi reduzida e, além disso, toda a celulose regenerada possuía nanoestrutura e temperatura de decomposição térmica mais baixa do que a celulose inicial.

George *et al.* (2015) realizaram um pré-tratamento com *switchgrass* por 3 h a 120°C com 20% de água, seguido de uma hidrólise enzimática de 48 h com 20 mg de proteína (Celic CTec2) por grama de glicana. O LIP hidrogenossulfato de trietilamônio apresentou a maior conversão de celulose em glicose, 45%, seguido por 40% quando utilizado o hidrogenossulfato de dietilamônio. Para os mesmos LIPs não foram observadas reduções no teor de lignina, o que explica os baixos rendimentos de hidrólise. Os autores afirmam que os LIs sintetizados a partir de ácido sulfúrico mostraram uma característica importante de baixa deslignificação da biomassa.

Além da dissolução da celulose, estudos utilizando os LIs também são realizados com foco na solubilização da lignina. Rashid *et al.* (2016) obtiveram solubilizações de 70%, 64% e 55% (m/m) de lignina para os LIs formiato de piridínio, acetato de piridínio e propionato de piridínio, respectivamente, em baixa temperatura, 75°C. O aumento do comprimento da cadeia do ânion resultou na diminuição da solubilidade da lignina.

Brandt *et al.* (2011) e George *et al.* (2015) afirmaram que quantidades de água apreciáveis adicionadas ao processo, podem contribuir de forma eficaz ao pré-tratamento com LIs, eliminando a necessidade de condições anidras e diminuindo

quantidades excessivas de LI no processo. Além de evitar uma etapa anterior ao pré-tratamento, a secagem da biomassa.

Brandt *et al.* (2015) admitiram que a utilização da água no processo junto ao LI deixa o próton com maior mobilidade e este pode estar mais disponível. Provavelmente o mecanismo de despolimerização da lignina nesse processo seja parecido com o do pré-tratamento ácido.

Tan *et al.* (2009) afirmaram que o tempo de pré-tratamento pode ser diminuído com o uso de temperaturas mais elevadas, entretanto deve-se tomar os devidos cuidados para minimizar as reações secundárias e manter a estabilidade da molécula do LI utilizado sem degradação.

2.3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

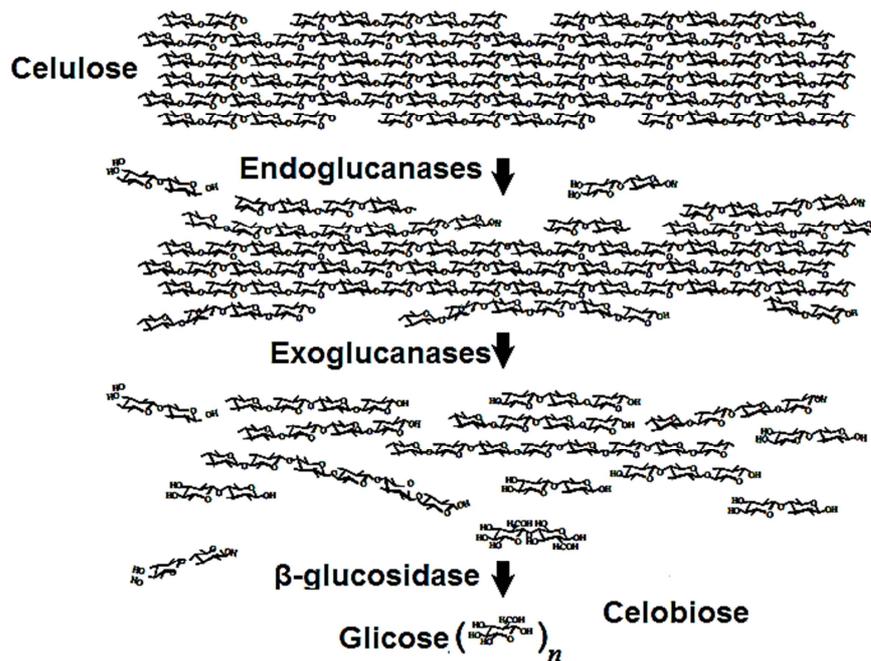
A hidrólise enzimática é um processo que permite a conversão de celulose e hemiceluloses remanescentes na biomassa em açúcares monoméricos e oligossacarídeos de baixa massa molar (ALVIRA *et al.*, 2010). A produção destes açúcares irá depender do complexo enzimático escolhido, sendo possível alcançar altos rendimentos de açúcares monoméricos. A remoção da lignina, embora não seja imprescindível, melhora o desempenho do processo de hidrólise.

Zheng *et al.* (2009) e Alvira *et al.* (2010) afirmam que a hidrólise enzimática é considerada a chave para a produção de etanol 2G ser considerada economicamente viável, pois uma menor quantidade de subprodutos é gerada, resultando em um alto rendimento de açúcares fermentescíveis. Contudo, para se atingir uma alta conversão da celulose, podem ser necessárias altas concentrações da enzima, e seria desejável que as mesmas fossem recuperadas e recicladas, podendo assim ser utilizadas em altas concentrações, a baixo custo (MOSIER, *et al.*, 2005; SILVA, 2013).

As enzimas são consideradas os agentes mais importantes no processo de hidrólise enzimática. As enzimas celulasas, que são altamente específicas, são utilizadas na conversão de biomassa lignocelulósica em glicose. As celulasas são um complexo enzimático cujos três maiores grupos envolvidos no processo são: endoglucanases; exoglucanases e β -glucosidase (SUN e CHENG, 2002).

Esse complexo trabalha em sinergia, onde as enzimas endoglucanases agem de forma aleatória, clivando a ligação beta 1-4 entre dois resíduos de glicose, dentro da cadeia de celulose. As exoglucanases removem as unidades de celobiose a partir das extremidades da cadeia da celulose e as β -glucosidases quebram a celobiose em duas unidades de glicose (Figura 2.10) (QUINTERO *et al.*, 2011).

Figura 2.10 - Ação das enzimas na celulose.



Fonte: Adaptada de Martins, (2005).

O rendimento da hidrólise enzimática depende da adsorção da enzima e de sua eficiência quando adsorvida, já que o processo de hidrólise da celulose é baseado em três etapas: adsorção das enzimas celulases na superfície da celulose, biodegradação da celulose a glicose e, por fim, a dessorção da celulase (SUN e CHENG, 2002).

Para que se alcancem altos rendimentos na hidrólise enzimática, há diversos fatores que devem ser levados em consideração. A temperatura e o pH são as principais condições que interferem na eficiência de atuação das enzimas, sendo a faixa de temperatura ideal entre 50 e 60°C e pH entre 5 e 6 (KURABI *et al.*, 2005; LINDE *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2009; QUINTERO *et al.*, 2011; MESA *et al.*, 2016)

A relação enzima-substrato também deve ser levada em consideração, visto que o aumento na concentração de enzima aumenta a velocidade da hidrólise. Porém, o excesso da mesma compromete a viabilidade do processo, devido ao alto custo. Uma faixa que varia entre 5 FPU/g até 100 FPU/g de substrato é apresentada por diversos autores (KURABI *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2009; MONSCHEIN e NIDETZKY, 2016; MESA *et al.*, 2016). Atividades na faixa de 10-15 FPU/g de substrato provavelmente são o valor limite para que o processo seja economicamente viável (MARTÍN, *et al.*, 2012).

CAPÍTULO 3

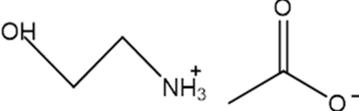
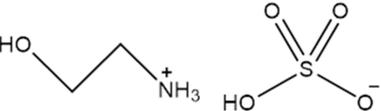
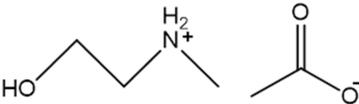
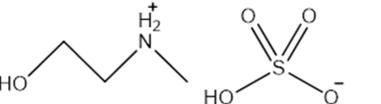
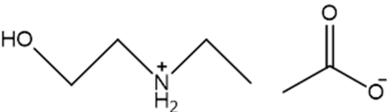
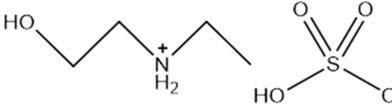
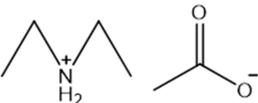
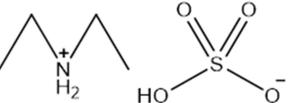
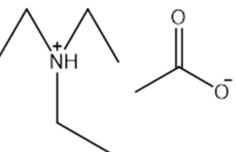
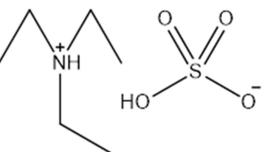
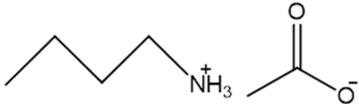
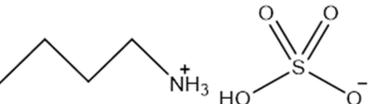
3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Neste capítulo são apresentadas as metodologias utilizadas no trabalho e as especificações dos procedimentos realizados estão descritas nos Apêndice A, B, C e D. Os experimentos foram realizados em duplicata, e foram divididos em duas etapas, sendo a primeira a síntese e caracterização dos LIPs; e a segunda a preparação das amostras de bagaço, análises de composição química, pré-tratamento e hidrólise enzimática.

3.1 SÍNTESE E ANÁLISE DOS LIPs

O estudo avaliou 12 LIPs com a combinação de ânions hidrogenossulfato $[\text{HSO}_4]^-$ e acetato $[\text{CH}_3\text{COO}]^-$, e cátions de 2-hidroximonoetanolamina, trietilamina, n-butilamina, dietilamina, N-etil-2-hidroxietilamina e N-metil-2-hidroxietilamina. Na Tabela 3.1 são apresentadas as siglas utilizadas ao longo do trabalho para descrever os LIs.

Tabela 3.1 - LIPs utilizados ao longo do estudo.

SIGLA	NOME	ESTRUTURA	SIGLA	NOME	ESTRUTURA
2HEAA	Acetato de 2-hidroxi monoetanolamônio		2HEAHS	Hidrogenossulfato de 2-hidroxi monoetanolamônio	
M-2HEAA	Acetato de N-metil-2-hidroxi etilamônio		M-2HEAHS	Hidrogenossulfato de N-metil-2-hidroxi etilamônio	
E-2HEAA	Acetato de N-etil-2-hidroxi etilamônio		E-2HEAHS	Hidrogenossulfato de N-etil-2-hidroxi etilamônio	
DEAA	Acetato de 2-dietilamônio		DEAHS	Hidrogenossulfato de 2-dietilamônio	
TEAA	Acetato de 3-trietilamônio		TEAHS	Hidrogenossulfato de 2-trietilamônio	
BEAA	Acetato de N-butilamônio		BEAHS	Hidrogenossulfato de N-butilamônio	

Os LIPs M-2HEAA, E-2HEAA, DEAA, TEAA, BEAA, 2HEAHS, M-2HEAHS, E-2HEAHS DEAHS, TEAHS E BEAHS foram sintetizados pelo grupo de pesquisa da Prof^a Dr^a Silvana Mattedi e Silva, da Universidade Federal da Bahia (UFBA), no Laboratório de Processos de Separação e Termodinâmica Aplicada. O 2HEAA foi sintetizado pela mestrandia no Laboratório de Engenharia de Processos Fermentativos e Enzimáticos (LEPFE), na Faculdade de Engenharia Química (FEQ) na Unicamp. As sínteses foram baseadas nos trabalhos de Álvarez *et al.* (2010b; 2012; 2013), Iglesias *et al.* (2010), Ostenen *et al.* (2015) e George *et al.* (2015).

As sínteses foram realizadas pelo método de neutralização ácido-base, utilizando uma razão equimolar. Para a síntese do 2HEAA, a amina foi adicionada em um reator de vidro encamisado de 500 mL, com uma tampa de três bocas, sendo acoplada a um condensador de refluxo, um funil de decantação com gotejador para o ácido e um agitador mecânico com agitação de 95 rpm. O reator era resfriado mediante a circulação de água na camisa para manter a temperatura em 10°C, pois a reação é exotérmica. O ácido foi adicionado, gota a gota no reator, pelo funil de decantação para não haver excesso de aquecimento no momento da reação. Na Figura 3.1 é ilustrado o sistema utilizado.

Figura 3.1 - Sistema de síntese do LI.



Na síntese dos LIPs utilizando o ácido sulfúrico, houve a necessidade de se diluir o mesmo em água (1 mL de H₂SO₄ para 3 mL de H₂O), já que a reação de síntese é muito exotérmica. No produto final era encontrada alta concentração de água (aproximadamente 70%), sendo necessário evaporar o LIP em rotaevaporador (Marconi – MA120) a aproximadamente 50°C até alcançar uma concentração de água menor que 15%.

Com base na metodologia de Iglesias *et al.* (2010), Mattedi *et al.* (2011) e Pinto (2015), depois da síntese, uma análise dos LIPs foi realizada, utilizando técnicas de ressonância magnética nuclear para carbono-13 (RMN¹³C) e hidrogênio-1 (RMN¹H). As análises foram realizadas no Laboratório de Síntese de Produtos Naturais e Fármacos (LSPNF) do Instituto de Química (IQ) da Unicamp. Além disso, uma análise termogravimétrica (TG) para determinação da degradação térmica dos LIPs foi realizada no Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC) da Faculdade de Engenharia Química (FEQ) da Unicamp. A densidade e o pH foram determinados no Laboratório de Equilíbrio de Fases (LEF) da FEQ/Unicamp. Por fim, a viscosidade foi analisada no Laboratório de Óleos e Gorduras (LOG) da Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA), também da Unicamp.

A descrição sobre os equipamentos e condições destas análises é apresentada no Apêndice A.

3.2 PREPARAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA DO PRÉ-TRATAMENTO

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado nos experimentos foi fornecido pela Usina São João (Grupo USJ), localizada na cidade de Araras, São Paulo. O material foi proveniente da safra 2012/2013 e obtido por colheita mecânica. O material foi seco em temperatura ambiente e armazenado em sacos plásticos, em ambiente ausente de umidade, para posterior caracterização e pré-tratamento (Figura 3.2).

Figura 3.2 - Bagaço de cana-de-açúcar *in natura*.



3.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO

A caracterização do bagaço *in natura* e depois de cada etapa de pré-tratamento foi realizada para quantificação dos teores de cinzas, extrativos, celulose, hemiceluloses e lignina. As metodologias utilizadas foram descritas no Apêndice B.

As etapas de pré-tratamento, hidrólise enzimática e caracterização do bagaço foram realizados no LEPFE e no Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), localizado em Campinas/São Paulo.

3.4 PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO

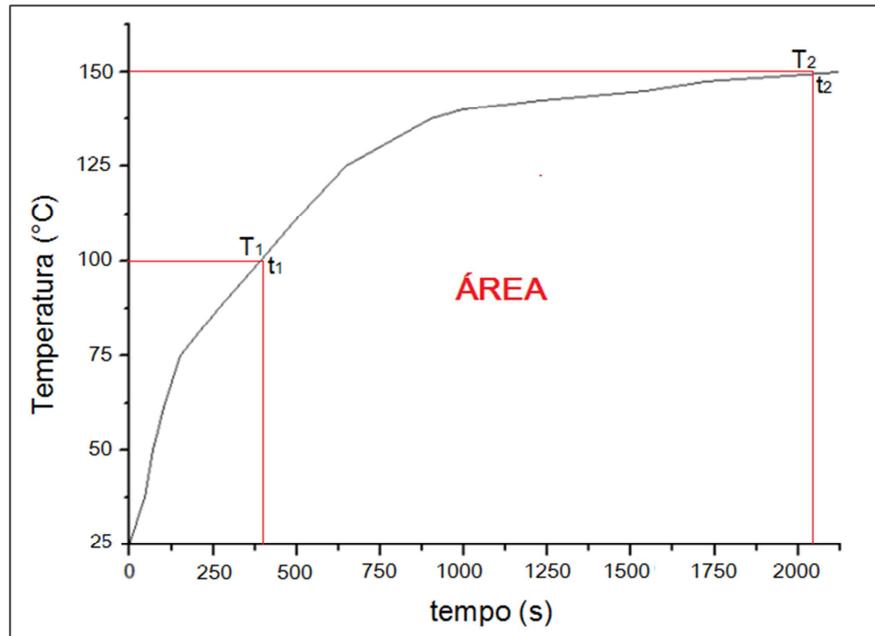
3.4.1 Rampa de aquecimento do reator

Para se obter o conhecimento do tempo exato no qual o reator de inox (500 mL) atingiu a temperatura desejada, realizou-se em uma etapa anterior ao pré-tratamento para cada temperatura de reação estabelecida, baseada no monitoramento da temperatura no interior do reator em função do tempo.

A literatura reporta que a partir da temperatura de 100°C, a reação de remoção dos componentes da biomassa lignocelulósica se inicia (RABELO, 2010). Portanto, para evitar que o tempo de reação fosse considerado erroneamente,

realizou-se, para cada temperatura um cálculo para obter o tempo útil de reação. Na Figura 3.3 dado um exemplo para a temperatura de 150°C, onde t_1 e t_2 são os tempos em segundos e T_1 e T_2 as temperaturas em °C.

Figura 3.3 - Exemplo do cálculo para o tempo útil da reação de pré-tratamento.



A partir da área obtida da Figura 3.3 foi utilizada a seguinte Equação (2):

$$\text{Tempo}_{\text{útil}} = \text{Tempo}_{\text{reação}} + \text{Tempo}_{\text{rampa}} - \text{Fator H} \quad (2)$$

$$\text{Fator H} = (t_2 - t_1) - \frac{\text{Área}}{(T_2 - T_1)}$$

Onde:

- Tempo_{útil}: é o tempo total da reação ao final considerando o tempo de aquecimento do reator;
- Tempo_{reação}: Tempo estabelecido para o pré-tratamento;
- Tempo_{rampa}: Tempo de aquecimento da rampa a partir de 100°C até a temperatura desejada.

3.4.2 Pré-tratamento com LIPs

Inicialmente foi avaliado só o LIP 2HEAA com o intuito de melhorar seu desempenho no pré-tratamento e posterior hidrólise enzimática, pois, o mesmo já foi estudado por Rocha (2016) no grupo de pesquisa.

Foi avaliada inicialmente a máxima temperatura de degradação do 2HEAA. Rocha (2016) realizou o pré-tratamento a 150°C e, com o intuito de avaliar se o aumento da temperatura continuava afetando o rendimento global da hidrólise foi realizado ensaios a 150 e 175°C por 2 h.

A partir da determinação da temperatura máxima de pré-tratamento foram realizados ensaios segundo um planejamento fatorial 3^2 com triplicata no ponto central para avaliar uma faixa de temperaturas e tempos e, assim, avaliar o processo de pré-tratamento do bagaço com o LIP 2HEAA (Tabela 3.2). Os fatores escolhidos para o planejamento foram baseados nos resultados de Rocha (2016) e o intervalo de temperatura foi escolhido com o intuito de não causar degradação do LIP. A carga de sólidos e porcentagem de água no pré-tratamento foram mantidas fixas em 10% e 15% (m/m), respectivamente.

Tabela 3.2 - Planejamento Fatorial.

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
Tempo (min)	40	100	160
Temperatura (°C)	120	135	150

Após o planejamento experimental, um estudo cinético foi realizado com a melhor temperatura obtida no planejamento experimental. Este estudo cinético teve o intuito de avaliar melhor a influência do tempo de pré-tratamento na conversão em glicose após a etapa de hidrólise enzimática. Os tempos de pré-tratamento considerados foram de 2, 4, 6 e 8 h. Esses ensaios foram realizados para se determinar o menor tempo de pré-tratamento necessário para maximizar a recuperação de açúcares durante a etapa de hidrólise enzimática para o 2HEAA.

A triagem dos demais LIPs foi realizada em pequena escala e os resultados avaliados de acordo com a concentração de glicose obtida na etapa de

hidrólise enzimática. As condições de temperatura dos pré-tratamentos são baseadas nas análises de TG, mantendo-se a temperatura o mais alto possível sem que haja degradação do LIP e do bagaço.

A partir de testes iniciais os tempos de pré-tratamento para a triagem foram determinados, os LIPs sintetizados com ácido acético foram realizados em 1, 2 e 3 h de pré-tratamento e para os sintetizados com ácido sulfúrico os tempos foram de 15, 30 e 45 minutos. O ácido sulfúrico é considerado um ácido forte e resulta em um LIP muito agressivo no pré-tratamento, portanto são utilizados tempos menores quando comparados com os demais pré-tratamentos.

Os ensaios de pré-tratamento foram realizados em reatores de aço inox, com capacidade de 500 mL e sem agitação, imersos em banho termostático (Marconi, MA 159/BB) utilizando glicerina como fluido térmico.

As quantidades utilizadas nos pré-tratamentos foram de 10% de bagaço (m/m) em base seca (teor de umidade no Apêndice B) e LIP:H₂O (5:1 m/m). Antes de o reator ser alimentado e submerso no banho termostático, o bagaço foi previamente homogeneizado com o LI e a água. Embora o trabalho de Rocha (2016) tenha proposto o uso de LIP isento de água, a adição de água está sendo avaliada neste trabalho porque diminui a viscosidade, facilitando assim a agitação. Além disso, foi observado na literatura por Brandt *et al.* (2011), Verdía *et al.* (2014) e George *et al.* (2015) que a presença da água no LI, até uma certa concentração, não prejudica o processo de pré-tratamento, melhora os resultados e diminui a viscosidade e a quantidade de LI utilizado na etapa

Decorrido o tempo de reação proposto, os reatores foram retirados do banho de glicerina e submergidos em um banho de gelo para interromper a reação. Após o resfriamento, os reatores foram abertos e foi adicionada água destilada no bagaço pré-tratado até sua submersão para a dissolução do LIP. Posteriormente, a biomassa foi prensada manualmente para retirada do licor de pré-tratamento (Figura 3.4). O licor foi armazenado em frasco com tampa e refrigerado para posterior análise de insolúveis (Apêndice B). Já a fração sólida foi lavada com água, para remoção dos componentes solúveis (Figura 3.5).

Figura 3.4 - Licor resultante do pré-tratamento com 2HEAA.



Figura 3.5 - Bagaço lavado após o pré-tratamento com 2HEAA.



Depois de lavado, o bagaço pré-tratado foi dividido em duas partes. Uma delas foi seca a 105°C para análise de composição química (Apêndice B) e a outra parte foi seca a temperatura ambiente para ser utilizada posteriormente na hidrólise enzimática.

Os cálculos de rendimento do pré-tratamento estão apresentados no Apêndice D.

3.4.3 Hidrólise Enzimática

Todas as amostras obtidas dos pré-tratamentos foram submetidas à hidrólise enzimática, a fim de avaliar a influência dos LIPs na susceptibilidade do bagaço ao ataque enzimático.

A hidrólise enzimática foi realizada em um tampão citrato de 0,05 mol/L pH 4,8 (Apêndice C). Inicialmente, para realização da hidrólise foram utilizados erlenmeyers de 250 mL, nos quais foi adicionado o líquido reacional na proporção de 10% de sólidos (m/v), com a devida compensação no volume da solução tampão com relação ao percentual de água presente no bagaço pré-tratado.

A hidrólise foi realizada por 72 h para o 2HEAA, baseado em Rocha (2016), e no caso dos LIPs utilizados para triagem no tempo de 48 h e todos os dados utilizados para os cálculos ao longo do trabalho foram baseados em 48 h de hidrólise enzimática. As amostras foram mantidas em uma incubadora refrigerada com agitação orbital (Marconi, MA 832) a 50°C e 150 rpm com uma carga enzimática de 15 FPU/g de bagaço (Cellic Ctec2, Novozymes). Amostras foram coletadas para posterior análise nos tempos de 12, 24, 48 e 72 h para o 2HEAA e 12 e 48 h para os demais LIPs.

As amostras coletadas foram aquecidas em um banho termostático (Marconi – MA184) a 100°C por 15 minutos para inativação das enzimas. Após este tempo, as amostras foram resfriadas para posterior análise de composição.

A biomassa pré-tratada com 2HEAA nas condições que levaram a maior conversão de celulose em glicose na hidrólise enzimática também foi submetida a uma hidrólise enzimática nas condições já citadas acima, mas com a adição de 1,5 mg/g bagaço do coquetel enzimático Cellic Htec2 (Novozymes), para aumentar a conversão das hemiceluloses nessa etapa.

A quantificação dos açúcares obtidos na hidrólise foi determinada por cromatografia líquida (HPLC). A metodologia analítica para quantificação foi descrita no Apêndice B e a determinação da atividade enzimática da enzima Cellic Ctec 2 (163,81 FPU/mL) e da proteína total da Cellic Htec2 (135,80 mg/mL) foram descritas no Apêndice C.

Os resultados da aplicação do LIP 2HEAA foram demonstrados em conversão de celulose em glicose e para a triagem dos demais LIPs foram utilizados cálculos baseados no rendimento global da hidrólise. Não foi realizado o cálculo de conversão dos LIPs da triagem pelos ensaios serem feitos em pequena escala e isso, não gera amostra suficiente para a etapa de caracterização do bagaço após o pré-tratamento. No Apêndice D são descritas as equações para os cálculos de conversão e rendimento.

CAPÍTULO 4

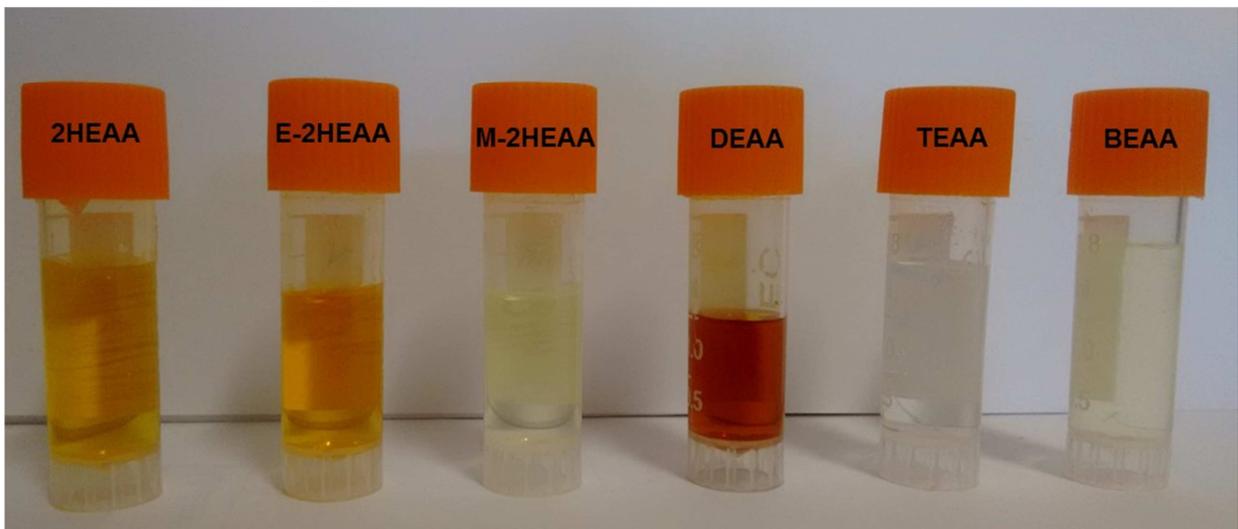
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados de síntese dos LIPs, composição química do bagaço *in natura* e resultados obtidos após os pré-tratamentos. Além disso, será discutido o efeito dos LIPs na hidrólise enzimática.

4.1. SÍNTESE E ANÁLISE DOS LIPs.

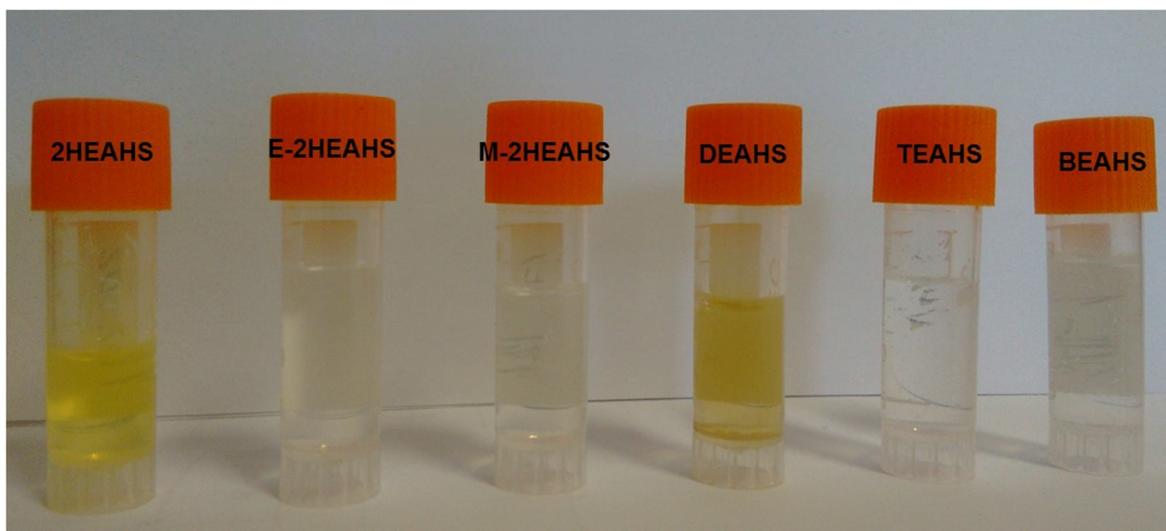
Após a síntese dos LIPs foi observada uma coloração amarelo/alaranjado para os LIPs 2HEAA e E-2HEAA, e transparentes para M-2HEAA, TEAA e BEAA. O LIP DEAA apresentou uma coloração mais escura, em razão da dietilamina. Na Figura 4.1 são apresentados os LIPs sintetizados com ácido acético.

Figura 4.1 – LIPs a partir de ácido acético.



Já nos LIPs a partir de ácido sulfúrico só foi observada a coloração amarelo/alaranjada no 2HEAHS e DEAHS. Os demais se apresentaram incolores (Figura 4.2).

Figura 4.2 - LIPs a partir de ácido sulfúrico.



Na Tabela 4.1 são apresentadas as propriedades físico-químicas dos LIPs sintetizados. O peso molecular foi calculado mediante massa molar, sendo a densidade e pH determinados na temperatura de 25°C.

Tabela 4.1 - Propriedades físico-químicas dos LIPs.

LIPs a partir do ácido acético				
	Peso Molecular (g/mol)	Densidade (g/cm ³)	Viscosidade a 40°C (mPa.s)	pH
2HEAA	121,13	1,1523±0,0001	462,78±0,35	8,80
M-2HEAA	135,02	1,0959±0,0002	292,29±039	8,06
E-2HEAA	149,03	1,0660±0,0001	306,20±0,59	8,31
DEAA*	133,11	1,0214±0,0002	16,61±0,35	8,54
TEAA	161,13	1,0311±0,0001	42,12±0,82	6,72
BEAA	133,04	0,9536±0,0001	261,48±0,02	7,90
LIPs a partir do ácido sulfúrico				
	Peso Molecular (g/mol)	Densidade (g/cm ³)	Viscosidade a 40°C (mPa.s)	pH
2HEAHS	199,09	1,1428±0,0001	235,45±0,63	< 2,0
M-2HEAHS	173,08	1,1678±0,0002	923,40±0,21	< 2,0
E-2HEAHS	187,09	1,1449±0,0001	158,14±0,85	< 2,0
DEAHS*	171,06	1,1100±0,0001	34,88±1,10	< 2,0
TEAHS	199,09	1,1923±0,0001	124,86±0,51	< 2,0
BEAHS	171,01	1,1610±0,0001	364,48±0,55	< 2,0

*Realizado a 50°C.

Os LIs sintetizados com ácido acético apresentaram valores de pH variando dentro da faixa de 8,0 a 9,4, ou seja, uma solução final alcalina. Já para os sintetizados com ácido sulfúrico, o pH é menor que 2,0, pois esses LIPs possuem em sua estrutura final dois prótons disponíveis, o que resulta em características ácidas. A partir da força do ácido e da base que atuam na reação de neutralização no momento da síntese, é possível saber o pH da solução final e confirmar o tipo de solvente formado.

A análise do arranjo da estrutura e formação do sal de amônio foi posteriormente confirmada a partir da análise dos espectros de RMN ^{13}C e ^1H (Figura 4.3, Figura 4.4, Figura 4.5 e Figura 4.6).

Os sinais fazem referência à disposição dos átomos de hidrogênio e carbono na estrutura de cada LI.

Figura 4.3 - RMN ^{13}C de LIs com ácido acético (1) 2HEAA, (2) M-2HEAA, (3) E-2HEAA, (4) DEAA, (5) BEAA e (6) TEAA.

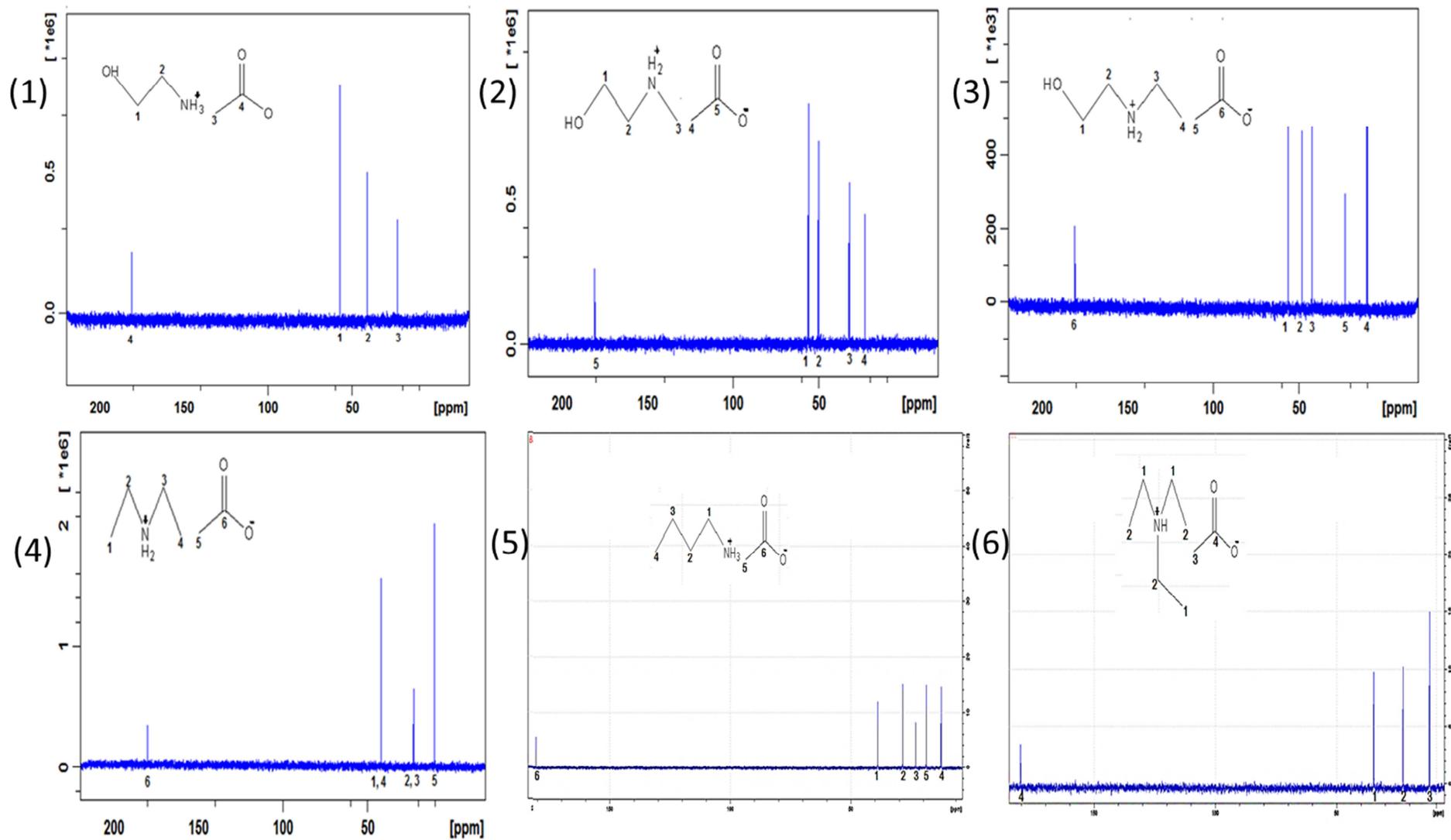


Figura 4.4 - RMN ^1H de LIs com ácido acético (1) 2HEAA, (2) M-2HEAA, (3) E-2HEAA, (4) DEAA, (5) BEAA e (6) TEAA.

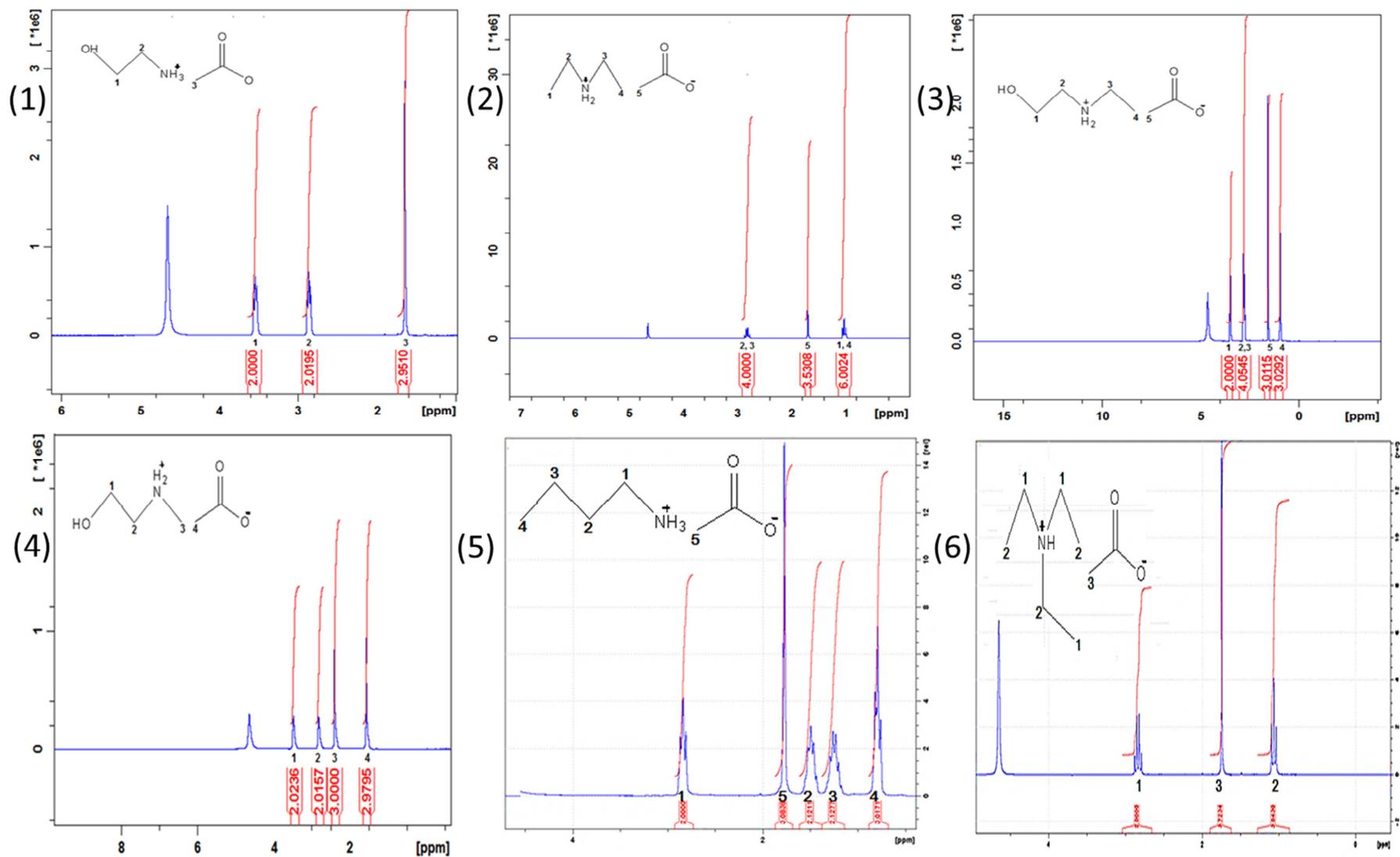


Figura 4.5 - RMN ^{13}C de LIs com ácido sulfúrico (1) 2HEAHS, (2) M-2HEAHS, (3) E-2HEAHS, (4) DEAHS, (5) BEAHS e (6) TEAHS.

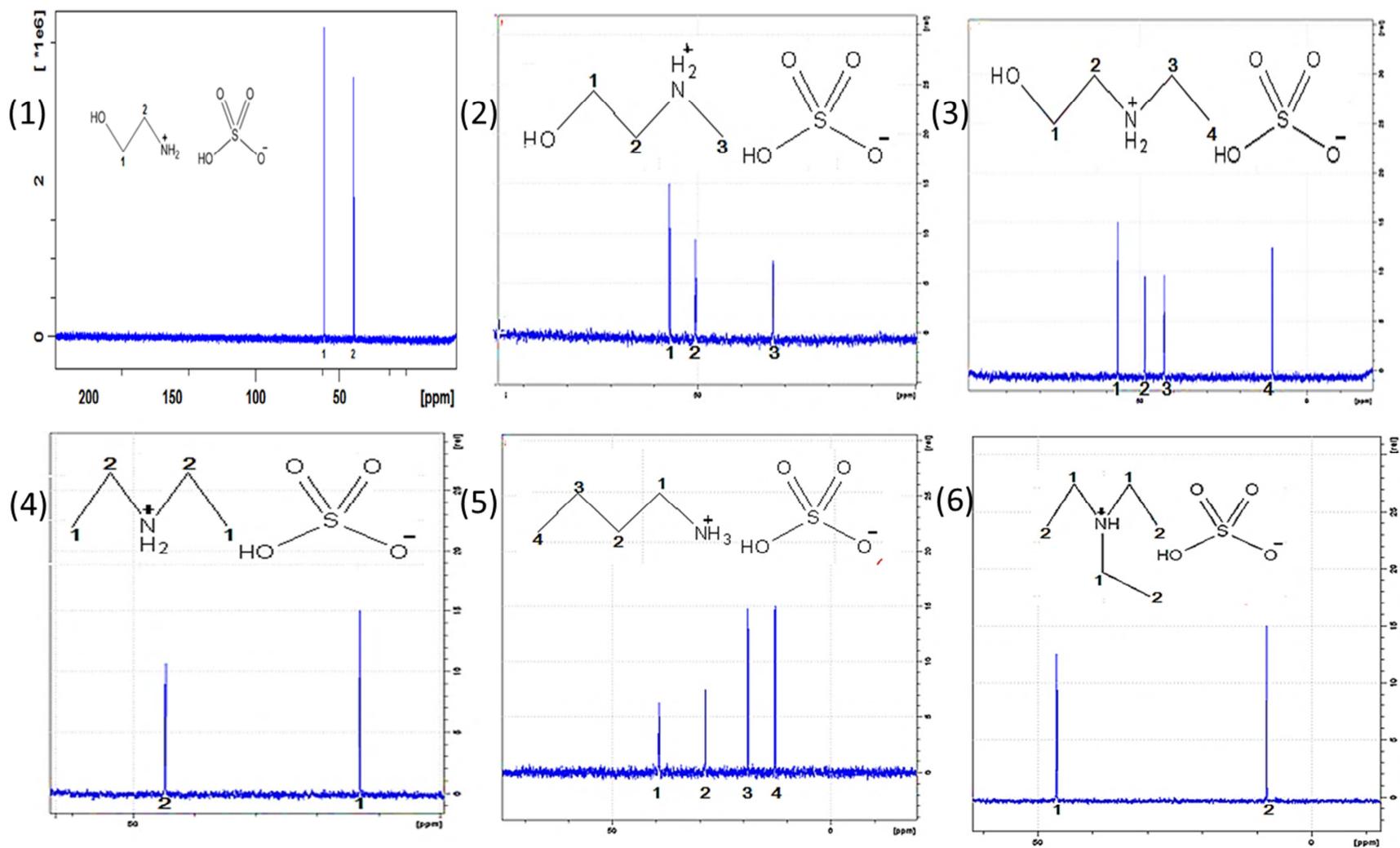
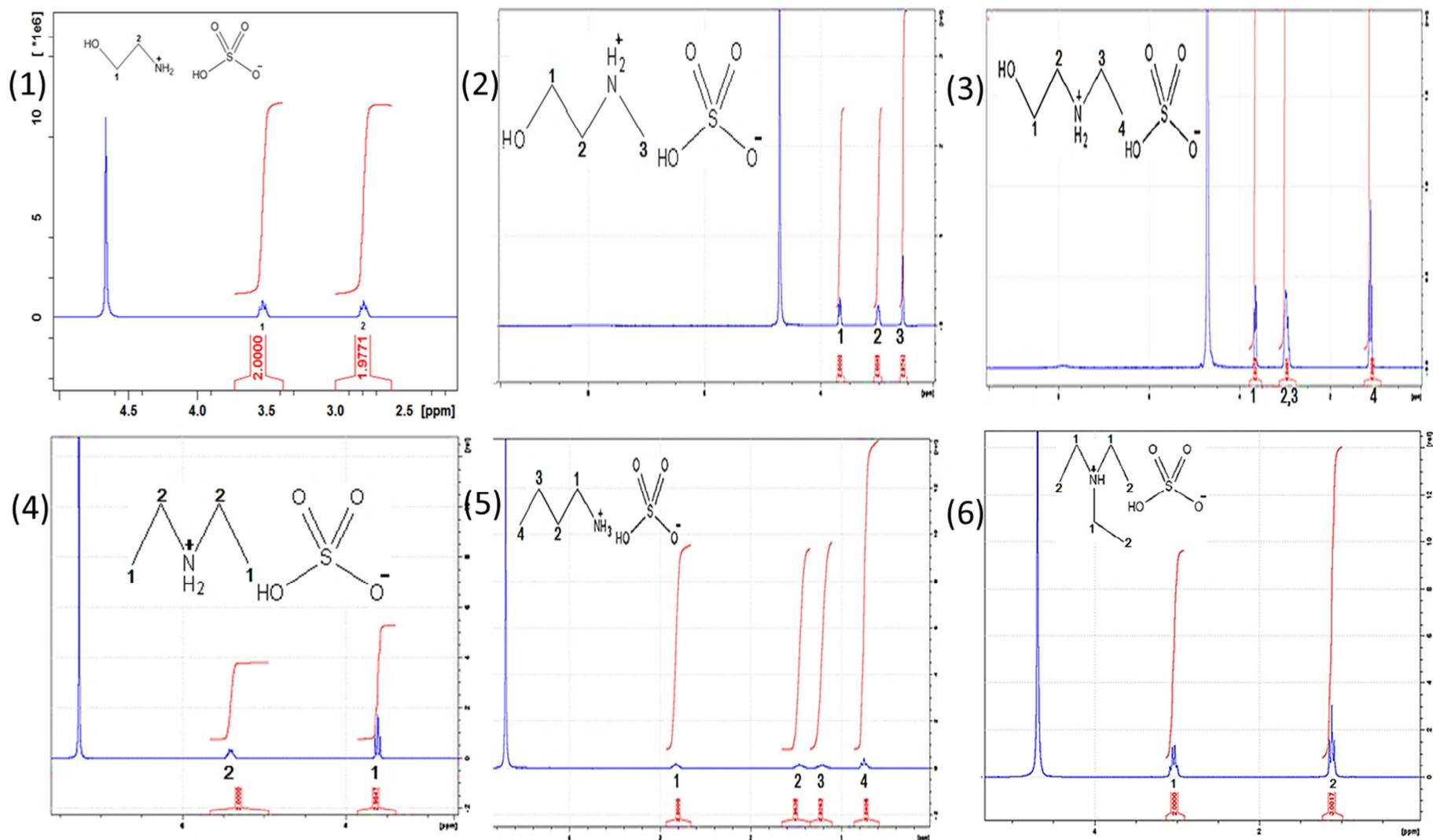


Figura 4.6 - RMN ^1H de LIs com ácido sulfúrico (1) 2HEAHS, (2) M-2HEAHS, (3) E-2HEAHS, (4) DEAHS, (5) BEAHS e (6) TEAHS.



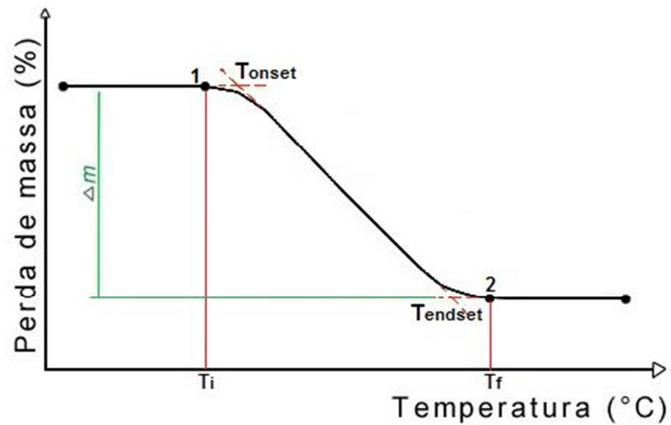
Os espectros obtidos comprovaram a eficiência das reações de neutralização ácido-base. As estruturas identificadas foram condizentes com os produtos esperados das reações de neutralização oriundas das misturas entre o $[\text{CH}_3\text{COO}]^-$ ou $[\text{HSO}_4]^-$ com as bases de amina.

O sinal encontrado a 4,8 ppm, identificado nos espectros de hidrogênio, representa a estrutura de água. Essa água corresponde ao solvente utilizado (água deuterada) para a análise, não sendo identificado nenhum outro pico correspondente à água, o que confirma os baixos teores da mesma ($< 1\%$) nos LIPs a partir do $[\text{CH}_3\text{COO}]^-$. Entretanto, no momento da síntese dos LIPs com $[\text{HSO}_4]^-$ é adicionado ácido sulfúrico diluído, sendo que parte dessa água se encontra no produto final. Por se utilizar 15% de água na etapa de pré-tratamento, o LIP foi inserido em um rotaevaporador para chegar a concentração de água de aproximadamente 15%, o que corresponde um aumento do sinal no RMN.

Uma vez comprovado que o LIP obtido realmente refere-se ao produto esperado da reação de síntese proposta, foram realizados os ensaios térmicos para determinação da temperatura de degradação e, assim, estabelecer as condições limitantes do pré-tratamento mediante a identificação dos eventos endotérmicos atribuídos ao material.

As análises foram baseadas nas interpretações das curvas de TG (termogravimétrica) e DTG (derivada termogravimétrica), a partir dos estudos de Luo *et al.* (2008), Ferreira *et al.* (2012), Oliveira, (2013), Wang *et al.* (2014), Lv *et al.* (2015), e Financie *et al.* (2016). Essa análise determina a temperatura *onset* (T_{onset}), encontrada pelo início da perda de massa, e que corresponde ao valor teórico da temperatura de extrapolação do evento. A Figura 4.7 representa uma curva padrão de TG. O comportamento desta curva foi usado como referência para a interpretação dos resultados obtidos a partir das análises termogravimétricas realizadas nos LIPs.

Figura 4.7 - Curva padrão de TG.



Onde:

T_i , corresponde à temperatura inicial do evento;

T_{onset} , início extrapolado da degradação;

T_{endset} , final extrapolado da degradação;

T_f , corresponde à temperatura final do evento;

Δ_m , variação de massa entre os pontos 1 e 2.

Nas curvas de TG obtidas foi realizada uma correlação junto com sua derivada (DTG), conforme é possível verificar nas Figura 4.8 e Figura 4.9. Foram identificadas as mudanças de temperatura de decomposição envolvidas nas reações químicas durante o ensaio, permitindo a sua avaliação. Além disso, a perda de massa relacionada com o evento foi expressa em termos percentuais.

Figura 4.8 – TG dos PLIs com ácido acético. (1) 2HEAA, (2) M-2HEAA, (3) E-2HEAA, (4) DEAA, (5) BEAA, (6) TEAA.

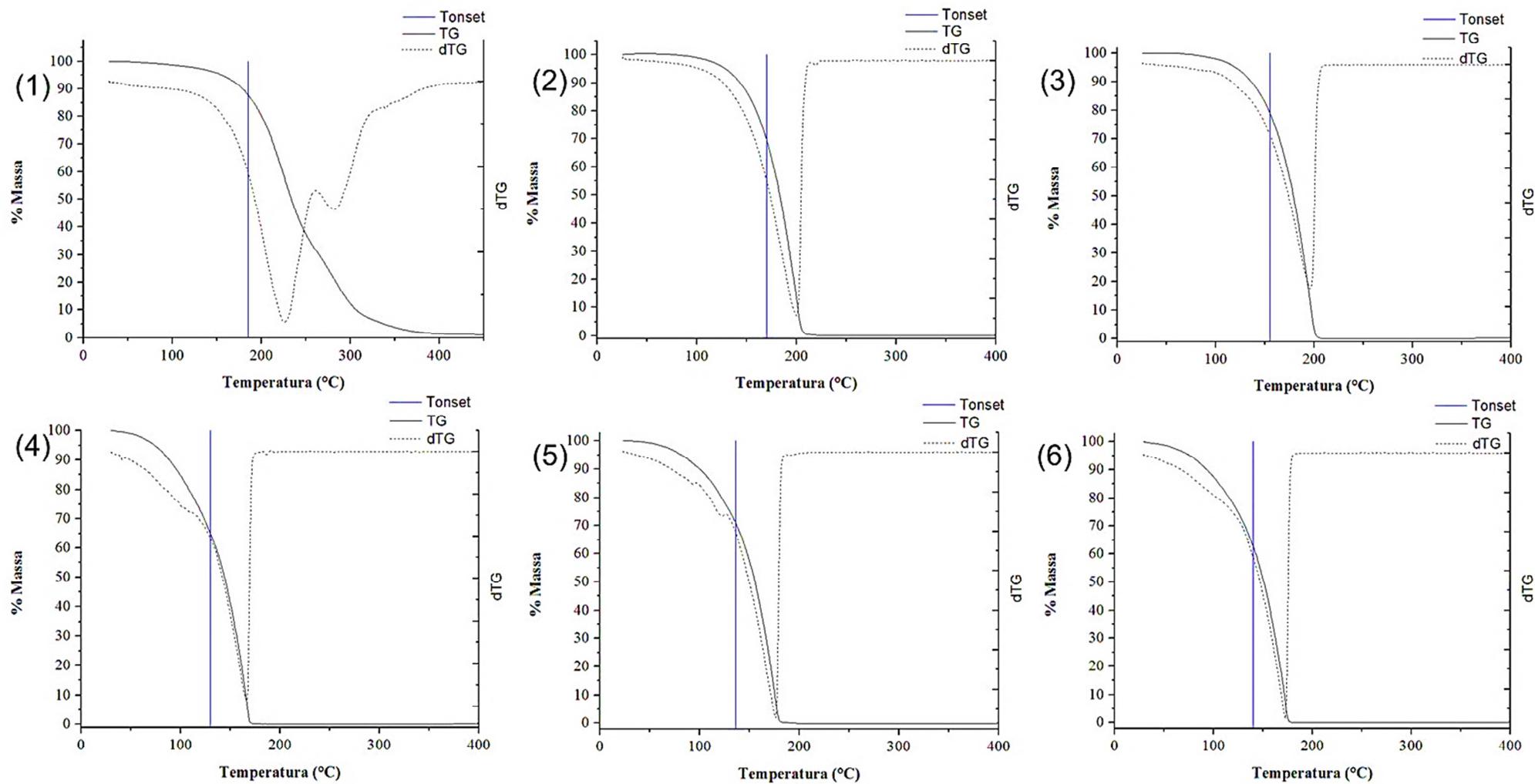
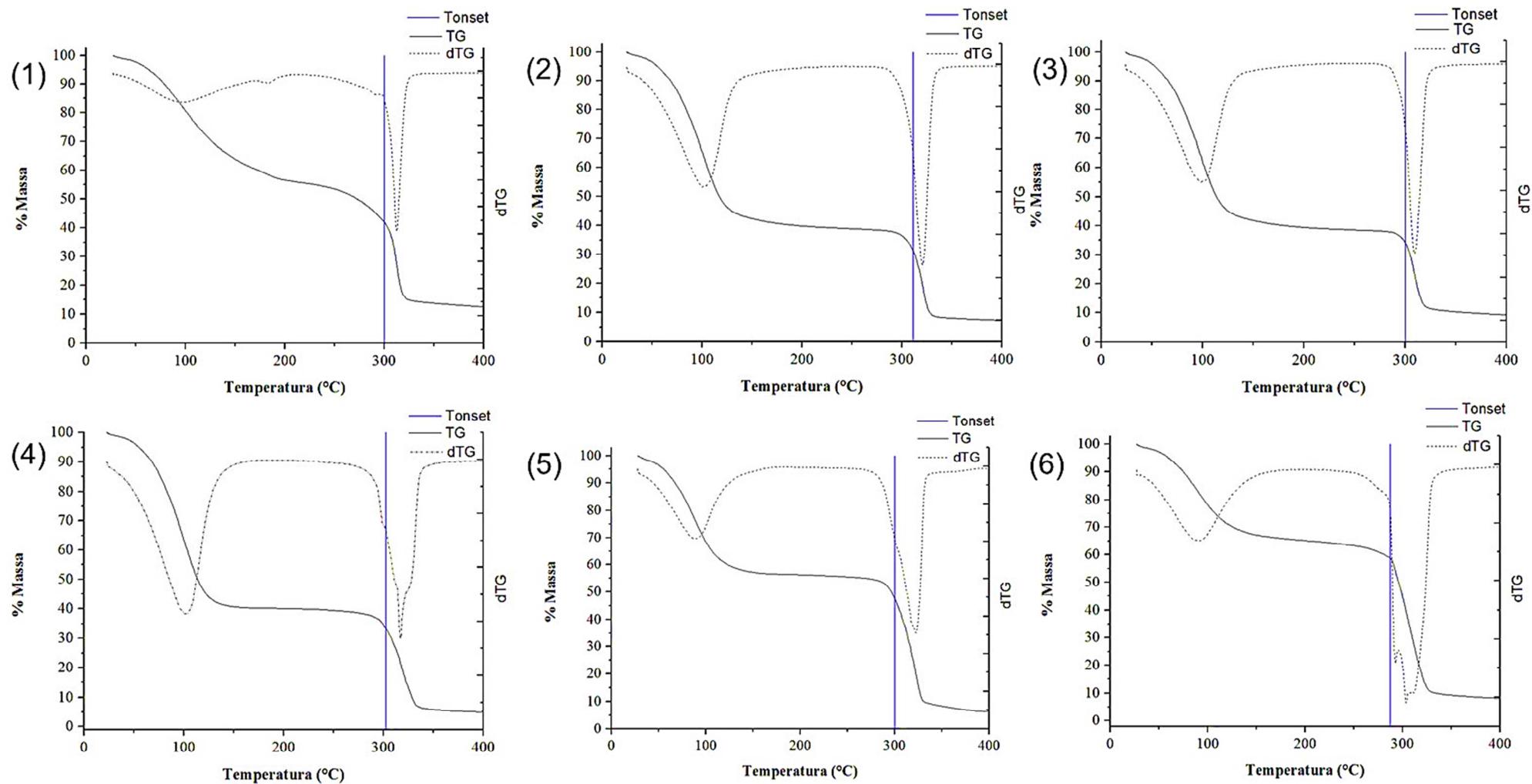


Figura 4.9 - TG dos LIPs com ácido sulfúrico. (1) 2HEAHS, (2) M-2HEAHS, (3) E-2HEAHS, (4) DEAHS, (5) BEAHS, (6) TEAHS.



É possível observar que até 105°C há variações da curva com relação ao eixo e estas são relacionadas à desidratação do material. Para os LIPs com $[\text{HSO}_4^-]$ essa temperatura vai próxima a 150°C. A partir dessas temperaturas já é possível observar pela correlação com a DTG um evento endotérmico com um pico, que é atribuído à perda de massa da amostra. Essa área é limitada pelas T_{onset} e T_{endset} .

A partir das T_{onset} obtidas, considerou-se uma temperatura de pré-tratamento de 10°C abaixo da temperatura obtida para os LIPs M-2HEAA, E-2HEAA, DEAA, BEAA e TEAA.

O 2HEAHS, M-2HEAHS, E-2HEAHS, DEAHS, TEAHS e BEAHS apresentam uma T_{onset} de aproximante 300°C, esta não se adapta às limitações operacionais do equipamento. Neste caso, foi escolhida uma temperatura de pré-tratamento baseado em George *et al.* (2015).

Alguns pré-tratamentos testes foram realizados a temperaturas maiores com esses LIPs, mas a biomassa era totalmente carbonizada, isso possivelmente se dava pela estrutura final desses LIPs possuírem dois prótons disponíveis, cujo LIP deixa o pré-tratamento agressivo ao bagaço.

A análise do TG para o 2HEAA gerou uma temperatura de degradação de 185°C e Rocha (2016) utilizou o mesmo LIP para pré-tratar bagaço de cana por 3,5 h a uma temperatura de 150°C, onde alcançou um rendimento global de glicose de $68,5\% \pm 1,5$. Com o intuito de avaliar qual a melhor temperatura para o presente trabalho, foram realizados pré-tratamentos para as temperaturas de 150°C e 175°C (considerando 10°C de margem de segurança) por 2 h, que alcançaram rendimentos globais de glicose de $80,5\% \pm 2,2$ e $65,6\% \pm 1,25$, respectivamente.

Os rendimentos globais de glicose não apresentam um aumento de rendimento que justifique um aumento da temperatura. Além disso, deve ser levado em consideração que um aumento de temperatura pode incidir em uma maior degradação do 2HEAA e de carboidratos oriundos da biomassa para o licor de pré-tratamento, que é rico em LIP. Essa perda de carboidratos para o licor é uma limitação do processo, pois não há informações de como reaproveita-las até o momento.

Na Tabela 4.2 são apresentadas as temperaturas máximas consideradas para o pré-tratamento.

Tabela 4.2 - Temperaturas consideradas no pré-tratamento.

LIP	T _{onset} (°C)	T _{pré-tratamento} (°C)
2HEAA	185	150
M-2HEAA	170	160
E-2HEAA	155	145
DEAA	130	120
TEAA	140	130
BEAA	135	125
2HEAHS	300	120
M-2HEAHS	310	120
E-2HEAHS	300	120
DEAHS	302	120
TEAHS	287	120
BEAHS	300	120

4.2. PRÉ-TRATAMENTO E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA UTILIZANDO LIPs

4.2.1. Efeitos do pré-tratamento com 2HEAA na hidrólise enzimática do bagaço

Um fatorial 3² completo com três repetições no ponto central foi realizado durante o pré-tratamento com o LIP 2HEAA. O objetivo foi avaliar a influência das condições operacionais de pré-tratamento, tempo e temperatura, na solubilização da celulose, hemiceluloses e lignina.

Na Tabela 4.3 são apresentados os resultados da composição química do bagaço *in natura* utilizado e a composições dos materiais pré-tratados oriundos do planejamento experimental para o bagaço após o pré-tratamento com o LIP 2HEAA, além dos rendimentos do pré-tratamento.

Tabela 4.3 – Composição do bagaço *in natura* e após o pré-tratamento com 2HEAA.

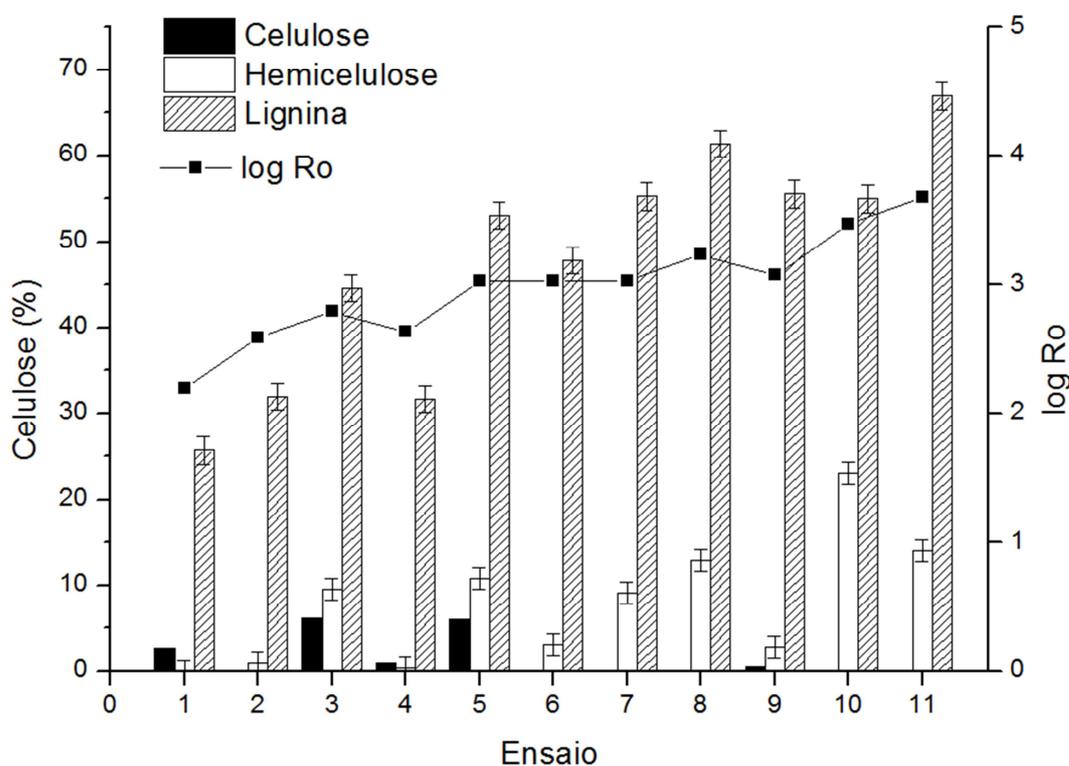
	CONDIÇÕES				PRÉ-TRATAMENTO					
	Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Rendimento (%)	Composição (%)					
					Celulose	Hemiceluloses	Lignina	Cinzas	Grupo Acetil	Extrativos
<i>In natura</i>	-	-	-	-	39,57±0,31	26,17±0,05	23,37±0,25	6,71±0,08	-	5,33±0,2
2HEAA	1	120	40	85.03	44,16±0,90	31,29±1,51	20,42±1,33	0,37±0,06	5,39±0,39	-
	2		100	79.86	49,18±0,18	32,46±0,11	19,92±0,15	0,64±0,02	0,79±0,09	-
	3		160	75.50	47,96±2,05	31,37±1,00	17,15±0,03	0,95±0,09	0,22±0,10	-
	4	135	40	80.20	47,64±0,97	32,51±0,57	19,92±1,40	0,97±0,01	0,95±0,05	-
	5		100	73.94	49,02±0,72	31,55±0,71	14,85±0,08	1,32±0,10	0,72±0,18	-
	6		100	76.52	54,83±0,11	33,17±0,18	15,92±0,56	1,37±0,06	1,79±0,08	-
	7		100	73.74	57,21±0,09	32,27±0,59	14,18±0,70	1,31±0,08	0,77±0,04	-
	8		160	68.53	57,72±0,14	33,24±0,96	13,17±0,63	1,34±0,06	0,24±0,08	-
	9	150	40	76.64	50,07±1,90	33,20±0,57	13,55±0,39	0,97±0,01	2,47±0,08	-
	10		100	71.34	55,29±0,41	28,22±0,35	14,75±0,40	1,95±0,21	0,91±0,04	-
	11		160	70.00	55,00±1,37	32,11±1,96	11,03±1,33	0,52±0,09	0,35±0,03	-

A composição química do bagaço *in natura* está de acordo com resultados já reportados em literatura por Hemmasi *et al.* (2011) e Asakawa *et al.* (2015). No geral a composição dos principais componentes do bagaço *in natura* varia pouco entre uma safra e outra, o que não difere significativamente nos resultados (ROCHA *et al.* 2015).

Na composição do bagaço após pré-tratamento de 160 min a 150°C foi observado um aumento de composição de celulose de cerca de 39% e hemiceluloses de 12%, enquanto a lignina teve uma redução no seu teor de 63% em comparação ao bagaço *in natura*.

Os valores de solubilização dos componentes após o pré-tratamento são apresentados na Figura 4.10, assim como o fator de severidade do pré-tratamento. Os ensaios 5, 6 e 7 são pontos centrais do planejamento experimental.

Figura 4.10 - Solubilização dos componentes no pré-tratamento com 2HEEA.



Legenda: log R₀ - Fator de severidade (YOON *et al.*, 2012)

$\log R_0 = \log \left(t \times \exp \left(\frac{T-100}{14,75} \right) \right)$, sendo t = tempo (min); T = temperatura (°C); 14,75 = Valor empírico

Ensaio 1 – 120°C; 40min, 2 – 120°C; 100min, 3 – 120°C; 160min, 4 - 135°C; 40min, 5 - 135°C; 100min, 6 - 135°C; 100min, 7 - 135°C; 100min, 8 - 135°C; 160min, 9 - 150°C; 40min, 10 - 150°C; 100min, 11 – 150°C; 160min.

De acordo com a Figura 4.10 o LIP 2HEAA não causa solubilização significativa da celulose (exceto 3 e 5, cujos valores de solubilização de celulose são possivelmente gerados a partir de erros analíticos). A média de dissolução de celulose em todos os ensaios é aproximadamente 1,5%. Este é um resultado altamente desejável, pois a celulose torna-se disponível para a hidrólise enzimática. SWATLOSKI *et al.* (2002) afirmaram que alguns LI, principalmente os próticos possivelmente não dissolvem a celulose, mas só modificam sua estrutura cristalina para um efetivo ataque enzimático, diferente dos muitos LIAPs que dissolvem a celulose no pré-tratamento.

As hemiceluloses e a lignina variaram sua solubilização conforme a severidade do pré-tratamento em relação ao tempo e a temperatura. As hemiceluloses tiveram uma baixa solubilidade para o licor, uma média de 7,8%, considerada favorável, pois a recuperação das frações solubilizadas de celulose e hemiceluloses do licor com LIP ainda necessita de estudos para sua viabilização.

As maiores solubilizações de hemiceluloses foram encontradas nos pré-tratamentos mais severos, com 100 e 160 minutos a 150°C (ensaios 10 e 11) com aproximadamente 23% e 14% de solubilização, respectivamente.

A lignina é mais sensível aos parâmetros do pré-tratamento e foi parcialmente solubilizada para o licor com o aumento da temperatura e do tempo. A elevação na temperatura com o tempo máximo do planejamento coincide com a maior solubilização, ensaio 11, no qual se alcançou quase 67% de remoção de lignina. Uma hipótese efetiva de mecanismo de interação entre lignina e LI é que os cátions dos LIs interagem com a lignina através de ligações de hidrogênio, onde parte da lignina possivelmente é solubilizada para o licor de pré-tratamento com o aumento da severidade do mesmo.

Na literatura são encontrados pré-tratamentos considerados bons e que solubilizam grande parte das hemiceluloses e mantem a lignina e a celulose para a hidrólise enzimática. Essa atuação é considerada diferente do pré-tratamento com 2HEAA que mantem a celulose e as hemiceluloses, sendo visto como vantajoso para a etapa subsequente. Martins *et al.* (2015) estudaram o pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído (1% (m/v) a 121°C por 150 minutos), um dos pré-tratamentos considerados bons por trabalhos da literatura, mas tem a capacidade de remover

parte das hemiceluloses para a fase líquida. Os autores alcançaram uma solubilização do bagaço de 12,5% de celulose, 81,3% de hemiceluloses e 17,3% de lignina no bagaço.

Em comparação o pré-tratamento com 2HEAA foi mais seletivo, apresentou uma interação mais efetiva, solubilizando pequenas quantidades de celulose e das hemiceluloses disponíveis para a hidrólise e solubilizando altas porcentagens de lignina, quando comparado ao ácido diluído. A solubilização de lignina para o licor gera um aumento na eficiência de conversão enzimática da biomassa, devido a um mais fácil acesso às enzimas para os carboidratos.

Outros autores que trabalharam com LIs, como Wu et al. (2011) pre-trataram resíduos de milho com LIAP [C₂min][OAc] a 125°C por 1 h e alcançou remoção de lignina de até 44% e também Hou et al. (2013) pré-tratou bagaço por 6 h a 90°C com Lisinato de colínio e água (80% LI m/m) e os autores alcançaram 45% de solubilização de lignina

Rocha (2016) que trabalhou com 2HEAA para o pré-tratamento de bagaço e alcançou solubilizações de lignina de 68%, semelhante ao ensaio 11 que apresentou 67%. Já para celulose e hemiceluloses as porcentagens de solubilização de Rocha (2016) foram maiores, aproximadamente 60% e 55%, respectivamente em condições de pré-tratamento de 3,5 h a 150°C com condições anidras. O fator tempo foi determinante para diminuir as perdas de carboidratos para o licor de pré-tratamento.

Muitos autores relatam que o pré-tratamento com LIs solubilizam totalmente a biomassa (D'Andola *et al.*, 2008, Brandt *et al.*, 2011, Meenatchi *et al.*, 2016). Neste trabalho, não foi observada essa solubilização com o 2HEAA. A biomassa é visível no pré-tratamento (Figura 4.11).

Figura 4.11 - Bagaço após pré-tratamento com 2HEAA.



Além disso, é possível observar a lignina insolúvel que foi removida para o licor após o pré-tratamento. Para isso, foi necessária a adição de um co-solvente (água) e conseqüentemente sua regeneração no licor de pré-tratamento (Figura 4.12).

Figura 4.12 - Lignina repolimerizada do licor de pré-tratamento com 2HEAA.



A lignina é solubilizada durante o pré-tratamento de acordo com o aumento da severidade. Ao final do processo e com a adição de água (antisolvente) a lignina que possui massa molecular média alta precipita.

A partir do planejamento desenvolvido para o 2HEAA, os ensaios nos quais são encontradas as maiores quantidades de lignina precipitada (recuperada)

são os que possuem maior tempo (160 min), onde foi precipitada uma média de 4 g lignina/100 g de bagaço *in natura*.

Com o aumento da severidade do processo, a lignina que possui uma massa molecular média menor e está ligada às cadeias de hemiceluloses, pode ser levada a solubilização para a fase líquida também com a combinação de temperatura e tempo (WYMAN *et al.*, 2005, TRAJANO *et al.*, 2013).

O pré-tratamento com 2HEAA favorece as ligações de substituição da lignina induzindo a sua solubilização no processo. Em contrapartida, o LIP consegue manter a celulose e parte das hemiceluloses no material após pré-tratamento.

Após o pré-tratamento, os materiais gerados foram hidrolisados enzimaticamente para avaliar a conversão de celulose e hemiceluloses após pré-tratamento. Os cálculos de conversão foram realizados após 48 h de hidrólise e são apresentados na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 - Resultados de hidrólise enzimática do planejamento experimental com 2HEAA.

CONDIÇÕES				HIDRÓLISE ENZIMÁTICA			
	Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Composição (g/L)		Conversão (%)	
				Glicose	Xilose	Celulose	Hemiceluloses
<i>In natura</i>	-	-	-	3,43±0,1	-	15,77±0,46	-
2HEAA	1	120	40	12,20	5,51	24,87	15,50
	2		100	25,14	10,14	46,01	27,49
	3		160	31,99	13,64	60,04	38,27
	4	135	40	21,45	9,54	40,53	25,83
	5		100	38,0	16,34	69,78	45,58
	6		100	38,43	12,21	63,07	32,40
	7		100	36,45	13,79	57,34	37,60
	8		160	40,48	17,02	63,12	45,06
	9	150	40	36,36	14,42	65,35	38,23
	10		100	43,66	12,99	71,07	40,51
	11		160	43,99	16,58	71,99	45,43

Legenda: O desvio padrão está baseado na triplicata do ponto central (ensaio 5, 6 e 7). Para composição (g/L): $\pm 0,30$ e conversão (%): $\pm 4,05$

A partir dos resultados de conversão da celulose em glicose obtidos foi possível observar que o pré-tratamento com o 2HEAA, em diferentes tempos, resultou em melhorias na hidrólise enzimática quando comparado ao bagaço *in natura*. Isto é, houve um aumento nas conversões de acordo com o aumento da severidade do pré-tratamento.

A conversão de hemiceluloses foi menor do que a de celulose, no máximo em torno de 40-45% (ensaios 5, 8, 10 e 11), mesmo com pouca solubilização de hemiceluloses para o licor, já observado anteriormente, que faz o material pré-tratado ser rico em hemiceluloses. Isto pode ser explicado pelo coquetel enzimático utilizado ter pouca concentração de hemicelulases.

Os ensaios 10 e 11 apresentaram as maiores conversões de celulose, em torno de 72%. Ambos os ensaios foram realizados a 150°C com tempo de pré-tratamento de 100 e 160 minutos. Estes ensaios correspondem a uma conversão de glicose 4,5 vezes superior ao obtido na hidrólise do bagaço *in natura*.

Raj *et al.* (2016) propuseram uma hipótese de como seria a interação de LI com a celulose, onde o LI interage com a estrutura da celulose gerando uma modificação da celulose I para II. As ligações inter e intra cadeia se reorganizam de forma que uma estrutura mais aberta é obtida, impactando em uma menor cristalinidade e área superficial maior. Isto gera resultados mais eficientes de conversão da celulose durante a etapa de hidrólise enzimática.

O 2HEAA se mostrou eficiente quanto à preservação das fibras de celulose na biomassa, atuando, provavelmente na diminuição da sua cristalinidade e deixando o material mais vulnerável ao ataque enzimático.

Raj *et al.* (2016) utilizaram [C₂mim][OAc] (Acetato de 1-Etil-3-metilimidazólio) para pré-tratar a mistura de *Brassica juncea* e *Triticumaestivum*. Os autores alcançaram uma conversão de celulose de 97,7% nas condições de 10% de sólidos (m/m) e 10 FPU/g de biomassa. Silva *et al.* (2013) também estudaram [C₂min][OAc] para pré-tratar bagaço (20:1 m/m) e após 48 h de hidrólise enzimática, utilizando 2,5% de sólidos, foi obtida uma conversão de celulose em glicose de 98,2% e hemicelulose em xilose de 60,7%.

O LI utilizado pelos autores, diferente do 2HEAA, é aprótico e apresenta muitos resultados de literatura referentes à dissolução de biomassas lignocelulósicas. Embora alcance altas conversões quando comparados aos outros pré-tratamentos, este LI aprótico é considerado de alto custo e inviável para o processo etanol 2G. Apesar do 2HEAA apresentar valores relativamente mais baixos de conversão enzimática quando comparado ao LIA estudado por Raj et al, (2016), o LIP se mostra muito promissor visto que apresenta síntese mais simples e baixo custo, além de não representarem estudos muito recentes de literatura, o que possibilita grandes avanços no seu desenvolvimento.

Rocha (2016) e Reis *et al.* (2016) são os únicos trabalhos encontrados na literatura que utilizaram o 2HEAA para pré-tratar biomassas lignocelulósicas, sendo bagaço de cana-de-açúcar (3,5 h a 150°C e 5% sólidos) e bagaço de caju (3 h a 120°C e 5% sólidos), respectivamente.

Rocha (2016) obteve conversão de celulose de 75,2% em um teor de sólidos de 5% (m/v) após 72 h de hidrólise enzimática. Reis *et al.* (2016) reportaram a obtenção de 74,8 g glicose/100 g biomassa pré-tratada em um teor de sólidos de 1% (m/v) após 96 h de hidrólise enzimática, valor que com certeza apresenta erro de cálculo, já que a biomassa pré-tratada nas condições reportadas apresentava apenas 49,29g celulose/100 g de biomassa, o que levaria a 44,77 g glicose/100 g de biomassa se a conversão fosse total.

Quando comparado ambos os resultados dos estudos ao pré-tratamento de 100 min a 150°C (Tabela 4.4) foram obtidos 71,07% de conversão de celulose e 43.66 g glicose/100 g bagaço pré-tratado usando o dobro da concentração de sólidos na hidrólise quando comparado ao trabalho de Rocha (2016).

Na literatura são encontrados alguns autores que utilizam outros tipos de LIPs para pré-tratar bagaço. Por exemplo, Asakawa *et al.* (2015) utilizaram acetato de colínio e alcançaram 98,7% de conversão de celulose na hidrólise enzimática após 72 h (1% (m/v) e Hou *et al.* (2013) obtiveram 82,1% de conversão de celulose utilizando lisinato de colínio (0,3% m/v).

Há diversos fatores que influenciam nos resultados da hidrólise enzimática, como, por exemplo, a concentrações de sólidos e a concentração de

enzima, além dos fatores de tempo e temperatura do pré-tratamento. Outra variável que vem sendo levada em consideração nos pré-tratamentos com LIs e aponta resultados considerados expressivos é a adição de água ao processo (LIP:H₂O; 5:1 m/m).

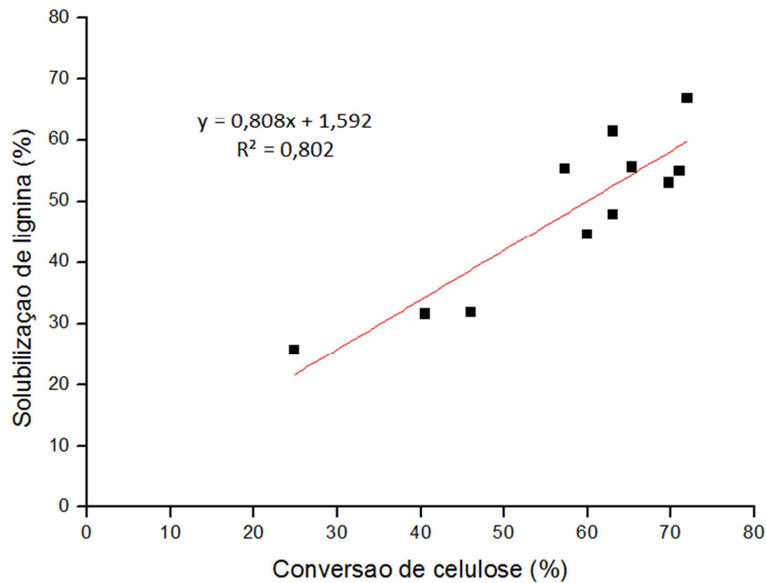
Verdia *et al.* (2014) e George *et al.* (2015) utilizaram água em seu pré-tratamento, LIP:H₂O 80:20% (v/v) e 20% (m/m LIP), respectivamente. Verdia *et al.* (2014) observaram baixos rendimentos sem a adição de água ao pré-tratamento de *Miscanthus giganteus* (24 h a 120°C e 1% sólidos) com hidrogenossulfato de 1-butimidazolio e George *et al.* (2015) afirmaram que a água não influenciou em seus resultados no pré-tratamento de *switchgrass* (180 min a 120°C e 10% sólidos) com trietilamonio. Os autores alcançaram, na hidrólise enzimática, uma conversão de celulose de 90% (1,5% sólidos m/v; 59 µl de celulase e β-glucosidase) e 45% (1% sólidos m/v; 20 mg/g de celulose de Cellic Ctec2), respectivamente.

Nos estudos mencionados anteriormente os LIs têm capacidade de dissolver cada um dos componentes principais da biomassa e podem ser também capazes de dissolver completamente a própria biomassa lignocelulósica. Em geral, a biomassa herbácea é mais facilmente dissolvida que a biomassa lenhosa (em particular madeira macia) em condições similares de processo (REDDY, 2015).

Na literatura não há muitos trabalhos na área de LIPs para o pré-tratamento de biomassa, principalmente quando focamos no bagaço. Até a finalização desse estudo só o trabalho de Reis *et al.* (2016) estava reportado na literatura utilizando o 2HEAA para dissolução de biomassa lignocelulósica, o que justifica um estudo inovador quando comparado a outros pré-tratamentos com LI e mostram resultados expressivos.

A partir da conversão de celulose em glicose, esses resultados podem estar correlacionados com a eficiência de solubilização de lignina ao longo do processo com o 2HEAA, observada na Figura 4.10.

Figura 4.13 - Relação de conversão de celulose com a solubilização da lignina para o planejamento experimental com 2HEAA.



O aumento da solubilização de lignina de certa forma corresponde ao aumento de conversão de celulose para a hidrólise enzimática (Figura 4.13). Talvez a solubilização efetiva seja maior e este valor esteja relacionado à lavagem da biomassa após pré-tratamento. A água reconhecidamente causa a precipitação da lignina e esta já solubilizada pode estar sendo redepositada sobre as fibras do bagaço pré-tratado. Em trabalhos futuros outros solventes devem ser testados na lavagem para evitar que isso aconteça.

4.2.2. Análise do planejamento experimental com 2HEAA

Para determinar a influência dos fatores tempo e temperatura foi considerado a conversão de celulose em glicose e a solubilização de lignina como respostas. Modelos de regressão são propostos e superfícies de resposta são plotadas. A análise estatística foi realizada utilizando o software Statistica (Satsoft, v.7.0) e o nível de confiança considerado foi de 90% ($p < 0,1$).

Na conversão de celulose em glicose foram significativos os fatores tempo, temperatura e suas interações. O tempo é o efeito que mais influencia na conversão.

Considerando a solubilização de lignina, os efeitos tempo e temperatura são os mais significativos. Considerando 90% de confiança a interação entre estes fatores não foi significativa ($p=0,1$). Na Tabela 4.5 é observada a análise de variância (ANOVA) para os modelos de solubilização de lignina e rendimento global de glicose depois de submetidos ao pré-tratamento com LIP 2HEAA.

Tabela 4.5 - ANOVA para o modelo de conversão de celulose em glicose e solubilização de lignina com variação de tempo e temperatura.

Váriaveis	Soma quadrática (SQ)	Grau de liberdade	Média quadrática (MQ)
Conversão de celulose em glicose			
Regressão (R)	2034,50	4	508,62
Resíduos (r)	125,86	6	20,97
Falta de ajuste (Faj)	48,27	4	12,06
Erro Puro (Ep)	77,59	2	38,79
Total	2160,36	10	-
R ²	0,94	-	-
Teste F _{4,6}	Calculado ¹		24,24
	Tabelado		3,18
Teste F _{4,2}	Calculado ²		0,31
	Tabelado		9,24
Solubilização de lignina			
Regressão (R)	1545,40	2	772,70
Resíduos (r)	211,98	8	26,50
Falta de ajuste	183,24	6	30,54
Erro Puro	28,73	2	14,37
Total	1757,38	10	-
R ²	0,88	-	-
Teste F _{2,8}	Calculado ¹		29,16
	Tabelado		3,11
Teste F _{6,2}	Calculado ²		2,12
	Tabelado		9,32

Legenda: ¹(MQ_R)/(MQ_r); ²(MQ_{Faj})/(MQ_{Ep}).

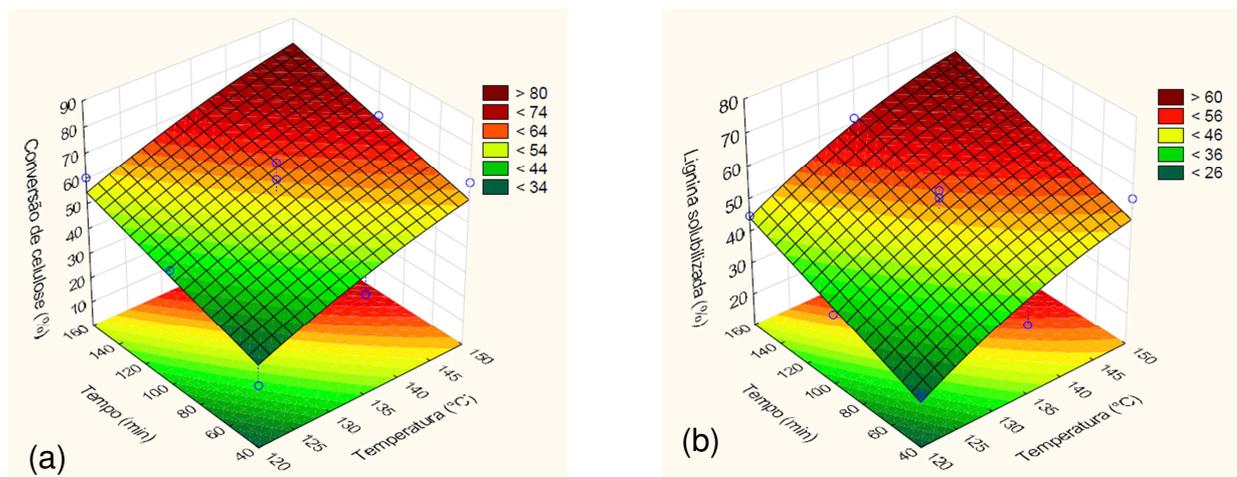
O modelo para a conversão de celulose é considerado significativo. O teste F_{4,6} (24,24) é maior que o tabelado pelo programa (3,18) e o teste F_{4,2} (0,31) é bem menor que o valor tabelado (9,24). O mesmo acontece para a solubilização de lignina, o F calculado para _{2,8} (29,16) é maior que o tabelado (3,11) e o F_{6,2} (2,12) é menor que o tabelado pelo Statistica (9,12).

Ambos os modelos são considerados significativos em uma correlação de 90% de confiança de acordo com o teste F e não apresenta evidências na falta de ajuste.

Para a resposta do rendimento global da xilose, não foi possível avaliar o modelo. Os rendimentos de xilose são baixos, por isso não houve influência significativa de nenhum dos fatores analisados, considerando o modelo não significante para 90% de confiança.

As superfícies de resposta da conversão de celulose em glicose (Figura 4.14a) e para a solubilização de lignina (Figura 4.14b), versus os parâmetros tempo e temperatura.

Figura 4.14 - Superfície de resposta para a conversão de celulose em glicose e a solubilização de lignina.



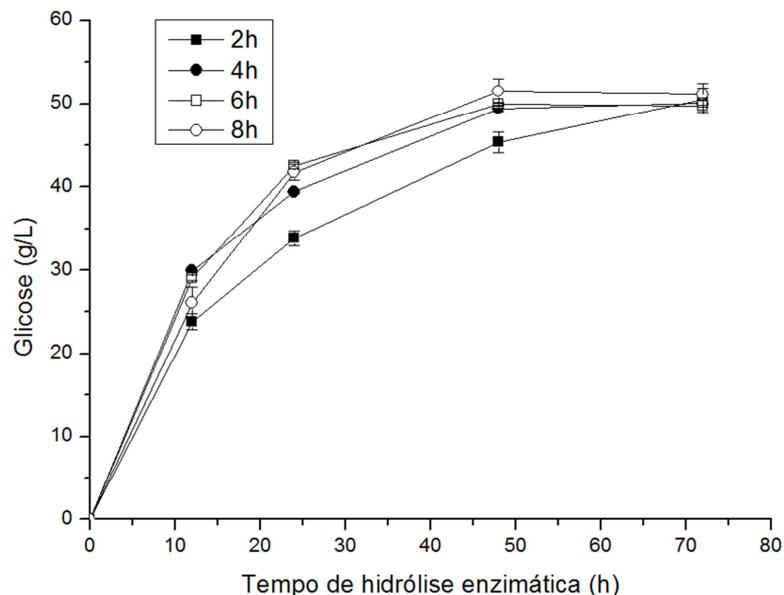
Para a conversão de celulose (Figura 4.14a) é possível descrever que o aumento do tempo influencia no rendimento e a temperatura do pré-tratamento pode ser mantida entre o ponto central e a máxima estimada no planejamento. Já para a solubilização de lignina (Figura 4.14b) o aumento do tempo e da temperatura são influências visíveis. Com o aumento da severidade do pré-tratamento foi possível se alcançar rendimentos mais altos.

4.2.3. Cinética de pré-tratamento com o 2HEAA

A partir dos resultados obtidos no planejamento experimental não foi observada uma grande diferença na composição de glicose (g/L) e conversão de celulose para a temperatura de 150°C com o efeito tempo (100 e 160 min). Portanto uma cinética do pré-tratamento foi realizada para avaliar se a concentração de glicose (g/L) se manteve constante após 100 minutos de pré-tratamento. Dessa forma, pode-se reduzir o tempo e o gasto energético no processo.

Os pré-tratamentos foram avaliados com base na liberação de glicose (g/L) e xilose (g/L), que são os dois principais açúcares obtidos a partir da cinética da hidrólise enzimática (Figura 4.15 e Figura 4.16).

Figura 4.15 - Cinética da hidrólise enzimática da concentração de glicose versus tempo de hidrólise para os diversos tempos de pré-tratamento com 2HEAA.

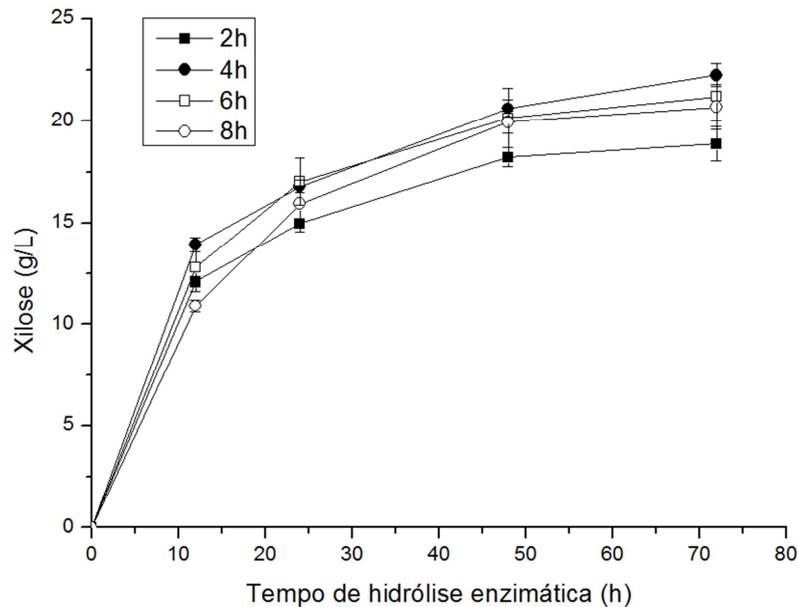


As variações nos tempos de pré-tratamento não apresentam influência significativa, pois após 72 horas de hidrólise enzimática se observa que a glicose convergiu em aproximadamente 50 g/L com os demais pré-tratamentos.

Para a concentração de xilose (g/L) (Figura 4.16) as concentrações variam entre 18 e 22 g/L em 72 horas de hidrólise enzimática. Essa variação não

justifica o aumento do tempo de pré-tratamento, evitando gastos energéticos mais altos.

Figura 4.16 - Cinética de hidrólise enzimática da concentração de xilose versus tempo de hidrólise para os diversos tempos de pré-tratamento com 2HEAA..



De acordo com as cinéticas do pré-tratamento, confirmadas pela hidrólise enzimática, os maiores tempos de pré-tratamento não trazem benefícios para o processo. Além disso, pode-se afirmar que mesmo com o aumento do tempo de pré-tratamento, não foi observada solubilização efetiva das frações de celulose e hemiceluloses.

4.2.4. Balanço de massa do pré-tratamento utilizando o 2HEAA.

A partir da cinética e do planejamento foi possível observar que o pré-tratamento realizado a 150°C por 2 h com 2HEAA:H₂O (5:1 m/m) e 10% de sólidos era o mais viável em termos de gastos energéticos e aproveitamento das frações celulose e hemiceluloses. Neste sentido, foi realizado um novo experimento, nessas mesmas condições de pré-tratamento, considerando a adição do complexo

enzimático Cellic Htec2 (Novozymes), junto ao complexo celulolítico com o objetivo de aumentar a conversão das hemiceluloses no meio hidrolisado (Tabela 4.6).

Tabela 4.6 - Variação de coquetel enzimático para a melhor condição de pré-tratamento com 2HEAA.

Pré-tratamento (%)		
Rendimento	68,3 ± 2,3	
Celulose	58,0 ± 4,2	
Hemicelulose	23,1 ± 1,8	
Lignina	17,0 ± 1,7	
Cinzas	2,2 ± 0,6	
Hidrólise enzimática		
Ensaio	A	B
Glicose (g/L)	50,4 ± 1,38	52,0 ± 1,97
Xilose (g/L)	18,8 ± 0,84	21,8 ± 2,07
Conversão de celulose (%)	77,4 ± 2,12	80,6 ± 2,50
Conversão de hemiceluloses (%)	69,1 ± 3,07	77,5 ± 3,55

Ensaio A: Pré-tratamento a 150°C por 2 h com 10% sólidos e 2HEAA:H₂O (5:1 m/m); Hidrólise enzimática com 10% de sólidos e coquetel enzimático Cellic Ctec2 (Novozymes).

Ensaio B: Pré-tratamento a 150°C por 2 h com 10% sólidos e 2HEAA:H₂O (5:1 m/m); Hidrólise enzimática com 10% de sólidos e coquetéis enzimáticos Cellic Ctec2 e Cellic Htec2 (Novozymes).

O intuito de se adicionar Cellic Htec2 na hidrólise enzimática era aumentar a conversão de hemiceluloses em xilose. A conversão aumentou de 69,1% para 77,5%. Além disso, a conversão de celulose aumentou quando comparada aos ensaios anteriores, isto é gerado devido ao sinergismo entre as enzimas (Ensaio A: 77,4 e B: 80,6%).

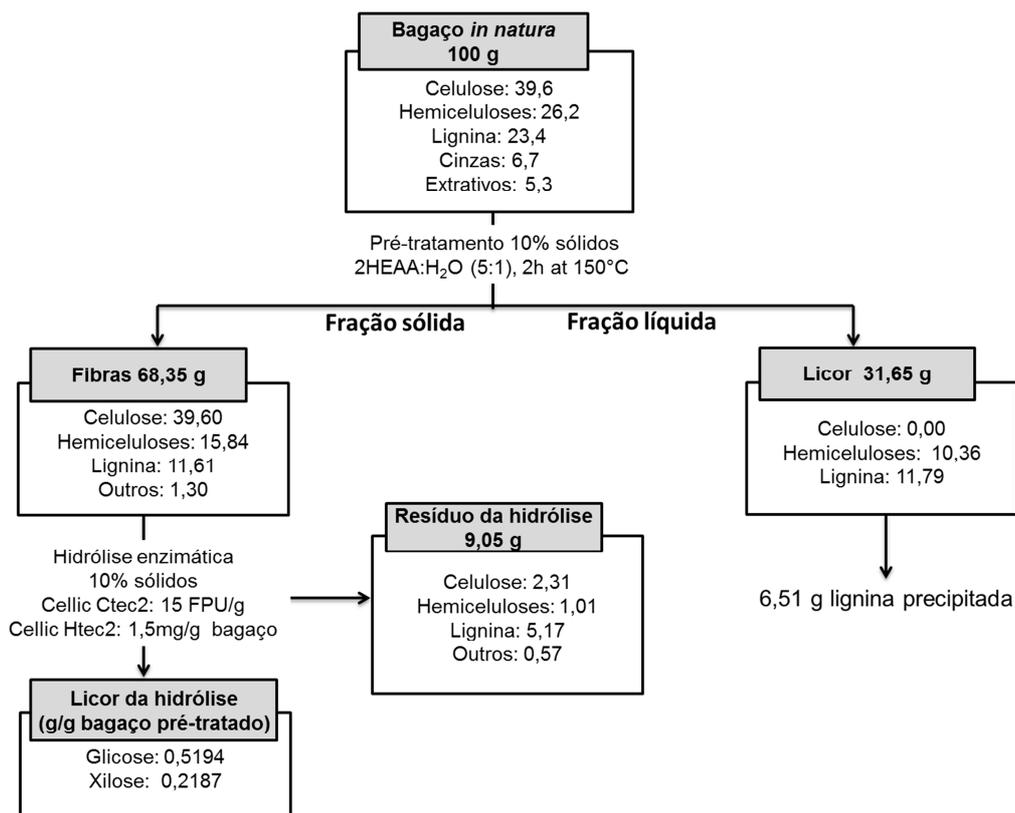
Esse estudo deve ser mais aprofundado com relação à quantidade de enzima adicionada ao processo, neste caso foram adicionados 1,5 mg/g de bagaço, baseado em uma faixa que a Novozymes sugere. Possivelmente se aumentarmos a quantidade de enzima adicionada, sem saturar o meio, pode-se alcançar valores maiores de conversão.

Quando se compara os resultados do Ensaio A com os resultados do planejamento experimental com 2HEAA (item 4.2.1) feitos a 150°C, é possível notar que os resultados estão um pouco diferentes do esperado, que seriam resultados de composição do bagaço pré-tratado e de conversões de celulose e hemiceluloses com valores entre os obtidos nos ensaios 10 e 11 do planejamento. A conversão de

hemiceluloses, especificamente, foi bem mais alta. Todo o planejamento foi realizado usando 2HEAA produzido de uma única vez. Para os novos ensaios da Tabela 4.6 uma nova reação de produção do LI precisou ser realizada. A diferença nos valores mostra que a etapa de produção do LI pode ter bastante influência nos resultados de pré-tratamento e hidrólise.

Com base no ensaio B, realizado com ambos os coquetéis, foi calculado o balanço de massa para o processo e os componentes foram expressos em grama de massa seca (Figura 4.17).

Figura 4.17 - Balanço de massa para o pré-tratamento (10% sólidos) com 2HEAA:H₂O (5:1 m/m) por 2 h a 150°C e hidrólise enzimática (10% sólidos) com Cellic Ctec2 e Cellic Htec2.



Em seguida ao pré-tratamento, 68,35 g do bagaço permaneceu na fração sólida, enquanto 31,65 g na fração líquida, que inclui o LIP 2HEAA e as frações solubilizadas de carboidratos e lignina. Nota-se que na fração líquida não há

presença de celulose, o que confirma que toda a celulose ficou disponível para hidrólise enzimática.

Além disso, foi reportada uma quantidade de 10,3 g de hemiceluloses solubilizadas por 100 g de biomassa *in natura*. Os LIs possuem a habilidade de solubilizar a lignina da biomassa lignocelulósica, em contrapartida na estrutura da biomassa as hemiceluloses estão ligadas a lignina por ligações covalentes, então é possível que parte das hemiceluloses sejam removidas conjuntamente com a lignina para a fração líquida do pré-tratamento.

Wu *et al.* (2011) admitiram poucas perdas de hemiceluloses quando pré-trataram resíduos de milho com [C₂min][OAc] (1 h a 125°C com variação de 4,8 a 33% sólidos m/m). Os autores chegaram a seus ensaios em aproximadamente 50% de conversão de hemiceluloses após a hidrólise enzimática com 0,1% sólidos (m/v) por 24 h.

Silva *et al.* (2013) que utilizaram [C₂min][OAc] para pré-tratar bagaço de cana-de-açúcar (2 h a 120°C e sólidos:LI 1:20 m/m) e concluíram que as hemiceluloses não são significativamente extraídas para o licor, permanecendo no sólido junto a celulose no processo de hidrólise enzimática, que levou a ~60% de conversão em xilose (2,5% sólidos).

Após a etapa de hidrólise enzimática, a fração de resíduo de hidrólise ainda apresenta celulose, já que não foi totalmente convertida à glicose durante a reação.

A lignina precipitada ao final do processo pode ser reaproveitada para a produção de produtos de alto valor agregado (6,51 g). Nesse processo é possível observar que nem toda a lignina disponível no licor foi recuperada, isso é limitado por parte dessa lignina ser encontrada na forma solúvel, degradada em compostos fenólicos no licor de pré-tratamento.

Rocha (2016) precipitou em seu processo (3,5 h a 150°C) 9,63 g de lignina. Essa maior quantidade de lignina encontrada pode estar relacionada ao maior tempo de pré-tratamento e condições anidras do processo, que levaram a uma maior remoção da lignina durante o pré-tratamento.

Baseado em Conde-Mejía *et al.* (2012) e considerando um rendimento de etanol teórico de 95% e 65% para xilose teórica, 217,9 kg etanol/ton de bagaço *in natura* podem ser obtidos usando o pré-tratamento com 2HEAA. Esse resultado se enquadra dentro do estipulado pelos autores que estimaram metas da produção de etanol dos pré-tratamentos hidrotérmico, explosão de vapor, ácido diluído, cal, AFEX e organosolv. Os valores variam de 229,75 L (ou 181,27 kg) etanol/ton biomassa *in natura* para a explosão de vapor a 372,53 L (ou 293,93 kg) etanol/ton biomassa *in natura* para o AFEX.

4.2.5. Estudo dos efeitos de diferentes LIPs no pré-tratamento do bagaço

Uma triagem com 11 LIPs foi realizada em pequena escala e avaliada pela concentração de glicose e xilose (g/L) e rendimentos globais após a etapa de hidrólise enzimática (considerando a quantidade de glicose obtida em comparação a glicose do bagaço *in natura*) após 48 h de hidrólise enzimática. O LIP foi levado a um pré-tratamento somente com a variação do tempo e temperatura, mantendo as mesmas condições de sólidos e água do pré-tratamento com o 2HEAA.

Para fins comparativos, os LIPs foram divididos em dois grupos: os sintetizados que possuem o ânion acetato e os com hidrogenossulfato, ambos com os mesmos cátions amina.

4.2.5.1. Efeitos dos LIPs a partir do ânion acetato

Na Tabela 4.7 são apresentados os resultados de rendimento do pré-tratamento, concentração de glicose e xilose (g/L) e rendimento global dos LIPs sintetizados a partir do ácido acético.

Os resultados de rendimento global de glicose estabelecem a seguinte ordem de efetividade dos LIPs no pré-tratamento, M-2HEAA < E-2HEAA < BEAA < TEAA < DEAA. Na Figura 4.18 é possível observar essa ordem de eficiência.

Figura 4.18 - Eficiência dos LIPs do grupo do ácido acético com base no rendimento global de glicose (calculado em 48 h de hidrólise) para os três tempos de pré-tratamento testados.

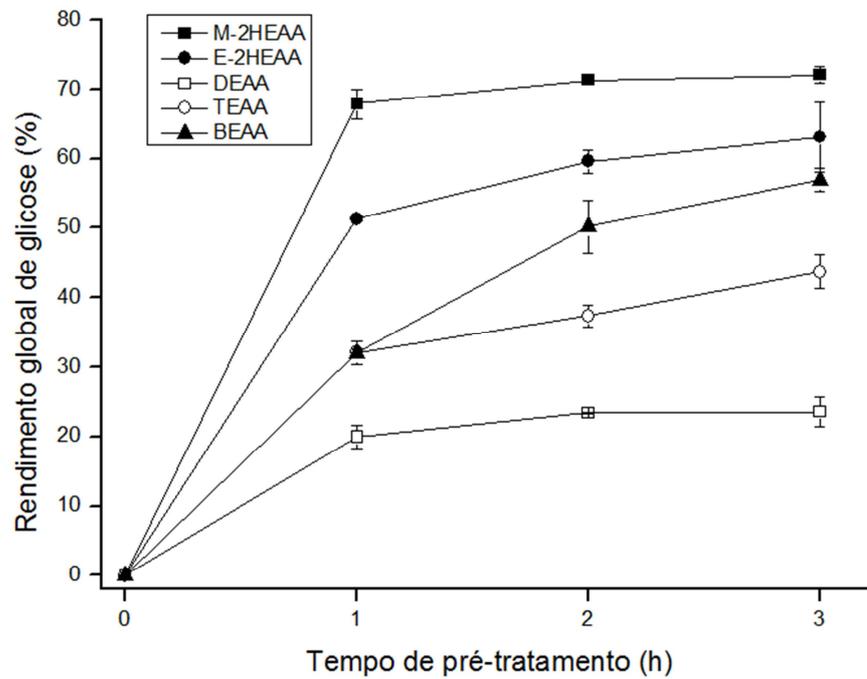


Tabela 4.7- Resultados da triagem dos LIPs com ácido acético. Hidrólise enzimática com 10% (m/v) de sólidos e 15 FPU/g de Celic Ctec2.

LIP	Condições		Rendimento	Hidrólise Enzimática		Rendimento Global	
	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Pré-tratamento (%)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Glicose (%)	Xilose (%)
M-2HEAA	160	1	67,43±2,05	41,94±2,57	20,38±1,09	67,90±2,15	47,54±1,15
		2	65,93±0,42	46,39±0,26	21,22±1,33	71,38±0,05	47,05±3,24
		3	64,79±1,17	47,69±0,09	21,09±3,15	72,09±1,17	45,90±6,03
E-2HEAA	145	1	79,83±2,08	27,56±0,92	12,64±0,95	51,32±0,38	37,70±0,76
		2	73,45±0,47	34,79±0,77	15,14±1,68	59,64±1,71	40,48±2,12
		3	70,91±1,78	38,12±2,13	17,94±2,24	63,12±5,11	45,21±2,39
DEAA	120	1	88,28±1,11	9,39±0,94	4,12±0,22	19,96±1,60	11,40±0,47
		2	85,99±0,40	11,46±0,03	5,22±0,06	23,42±0,05	14,13±0,24
		3	85,76±1,63	11,55±0,89	5,67±0,35	23,53±2,15	15,33±1,24
BEAA	125	1	81,92±4,31	16,77±1,76	5,82±0,61	31,97±1,67	16,07±2,52
		2	79,80±4,51	26,96±0,51	7,57±0,29	50,22±3,80	20,29±0,37
		3	77,64±2,23	31,44±0,05	10,09±1,34	56,97±1,72	26,38±4,26
TEAA	130	1	84,34±0,03	16,31±0,29	7,74±0,11	32,10±0,58	21,94±0,33
		2	82,92±0,69	19,30±0,67	9,51±0,17	37,35±1,61	26,53±0,68
		3	78,48±0,67	23,88±1,49	12,09±0,66	43,73±2,36	31,91±1,47

O LIP que apresentou melhor rendimento global de glicose foi o M-2HEAA, seguido pelo E-2HEAA para 3 h de pré-tratamento. Eles alcançaram $72,1\% \pm 1,1$ e $63,1\% \pm 5,1$, respectivamente. Nessa comparação, a temperatura usada no pré-tratamento com E-2HEAA foi menor, além disso, a sua viscosidade é relativamente maior comparada ao M-2HEAA, provavelmente esse conjunto de fatores influenciou na interação do LIP com a fase sólida do meio.

O rendimento global de glicose para 2 h de pré-tratamento, $71,3\% \pm 0,1$, obtido para o M-2HEAA é semelhante ao 2HEAA ($80,5\% \pm 2,2$). Ambos LIPs se apresentaram com rendimentos e concentração de açúcares estáveis a partir de 2h de pré-tratamento, possuem estrutura linear e grupos hidroxilas que ajudam na interação com a estrutura da celulose que possivelmente provoca uma diminuição da cristalinidade. O M-2HEAA também apresenta um carbono a mais em sua estrutura e este não apresentou interferência significativa na hidrólise enzimática.

O E-2HEAA também apresenta uma cadeia linear e um grupo hidroxila em uma das suas extremidades, como citado anteriormente para o 2HEAA e o M-2HEAA. Entretanto, em sua estrutura se encontra um grupo etil que dá ao LIP final um total de cinco carbonos. De acordo com o aumento no número de carbonos na estrutura do LI, ele tende a apresentar uma dificuldade de interação nas superfícies da fibra e no seu meio, pode-se supor que o impedimento estérico dessa estrutura aumenta, dificultando a interação das fases sólida e líquida.

Os demais LIPs testados nesse grupo estão seguidos pela ordem de efetividade de BEAA, TEAA e DEAA alcançando rendimentos globais de glicose, para 3 h de pré-tratamento, de aproximadamente $56,9\% \pm 1,7$, $43,7\% \pm 2,3$ e $23,5\% \pm 2,1$, respectivamente. O DEAA apresentou um rendimento muito mais baixo que os demais LIs, isto pode estar relacionado a uma baixa interação dele com a fase sólida e também a apresentar um alto impedimento estérico por parte do LI. O DEAA foi o único LIP sólido em temperatura ambiente, sendo necessário fundi-lo a 50°C para seu manuseio.

Em uma análise isolada o TEAA apresentou rendimentos mais baixos que o BEAA, isso é esclarecido pelo LI possuir uma estrutura ramificada, onde há possibilidades de apresentar um impedimento estérico alto o que dificulta a interação do LI com a biomassa.

Já o BEAA possui uma estrutura linear que interage mais facilmente, penetrando entre as fibras do bagaço, semelhantes as dos LIPs 2HEAA, M-2HEAA e E-2HEAA. O que influencia na redução do rendimento do BEAA para os demais é a não presença do grupo hidroxila em sua estrutura.

Os LIPs que possuem em seu cátion hidroxilas (M-2HEAA e E-2HEAA) são possivelmente favorecidos por interações geradas pelas ligações de hidrogênio entre a celulose e o cátion do LIP. Isto é, ocasiona uma diminuição na cristalinidade e um aumento de área de superfície específica da celulose.

Outro fator influenciador é o tamanho da cadeia do cátion. Maiores cadeias possivelmente geram dificuldades de interação do LIP as fibras de celulose. É possível observar que as menores cadeias em ordem crescente M-2HEAA < E-2HEAA < BEAA < DEAA < TEAA apresentam rendimentos quase nessa mesma ordem. Apenas o DEAA que não obedece e apresenta o pior rendimento de glicose, isso já foi comentado anteriormente e pode estar ligado a sua baixa interação com a fase sólida e um alto impedimento estérico, sendo este LIP o único sólido em temperatura ambiente.

Rocha (2016) também concluiu que os LIPs formados de cátions de cadeias menores apresentam melhores resultados no pré-tratamento de bagaço. Possivelmente isso possa ser explicado pela distribuição mais irregular de cargas dos íons em cadeias de maior tamanho, que causam uma menor interação e uma menor capacidade de formação de ligações de hidrogênio com as cadeias de celulose da biomassa.

O ânion acetato também influencia na interação com a celulose. Raj *et al.* (2016) citam que os LIs baseados em ânion acetato possivelmente alteram significativamente a estrutura cristalina da celulose durante o pré-tratamento. Meenatchi *et al.* (2016) e Asawaka *et al.* (2015) ressaltam que possivelmente o ânion acetato interage mais facilmente com o hidrogênio das hidroxilas encontradas nas cadeias de celulose, pois recebe esse tipo de ligação mais facilmente, acarretando no aumento do rendimento na etapa de hidrólise enzimática.

Além disso, o ânion acetato dá ao LIP a característica de pH básico (item 4.1), logo podemos concluir que o pré-tratamento tem resultados semelhantes a um

pré-tratamento alcalino que apresenta deslignificação da biomassa lignocelulósica. Rocha (2016) também alcançou altos rendimentos de deslignificação com a utilização do ânion acetato.

4.2.5.2. Efeitos do LIPs com ânion hidrogenossulfato

Após a triagem com os LIPs utilizando ânion acetato, foi testada a substituição desse pelo hidrogenossulfato e observada a diferença de atuação no bagaço. Na Tabela 4.8 são apresentados os resultados de rendimento do pré-tratamento, concentração de glicose e xilose (g/L) e rendimento da hidrólise.

Para essa etapa da triagem foram considerados os resultados de rendimento global de glicose em 30 min de pré-tratamento, pois o ensaio de 45 min para o LIP TEAHS apresenta uma mudança de tendência que pode ter sido causada por erros experimentais. Neste caso, se estabelece a seguinte ordem de efetividade dos LIPs no pré-tratamento (30 min), BEAHS < DEAHS < TEAHS < E-2HEAHS < M-2HEAHS < 2HEAHS. É possível observar essa ordem de eficiência na Figura 4.19.

Figura 4.19 - Eficiência dos LIPs do grupo do ácido sulfúrico com base no rendimento global de glicose (48h de hidrólise) para os três tempos de pré-tratamento testados.

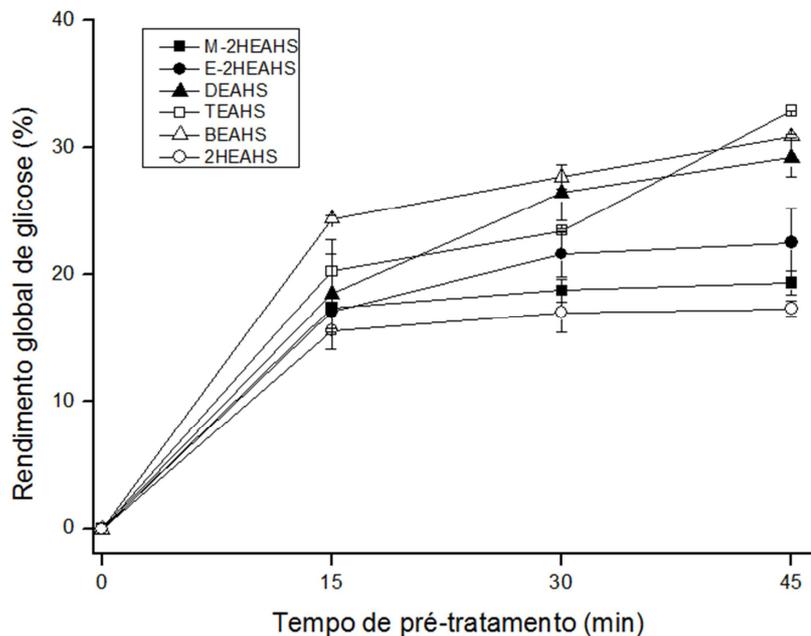


Tabela 4.8 - Resultados da triagem dos LIPs com ácido sulfúrico.

LIP	Condições		Rendimento	Hidrólise Enzimática		Rendimento Global	
	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Pré-tratamento (%)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Glicose (%)	Xilose (%)
2HEAHS	120	15	71,04±0,35	10,43±0,13	1,53±0,19	17,29±0,14	7,11±0,13
		30	64,91±0,15	11,22±1,08	2,24±0,01	16,99±1,59	4,90±0,01
		45	63,40±2,16	10,54±0,77	2,98±0,07	15,57±0,61	3,28±0,51
M-2HEAHS	120	15	77,59±2,03	9,58±0,42	3,31±0,08	17,33±0,32	8,64±0,03
		30	70,21±0,22	11,44±0,51	3,55±0,15	18,73±0,88	8,38±0,38
		45	64,92±2,78	12,78±1,16	3,92±0,36	19,33±0,94	8,57±1,16
E-2HEAHS	120	15	91,02±1,01	8,03±1,46	3,98±0,02	17,03±2,92	12,19±0,06
		30	75,85±0,65	12,24±1,11	4,40±0,36	21,65±1,78	11,21±0,82
		45	68,17±1,30	14,18±1,99	4,27±1,15	22,52±2,73	9,77±2,42
DEAHS	120	15	85,17±1,53	9,32±1,77	3,79±0,59	18,48±3,20	10,83±1,50
		30	72,65±1,19	15,62±1,55	5,19±0,66	26,47±2,19	12,67±1,41
		45	66,07±2,51	18,98±0,26	5,35±0,42	29,26±1,52	11,90±1,38
BEAHS	120	15	60,54±0,28	17,28±0,10	2,28±0,31	24,42±0,26	8,60±0,32
		30	55,96±2,06	23,66±0,17	3,18±0,68	27,72±0,14	5,96±1,05
		45	50,44±2,48	23,58±1,04	4,22±0,14	30,89±0,92	3,86±0,34
TEAHS	120	15	91,38±2,12	9,50±0,95	3,59±0,34	20,27±2,49	11,06±1,29
		30	80,22±1,08	12,55±0,26	4,82±0,16	23,48±0,17	12,99±0,62
		45	73,18±0,38	19,25±0,10	6,06±0,23	32,87±0,00	14,91±0,49

O LIP que apresentou melhor rendimento (30 min de pré-tratamento) foi o BEAHS com rendimento global de glicose de $27,7,8\% \pm 0,1$, seguido pelo DEAHS com $26,4\% \pm 2,1$ e TEAHS com $23,4\% \pm 0,1$. Neste caso, o TEAHS, DEAHS e o BEAHS não apresentaram diferença significativa de rendimento.

George *et al.* (2015) utilizou TEAHS e DEAHS em 20% de água para pré-tratar 10% de *switchgrass* por 3 h a 120°C . Os rendimentos de glicose alcançados, após 48 h de hidrólise enzimática (1% m/m) foram de respectivamente, 45% e 40%.

Os rendimentos obtidos por George *et al.* (2015) foram mais altos que os encontrados nesse trabalho, mas considerados baixos ainda quando comparados a outros estudos envolvendo LIPs no pré-tratamento de biomassa. Além disso, os autores utilizaram um tempo de pré-tratamento quatro vezes maior que o máximo usado nesse trabalho e *switchgrass* como fonte de biomassa lignocelulósica.

Verdia *et al.* (2014) sintetizaram LIP a partir de ácido sulfúrico, resultando em hidrogenossulfato de 1-butimidazólio. Utilizaram o LIP e água (80:20% v/v) para pré-tratar *Miscanthus giganteus* (1% sólidos) por 24 h a 120°C . Os autores alcançaram 90% de rendimento de glicose na hidrólise enzimática com 1,5% de sólidos (m/v) após 96 h.

Os LIPs 2HEAHS, M-2HEAHS e E-2HEAHS apresentaram rendimentos globais de glicose muito mais baixos que os demais, $16,9\% \pm 1,5$, $18,7\% \pm 0,8$ e $21,6\% \pm 1,7$, respectivamente. Todos esses LIs possuíam em sua estrutura um grupo hidroxila. George *et al.* (2015) citaram que entre os LIPs estudados os rendimentos mais baixos vieram dos que apresentavam grupo hidroxila em sua estrutura.

Os LIs que possuem o ânion hidrogenossulfato e que em sua estrutura final possuem um grupo hidroxila no cátion, como por exemplo, 2HEAHS, M-2HEAHS e E-2HEAHS. Possivelmente a hidroxila diminui a efetividade do pré-tratamento, isto é, a interação entre a fibra e esses LIPs é considerada fraca.

Apesar da eficiência do pré-tratamento ser avaliada como baixa as hemiceluloses foram possivelmente solubilizadas, pois são consideradas mais sensíveis à degradação em condições ácidas e outra hipótese é que não houve

modificação na estrutura da celulose e a lignina não foi solubilizada, isso justifica os altos rendimentos para esses pré-tratamentos.

O pré-tratamento com esses LIPs podem ser comparado aos pré-tratamentos ácidos. Neste caso o ânion hidrogenossulfato deixa o pH ácido desses LIPs (item 4.1) e conseqüentemente o LIP se comporta como um pré-tratamento ácido, não deslignificando a biomassa e ocasionado um baixo desempenho na hidrólise enzimática. George et al. (2015) utilizou LIPs com ânion hidrogenossulfato e também confirmou a baixa deslignificação da biomassa lignocelulósica.

Os pré-tratamentos de ácidos diluídos que utilizam ácido sulfúrico são baseados no uso de aproximadamente 1% (m/v) de ácido e os tempos são baixos, 10 min para temperaturas mais extremas (190°C) e 30 min para as mais amenas (~120°C) (Rocha *et al.* 2011, Martins *et al.* 2015). Os autores afirmam que grande parte de hemiceluloses são solubilizadas nesses pré-tratamentos e se consegue manter a celulose e lignina.

O pré-tratamento utilizando os LIPs com ânion hidrogenossulfato deixam o processo ineficaz por ocorrer em condições altamente ácidas e com uma combinação de tempo e temperatura não favoráveis ao processo. Além disso, uma suposição é que a atuação do hidrogenossulfato não tenha sido eficiente para modificar a estrutura da celulose. Isto explica os efeitos observados de degradação da biomassa quando comparado a outros pré-tratamentos com LIPs, possivelmente parte das hemiceluloses foram solubilizadas e se manteve a lignina e parte da celulose em alguns pré-tratamentos com esses LIs.

Baseado na análise pelo aumento da cadeia do cátion, como realizado por Rocha (2016), os LIPs que não possuem hidroxila na cadeia do cátion seguiram a ordem de aumento de cadeia e conseqüentemente a diminuição no rendimento, como BEAHS < DEAHS < TEAHS.

Já os LIPs que possuem na cadeia do cátion uma hidroxila seguem uma ordem inversa a anterior, os maiores rendimentos vem de cadeias maiores, E-2HEAHS < M-2HEAHS < 2HEAHS. Essa interação pode ser ocasionada pela formação de ligações de hidrogênio, sendo que o aumento da cadeia favoreceu para

a distância ficar mais apropriada gerando a melhor interação entre o bagaço e esses LIPs.

4.2.5.3. Comparação entre os LIPs estudados

Na Figura 4.20 pode ser observado a comparação dos LIs de mesma base com seus diferentes ácidos testados para sua síntese em relação ao rendimento global de glicose ao final da hidrólise enzimática.

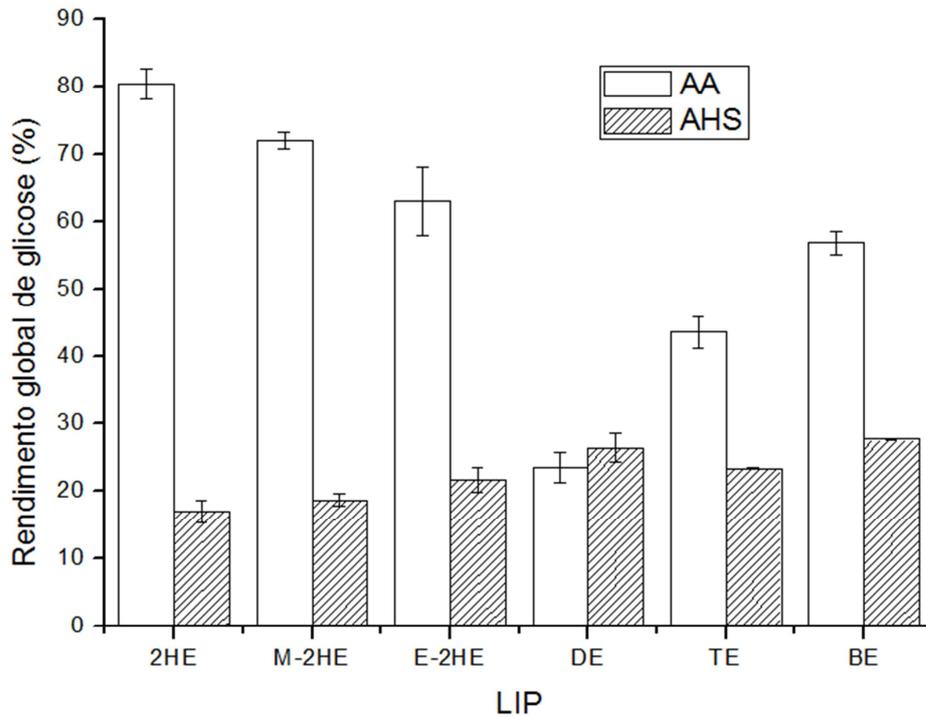
Para fins de comparação foram calculados os rendimentos global de glicose e xilose para o 2HEAA na condição de pré-tratamento de 2h a 150°C e foram obtidos $80,5\% \pm 2,2$ e $43,4 \pm 1,9$, respectivamente.

Os resultados são baseados em 3 h de pré-tratamento para quase todos os LIPs com acetato, exceto para o 2HEAA que foram plotados resultados de 2 h. Os resultados de pré-tratamentos de LIPs com hidrogenossulfato são os de 30 min. Em todos os casos o rendimento global de glicose e xilose foi calculado para 48h de hidrólise.

É possível observar que praticamente todos os LIPs com acetato apresentaram rendimentos de hidrólise enzimática melhor comparada aos de hidrogenossulfato. Só o DEAA que foge à regra, mas ambos os LIs com a dietilamina não apresentaram bons rendimentos, abaixo de 30%.

É visível a diferença de rendimentos para os LIs com as bases 2-etanolamina, 2-metil-etanolamina e 2-etil-etanolamina combinadas com o ácido acético. Isso foi possivelmente gerado pela presença da hidroxila em sua estrutura.

Figura 4.20 - Comparação do rendimento global de glicose dos LIPs utilizados.

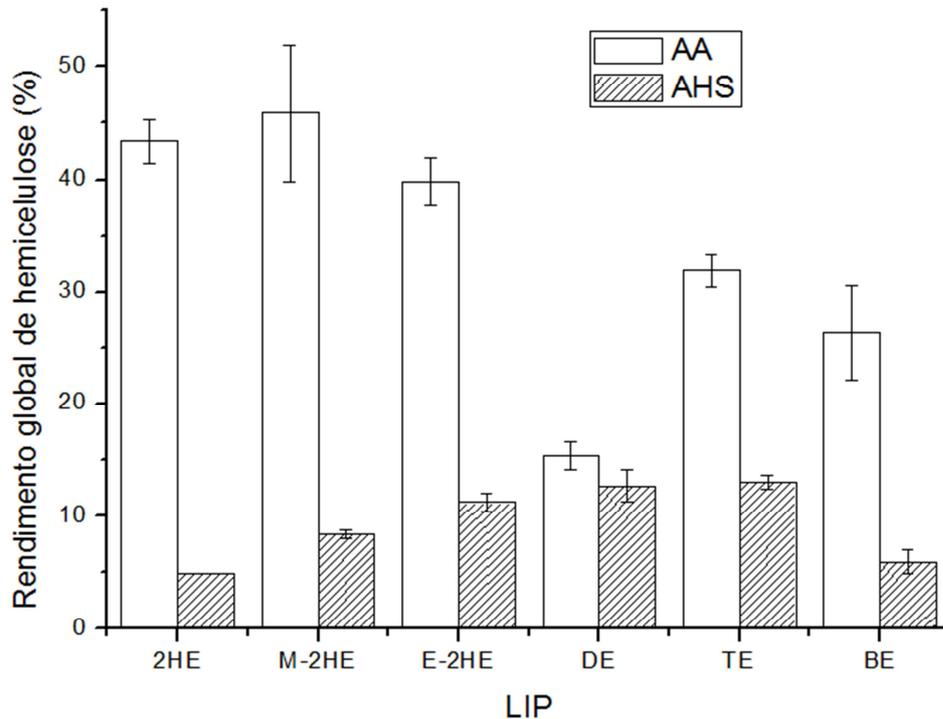


Legenda: AA – Acetato; AHS: Hidrogenossulfato.

Por ordem de eficiência, temos: 2HEAA < M-2HEAA < E-2HEAA < BEAA < TEAA < BEAHS < DEAHS < TEAHS < E-2HEAHS < M-2HEAHS < 2HEAHS.

Já na Figura 4.21 é realizada a comparação em relação ao rendimento global de xilose ao final da hidrólise enzimática. É visível que todos os LIPs com acetato foram melhores em relação ao rendimento de xilose que os demais.

Em ordem de eficiência, temos: M-2HEAA < 2HEAA < E-2HEAA < TEAA < BEAA < DEAA < TEAHS < DEAHS < E-2HEAHS < M-2HEAHS < BEAHS < 2HEAA.

Figura 4.21 - Comparação do rendimento global de xiloses dos LIPs

Legenda: AA – Acetato; AHS: Hidrogenossulfato.

Em termos de eficiência na análise de rendimentos de glicose e xilose, praticamente todos os LIPs com acetato foram melhores quando comparados aos demais, exceto a DEAA e DEAHS que não mostraram diferença de eficiência tão significativa.

É possível afirmar que os LIPs sintetizados com ácido acético apresentam melhores resultados de rendimentos de hidrólise quando comparado ao ácido sulfúrico. Isso se deve ao fato do ácido sulfúrico dar ao LIP uma característica muito ácida e possuir em sua estrutura final dois prótons disponíveis para o pré-tratamento, como já foi citado no item 4.2.5.2 e possivelmente não modificou a estrutura da celulose para um ataque mais eficiente das enzimas na etapa subsequente, como também não deslignificou a biomassa.

Há varias variáveis que podem influenciar no pré-tratamento com esses LIPs, além da diferença de ânions. A viscosidade é um desses fatores, pois todos os LIPs sintetizados possuíram variabilidade nas suas viscosidades, entre 16–923 mPa/s dependendo da combinação do cátion e do ânion. Sabe-se que altas viscosidades são fatores de limitações dos LIs e acarretam diretamente em aumento

de custos do processo e complexibilidade de operações, como por exemplo mistura, que implica também na eficácia do processo em termo de transferência e reação de massa.

Para minimizar essa viscosidade diversos trabalhos optam pela adição de água no processo. Nesse estudo foram utilizados 15% de água (m/m) que acarretaram na diminuição da viscosidade do LI e não afetou o rendimento do processo quando comparado ao trabalho desenvolvido dentro do grupo de pesquisa por Rocha (2016) que utilizou condições anidras e foram obtidos rendimentos de glicose de 68,5%.

A utilização de água é uma estratégia recomendada desde que não haja redução significativa na eficácia do pré-tratamento. Esta estratégia foi demonstrada também no trabalho de George *et al.* (2015) em que misturas de LI-água com água a 20% (m/m) foram empregados com sucesso para o pré-tratamento de *switchgrass*, no trabalho de Verdia *et al.* (2014) que comprovaram essa eficácia com água a 20% (m/m) para pré-tratar *Miscanthus giganteus* e Hou *et al.* (2013) que utilizou misturas de LI-água de 5 a 80% de LI (m/m) para pré-tratar bagaço de cana e confirmou que altas concentrações de água diminuem a eficácia do processo. Com base nesses autores o LIP não requer condições anidras para ser eficaz no pré-tratamento de biomassa.

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho o objetivo principal foi estudar a influência de diversos LIPs no pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar, em diferentes condições, e confirmar sua efetividade, por meio de hidrólise enzimática, com a conversão de carboidratos da biomassa em açúcares fermentescíveis.

Os 12 LIPs utilizados para o estudo depois de sintetizados e analisados apresentaram ótima eficiência na síntese, sendo condizentes com o produto esperado da reação de neutralização ácido base de Bronsted.

A partir dos LIPs sintetizados, o 2HEAA foi utilizado para avaliar diferentes condições de pré-tratamento (tempo e temperatura) com adição de água ao processo. A etapa de caracterização do bagaço após pré-tratamento mostrou alta solubilização de lignina e parcialmente de celulose e hemicelulose nas variáveis estudadas. Isto confirmou a efetiva interação do 2HEAA no pré-tratamento de bagaço mesmo nas condições mais severas do planejamento experimental (150°C por 160 min).

Foram observadas baixas solubilizações de celulose e hemiceluloses durante a etapa de pré-tratamento. Na etapa de hidrólise enzimática foi obtida uma conversão de celulose em glicose de 72% e de hemiceluloses em xilose de 45,6%, considerando a melhor condição de pré-tratamento (150°C por 160 min). A partir disso a temperatura de 150°C foi considerada a mais viável para a continuidade dos experimentos com esse LIP.

Um estudo cinético utilizando o 2HEAA mostrou que é possível reduzir o tempo de pré-tratamento e ainda obter altas concentrações de glicose após 48 h de hidrólise enzimática. O LIP apresentou conversão de celulose de 77,4% para 2 h de pré-tratamento a 150°C.

Com o intuito de alcançar uma maior conversão da fração hemicelulósica da biomassa pré-tratada, um ensaio com a adição do coquetel enzimático Cellic Htec2, junto a Cellic Ctec2, foi realizado utilizando o pré-tratamento 2HEAA (2h a

150°C). Este complexo enzimático favoreceu a não só a conversão das hemiceluloses quanto à da celulose, 77,4% e 80,6%, respectivamente.

A utilização do 2HEAA no pré-tratamento se mostrou eficiente mesmo na presença da água de síntese e de processo (considerando a umidade do bagaço) (LIP:H₂O 5:1 m/m), o bagaço não passou por redução em seu tamanho de partícula, e manteve-se uma carga de sólidos considerada alta no pré-tratamento e na hidrólise enzimática (10%). Esses fatores não influenciaram nas conversões de celulose e nos rendimentos globais de hidrólise comparados a trabalhos encontrados na literatura e do próprio grupo de pesquisa.

Para a triagem dos LIPs os que possuem em sua estrutura os acetatos são considerados mais eficientes e apresentam rendimentos globais de glicose entre 23,5 e 72,1%, enquanto os que possuem o ânion hidrogenossulfato variam entre 15,5 e 32,8%.

No grupo do ânion acetato, o LIP que se mostrou mais eficiente foi o 2-HEAA com 80,5% de rendimento de glicose na hidrólise e que apresenta a menor cadeia de cátion, seguido do M-2HEAA com 71,3%.

Os LIPs com hidrogenossulfato não apresentaram bons resultados de rendimentos globais, pois o ácido sulfúrico utilizado para síntese deixa o LIP com características muito ácidas e não alcançam bom desempenho de pré-tratamento. A hipótese é que a estrutura da celulose não é modificada e não há solubilização de lignina.

O estudo mais aprofundado dos LIPs no bagaço de cana-de-açúcar está em continuidade pelo grupo de pesquisa. O 2HEAA se mostrou como bom solvente para solubilização da lignina e manteve grande parte da celulose e das hemiceluloses disponíveis para hidrólise enzimática.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realização de investigações para o desenvolvimento de LIPs que podem combinar eficácia no pré-tratamento de biomassa com a capacidade de ser recuperado e reutilizado;
- Otimização na lavagem do bagaço para alcançar uma maior recuperação de lignina com a utilização de outros antissolventes;
- Estudo para aumentar a concentração de água adicionada ao processo de pré-tratamento e para recuperação e reaproveitamento de LIP no processo.
- Avaliação de outros ácidos com as bases aminas testadas e principalmente a exploração da monoetanolamina que se mostrou muito eficiente para o pré-tratamento de bagaço;
- Estudo da caracterização do bagaço pré-tratado com M-2HEAA que alcançou rendimentos de glicose próximos ao 2HEAA;
- Avaliação da composição do bagaço pré-tratado com os LIPs que possuem o ânion hidrogenossulfato para que seja possível compreender melhor o que houve na reação de pré-tratamento;
- Exploração da dosagem correta da Cellic Htec2 combinada com a Cellic Ctec2 para alcançar maior rendimento de conversão de celulose e hemiceluloses na hidrólise enzimática;

REFERÊNCIAS

- ADNEY, B., BAKER, J. Measurement of cellulase activities. Chemical analysis and testing task – laboratory analytical procedure. **National Renewable Energy Laboratory (NREL)**, LAP-006,1996.
- ALBINO, J. de C.; CRESTE, S.; FIGUEIRA, A. Mapeamento genético da cana-de-açúcar. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. v.9, n.36, 2006.
- ÁLVAREZ, V. H.; DOSIL, N.; GONZALEZ-CABALEIRO, R., MATTEDI, S.; MARTIN-PASTOR, M.; IGLESIAS, M.; NAVAZA, J. M. Brønsted Ionic Liquids for Sustainable Processes: Synthesis and Physical Properties. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 55, p. 625-32, 2010a.
- ÁLVAREZ, A. V. H., MATTEDI, S., MATIN-PASTOR, M., AZNAR, M., IGLESIAS, M. Synthesis and thermophysical properties of two new protic long-chain ionic liquids with oleate anion. **Fluid Phase Equilibria**. v. 299. p. 42–50, 2010b.
- ÁLVAREZ, V. H., MATTEDI, S.; AZNAR, M. Density, Refraction Index, and Vapor–Liquid Equilibria of n-Methyl-2-hydroxyethylammonium Hexanoate Plus (Methyl Acetate, Ethyl Acetate, or Propyl Acetate) at Several Temperatures. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 51, p. 14543-54, 2012.
- ÁLVAREZ, V. H., SERRÃO, D., SILVA JR, J. L. da, BARBOSA, M. R., AZNAR, M. Vapor–liquid and liquid–liquid equilibrium for binary systems ester + a new protic ionic liquid. **Ionics**, v. 19, p. 1263-69, 2013.
- ALVIRA, P., TOMÁS-PEJÓ, E., BALLESTEROS, M., NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**. v. 101. p. 4851-4861. 2010.
- ANGELL, C. A., BYRNE, N., BELIERES, J. Parallel Developments in Aprotic and Protic Ionic Liquids: Physical Chemistry and Applications. **American Chemical Society**. v.40, p.1228–1236, 2007.
- ARIEDI JR., V. R., MIRANDA, J. R. **Combustão do bagaço da cana-de-açúcar, autossuficiência energética e carbono neutro**. VII Workshop Agroenergia, Ribeirão Preto, SP, 2013.

ASAKAWA, A., KOHARA, M. SASAKI, C., ASADA, C., NAKAMURA, Y. Comparison of choline acetate ionic liquid pretreatment with various pretreatments for enhancing the enzymatic saccharification of sugarcane bagasse. **Industrial Crops and Products**. v.71. p.147–152, 2015.

ASTM E1721. Test Method for the Determination of Acid-Insoluble Residue in Biomass. **American Society for Testing and Materials**, U.S.A, 1-3, 1995.

ASTM E1758. Standard Test Method for Determination of Carbohydrates in Biomass by High Performance Liquid Chromatography. **American Society for Testing and Materials**, U.S.A, 1-5, 1996.

AYALA, O. L. B. **Avaliação de pré-tratamentos para hidrólise enzimática de palha de cana-de-açúcar considerando a produção de etanol**. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2012. Dissertação (Mestrado).

BICAK, N. A new ionic liquid: 2-hydroxy ethylammonium formate. **Journal of Molecular Liquids**. v. 116. p. 15– 18, 2005.

BRADFORD, M. M. A rapid sensitive method for a quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, p.248-254, 1976.

BRANDT, A.; RAY, M. J.; TO, T. Q., LEAK, D. J., MURPHY, R. J., WELTON, T. Ionic liquid pretreatment of lignocellulosic biomass with ionic liquid–water mixtures. **Green Chemistry**., v.13, p.2489-2499, 2011.

BRANDT, A., GRÄSVIK, J., HALLETT, J. P., WELTON, T. Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. **Green Chemistry**., v.15, p.550-583, 2013.

BUCKERIDGE, M. S., SANTOS, W. dos, SOUZA, A. P. Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para Produtividade Sustentabilidade. cap. 7 Cortez, L. A. B., editora **Edgard Blücher Ltda**. São Paulo, 2010.

CHEN, M., ZHAO, J., XIA, L. Comparison of four different chemicals pretreatment of corn stover for enhancing enzymatic digestibility. **Biomass and Bioenergy**, v.33, p. 1381-1385, 2009.

CLARKE, M. A.; GODSHAL, M.A. Chemistry and Processing of Sugarbeet and Sugarcane. **Elsevier Science Publishers B.V.** Amsterdam; 1988.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**. ISSN. 2318-7921. v.2, n.4, safra 2015/16. Quarto levantamento, Abril/2016.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **A geração termoelétrica com a queima do bagaço de cana-de-açúcar no Brasil** – Análise de desempenho da safra 2009/10. ISSN. 2318-7921, Março/2011.

CONDE-MEJÍA, C, JIMÉNEZ-GUTIÉRREZ, A, EL-HALWAGI, M. A comparison of pretreatment methods for bioethanol production from lignocellulosic materials. **Process Safety and Environmental Protection**. v. 90, p.189–202, 2012.

CONSORTI, C. S., SOUZA, R. F., DUPONT, J. Líquidos iônicos contendo o cátion dialquilimidazólio: estrutura, propriedades físico-químicas e comportamento em solução. **Química Nova**, v. 24, p.830, 2001.

D'ANDOLA, G., SZARVAS, L., MASSONNE, K., STEGMANN, V., Ionic liquids for solubilizing polymers. **WO 2008/043837**, 2008.

DALMEIDA, M. L. O. Composição Química dos Materiais Lignocelulósicos. **In: Celulose e Papel** – Tecnologia de Fabricação da Pasta Celulósica. São Paulo: Instituto de Pesquisas do Estado de São Paulo., 2ª. Ed., vol.1,1998.

DUPONT, J. On the Solid, Liquid and Solution Structural Organization of Imidazolium Ionic Liquids. **Jornal. Brazilian. Chemical. Society**. v.15, n.3, p.341-350, 2004.

ETA, V., ANUGWON, I., VIRTANEN, P., ERÄNEN, K., MÄKI-AVELA, P., MIKKOLA, J-P. Loop vs. batch reactor setups in the fractionation of birch chips using switchable ionic liquids, **Chemical Engineering Journal**, v.238, p.242–248, 2014.

FEI, Z.; ZHAO, D., GELDBACH, T. J., SCOPELLITI, R., DYSON, P. J. Brønsted acidic ionic liquids and their zwitterions: synthesis, characterization and pKa determination. **Journal Chemistry European.**, v.10. p.4886 – 4893, 2004

FENGEL, D., WEGENER, G. **Wood Chemistry, Ultrastructure, Reactions**. Walter de Gruyter, Berlin, 1989.

FERREIRA, A. F.; SIMOES, P. N.; FERREIRA, A. G. M. Quaternary phosphonium-based ionic liquids: Thermal stability and heat capacity of the liquid phase. **Journal Chemistry Thermodynamics**, v. 45, p. 16–27, 2012.

FINANCIE, R., MONIRUZZAMANA, M., UEMURA, Y. Enhanced enzymatic delignification of oil palm biomass with ionic liquid pretreatment. **Biochemical Engineering Journal**. v.110, p.1–7, 2016.

FRANZOI, A. C., BRONDANI, D., ZAPP, E., MOCCELINI, S. K., FERNANDES, S. C., VIEIRA, I. C., DUPONT, J. Incorporação de líquidos iônicos e nanopartículas metálicas na construção de sensores eletroquímicos. **Química nova**. v. 36, nº 6, 2011.

GEORGE, A., BRANDT, A., TRAN, K., SHAHRUL, M. S., ZAHARI, S. N., KLEIN-MARCUSCHAMER, D., SUN, D., SATHITSUKSANO, N., SHI, J., STAVILA, V., PARTHASARATHI, R., SINGH, S., HOLMES, B. M., WELTON, T., SIMMONS, B. A. HALLETT, J. P. Design of low-cost ionic liquids for lignocellulosic biomass pretreatment. **Green Chemistry**. v.17, p.1728, 2015.

GEORGES, F. **Caracterização da palha de cana-de-açúcar do Rio Grande do Sul e dos seus produtos de pirólise**. Porto Alegre: Pós-Graduação em Ciências dos Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011. Dissertação (Mestrado).

GHANDI, K. A review of ionic liquids, their limits and applications. **Green and Sustainable Chemistry**. v.4. p.44-53, 2014.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulose activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, p. 257-268, 1987.

GREAVES, T. L., DRUMMOND, C. J. Protic ionic liquids: evolving structure–property relationships and expanding applications. **Chemical Reviews**. In Press, 2015.

GREAVES, T. L., WEERAWARDENA, A., KRODKIEWSKA, I., DRUMMOND, C. J. Protic Ionic Liquids: Physicochemical Properties and Behavior as Amphiphile Self-Assembly Solvents. **Journal of Physical Chemistry**. v. 112, p.896-905, 2008.

GREAVES, T. L., DRUMMOND, C. J. Protic ionic liquids: Properties and applications. **Chemical Reviews**. v.108, p.206-237, 2008.

GREAVES, T. L., WEERAWARDENA, A., FONG, C.; KRODKIEWSKA, I., DRUMMOND, C. J. Protic ionic liquids: Solvents with turnable phase behavior and physicochemical properties. **Journal of Physical Chemistry**. v.110. p.22479-22487, 2006.

HARRISON M. D., ZHANG Z.; SHAND K., O'HARA I. M., DOHERTY W. O. S., DALE J. L. Effect of pretreatment on saccharification of sugar cane bagasse by complex and simple enzyme mixtures. **Bioresource Technology**, v.148. p.105-113, 2013.

HEMMASI, A. H., SAMARIHA, A., TABELI, A., NEMATI, M., KHAKIFIROOZ, A. Study of Morphological and Chemical Composition of Fibers from Iranian Sugarcane Bagasse. **American-Eurasian Journal of Agricultural. & Environmental Sciences**. v.11 (4), p. 478-481, 2011.

HIRAO, M., SUGIMOTO, H.; OHNO, H. Preparation of novel room-temperature molten salts by neutralization of amines. **Journal of The Electrochemical Society**. v.147. n.11. p.4168-4172, 2000.

HOFSETZ, K., SILVA, M. A. Brazilian sugarcane bagasse: Energy and non-energy consumption. **Biomass and Bioenergy**, v.46, p.564–573, 2012.

HOU, X., LI, N., ZONG, M. Facile and simple pretreatment of sugar cane bagasse without size reduction using renewable ionic liquids–water mixtures. **ACS - Sustainable Chemistry & Engineering**. v.1 (5), p. 519–526, 2013.

HUDDLESTON, J. G.; WILLAUER, H. D.; SWATLOSKI, R.P.; VISSER, A.E.; ROGERS, R.D. Room temperature ionic liquids as novel media for 'clean'liquid–liquid extraction. **Chemical Communications**. v.16. p.1765-1766, 1998.

HYMAN, D., SLUITER, A., CROCKER, D., JOHNSON, D., SLUITER, J., BLACK, S., SCARLATA, C. Determination of acid soluble lignin concentration curve by UV-Vis Spectroscopy. **National Renewable Energy Laboratory (NREL)**. p.1-13, 2007.

IGLESIAS, M., TORRES, A., GONZALES-OLMOS, R., SALVATIERRA, D. Effect of temperature on mixing thermodynamics of a new ionic liquid: {2-Hydroxy ethylammonium formate (2-HEAF) + short hydroxylic solvents}. **Journal of Chemical Thermodynamics**. v.40. p.119–133, 2008.

IGLESIAS, M., GONZALEZ-OLMOS, R., COTA, I.; MEDINA, F. Brønsted ionic liquids: Study of physico-chemical properties and catalytic activity in aldol condensations. **Chemical Engineering Journal**, v. 162, p. 802-08, 2010.

KAAR, W. E., BRINK, D. L. Summative analysis of nine common. North American woods. **Journal of Wood Chemistry and Technology**. v.11, p.479-494, 1991a.

KAAR, W. E., GOOL, L. G., MERRIMAN, M. M., BRINK, D. L. The complete analysis of wood polysaccharides using HPLC. **Journal of Wood Chemistry and Technology**. v.11, p.447-463, 1991b.

KOULLAS, D. P., CHRISTAKOPOULOS, P. F., KEKOS, D., KOUKIOS, E. G., MACRIS, B. J. Effect of alkali delignification on wheat straw saccharification by fusarium oxysporum cellulases. **Biomass Bioenergy**, p.9-13, 1992.

KURABI, A., BERLIN, A., GILKES, N., KILBURN, D., BURA, R., ROBINSON, J., MARKOV, A., SADDLER, J. Enzymatic Hydrolysis of SteamExploded and Ethanol Organosolv-Pretreated Douglas-Fir by Novel and Commercial Fungal Cellulases. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v.121-124. p.219-230, 2005.

LINDE, M., GALBE, M., ZACCHI, G. Simultaneous Saccharification and Fermentation of Steam-Pretreated Barley Straw. Lund University. 28th **Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals**. Nashville, Tennessee. 2006.

LUO, H., HUANG, J., DAI, S. Studies on thermal properties of selected aprotic and protic ionic liquids. **Separation Science and Technology**, v. 43, p. 2473-88, 2008.

LV, G., LI, Z., JIANG, W. T., CHANG, P. H., LIAO, L. Interlayer configuration of ionic liquids in a Ca-montmorillonite as evidenced by FTIR, TG-DTG, and XRD analyses. **Materials Chemistry and Physics**. v.162, p.417-424, 2015.

MÄKI-ARVELA, P., ANUGWOMA, I.; VIRTANENA, P.; SJÖHOLMA, R.; MIKKOLA, J. P. Dissolution of lignocellulosic materials and its constituents using ionic liquids—A review. **Industrial Crops and Products**. v.32, p.175–201, 2010.

MARTÍN, C., ROCHA, G. J. J. de M., SANTOS, J. R. A. dos, WANDERLEY, M. C. de A., GOUVEIA, E. R. Enzyme loading dependence of cellulose hydrolysis of sugarcane bagasse. **Química nova**. v.35, n.10, 2012.

MARTINS, L. H. da S., RABELO, S. C., COSTA, A. C. da. Effects of the pretreatment method on high solids enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of the cellulosic fraction of sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**. v.191, p 312-321, 2015.

MARTINS, L. F. **Caracterização do complexo celulásico de *Penicillium echinulatum***. Paraná: Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Paraná, 2005. Dissertação (Mestrado).

MATTEDI, S., MARTIN PASTOR, M.; IGLESIAS, M. Structural and aggregation study of protic ionic liquids. In: **International Congress on Advances in Applied Physics and Materials Science**, v. 1400, p. 154-58, 2011.

MEENATCHI, B., RENUGA, V., MANIKANDAN, A. Cellulose dissolution and regeneration using various imidazolium based protic ionic liquids. **Journal of Molecular Liquids**. Article in press, 2016.

MESA, L., LÓPEZ, N., CARA, C.; CASTRO, E., GONZÁLEZ, E. Techno-economic evaluation of strategies based on two steps organosolv pretreatment and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse for ethanol production. **Renewable Energy**. v.86. p.270-279, 2016.

MOHAN, D., PITTMAN Jr., C. U., STEELE, P. H. Pyrolysis of Wood/Biomass for Bio-oil: A Critical Review. **Energy Fuels**. v.20 (3), p. 848–889, 2006.

MONSCHEIN, M., NIDETZKY, B. Effect of pretreatment severity in continuous steam explosion on enzymatic conversion of wheat straw: Evidence from kinetic analysis of hydrolysis time courses. **Bioresource Technology**. v.200. p.287–296, 2016.

MORAIS, S. A. L. de, NASCIMENTO, E. A. do, MELO, D. C. de. Análise da madeira de *Pinus oocarpa* Parte I – Estudo dos constituintes macromoleculares e extrativos voláteis. **R. Árvore**, Viçosa-MG, v.29, n.3, p.461-470, 2005.

MOSIER, N. S., HENDRICKSON, R. AND DRESCHER R. Principles and economics of pretreating cellulose in water for ethanol production. Paper 103, **BIOT Division**, 225th American Chemical Society Meeting, New Orleans, 2003.

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

OLIVEIRA, C. C. dos S. de. **Otimização do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino a alta concentração de sólidos para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar**. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2012. Dissertação (Mestrado).

OLIVEIRA, de A., A., S. **Síntese e caracterização do líquido iônico tetrafluoroborato de 1-metil-3-(2,6-(S)-dimetiloct-2-eno)-imidazol com eletrólito para produção de hidrogênio via eletrólise da água**. Natal: Ciência e Engenharia de Petróleo, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2013. Dissertação (Mestrado).

OLIVER-BOURBIGOU, H., MAGNA, L., MORVAN, D. Ionic liquids and catalysis: Recent progress from knowledge to applications. **Applied Catalysis A: General**, v.373, p.1–56, 2010.

OSTENEN, A., OJALA, L. S., UUSI-KYYNY, P., PENTTILÄ, A., ALOPÆUS, V. A comprehensive study of CO₂ solubility in aqueous 2-HEAA and MEA+2-HEAA solutions – Measurements and modeling. **International Journal of Greenhouse Gas Control**. v.42, p.296–306, 2015.

PANDEY, A., SOCCOL, C.R., NIGAM, P., SOCCOL, V.T. Biotechnological potential of agro-industrial residues I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, n.74, p.69-80, 2000.

PERES, S. **Gás do bagaço de cana: um combustível substituto do gás natural**. In XV SNPTEE Seminário Nacional de Produção e Transmissão de Energia Elétrica. Foz do Iguaçu, 1999.

PINTO, R. R., SANTOS, D., MATTEDI, S., AZNAR, M. Density, refractive index, apparent volumes and excess molar volumes of four protic ionic liquids + water at t=298.15 and 323.15 K. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 32, n. 03, 2015.

QUINTERO, J. A., RINCÓN, L. E., CARDONA, C. A. Production of bioethanol from agroindustrial residues as feedstocks. Cap. 11. **Biofuels - Alternative Feedstocks and conversion processes**. p.251-285, 2011.

RAJ T., GAUR, R. DIXIT, P., GUPTA, R. P., KAGDIYAL, V., KUMAR, R., TULI, D. K. Ionic liquid pretreatment of biomass for sugars production: driving factors with a plausible mechanism for higher enzymatic digestibility. **Carbohydrate Polymers**. v. 149, p. 369-381, 2016.

RABELO, S. C. **Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração**. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2010. Tese (Doutorado).

RASHID, T., KAIT, C. F., REGUPATHI, I., MURUGESAN, T. Dissolution of kraft lignin using Protic Ionic Liquids and characterization. **Industrial Crops and Products**, v. 84, p.284–293, 2016.

REDDY, P. A critical review of ionic liquids for the pretreatment of lignocellulosic biomass. **South African Journal of Science**. v. 111, n. 11/12, 2015.

REIN, P. W. Prospects for the conversion of a sugar mill into a biorefinery. **Proceedings - International Society of SugarCane Technologists**, XXVI Congress, International Society of Sugar Cane Technologists. p.44-60, 2007.

REIS, C. L. B., SILVA, L. M. A. e, RODRIGUES, T. H. S., FÉLIX, A. K. N., SANTIAGO-AGUIAR, R. S. de, CANUTO, K. M., ROCHA, M. V. P Pretreatment of cashew apple bagasse using protic ionic liquids: Enhanced enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**. In Press, 2016.

ROCHA, E. G. de A. **Síntese, caracterização, uso e reciclo de líquidos iônicos práticos no pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar visando à produção de etanol de segunda geração**. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2016. Tese (Doutorado).

ROCHA, G. J. de M., NASCIMENTO, V. M., GONÇALVES, A. R., SILVA, V., F., N., MARTÍN, C. Influence of mixed sugarcane bagasse samples evaluated by elemental and physical–chemical composition. **Industrial Crops and Products**. 64, p.52–58, 2015.

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

SANCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**. v.27. p.185–194, 2009.

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

SANTOS, J. R. A. dos, GOUVEIA, E. R. Produção de bioetanol de bagaço de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.11, n.1, p.27-33, 2009.

SCREMIN, F. R. **Líquidos iônicos eletropolimerizáveis**. São Paulo: Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 2013. Tese (Doutorado).

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

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

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

SLUITER, J. B., CHUM, H., GOMES, A. C., TAVARES, R.A P., AZEVEDO, V., PIMENTA, M. T. B., RABELO, S.C., MARABEZI, K., CURVELO, A. A. S., ALVES, A. R., GARCIA, W. T., CARVALHO, W., ESTEVES, P. J., MENDONÇA, S., OLIVEIRA, P. A., RIBEIRO, J. A. A., MENDES, T. D., VICENTIN, M. P., DUARTE, C. L., MORI, M. N. Evaluation of Brazilian Sugarcane Bagasse Characterization: An Interlaboratory Comparison Study. **Journal of AOAC International**, p. 7, 2016.

SLUITER, A., HAMES, B., RUIZ, R., SCARLATA, C., SLUITER, J., TEMPLETON, D., CROCKER, D. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. **National Renewable Energy Laboratory** (NREL). p. 1-16, 2008a.

SLUITER, A., HAMES, B., RUIZ, R. SCARLATA, C.; SLUITER, J. TEMPLETON, D. Determination of Sugars, Byproducts, and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples. **National Renewable Energy Laboratory** (NREL). p. 1-14, 2008b.

SLUITER, A., HAMES, B., RUIZ, R. SCARLATA, C., SLUITER, J. TEMPLETON, D. Determination of Extractives in Biomass. **National Renewable Energy Laboratory** (NREL), p. 1-12, 2005.

SOARES, L. C. S. R. **Destoxificação biológica do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar para utilização em processos fermentativos**. Lorena: Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2012. Dissertação (Mestrado).

SOUZA, O., SANTOS, I. E. **Aproveitamento do bagaço de cana-de-açúcar pelos ruminantes. Comunicado técnico**. ISSN 1678 – 1937. MAPA, 2002.

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

SWATLOSKI, R.P., SPEAR, S.K., HOLBREY, J.D. ROGERS, R.D., Dissolution of cellulose with ionic liquids. **Journal of the American Chemical Society**. 124, 4974–4975, 2002.

TADESSE, H. LUQUE, R. Advances on biomass pretreatment using ionic liquids: An overview. **Energy Environmental Science**. v.4, p.3913, 2011.

TAN, S. S. Y., MACFARLANE, D. R., UPFAL, J., EDYE, L. A., DOHERTY, W. O. S., PATTI, A. F., PRINGLE, J. M., SCOTT, J. L. Extraction of lignin from lignocellulose at atmospheric pressure using alkylbenzenesulfonate ionic liquid. **Green Chemistry**, v.11, p.339-345, 2009.

TEMPLETON, D., EHRMAN, T. Determination of Acid-Insoluble Lignin in Biomass. **National Renewable Energy Laboratory** (NREL), 1-14, 1995.

THOMAS, S., PAUL, S. A., POTHAN, L. A., DEEPA, B. Natural fibres: structure, properties and applications. Chapter 1. In: KAITH, B. S., KAUR, I. **Cellulose Fibers: Bio and Nano-Polymer Composites. Green Chemistry Technology.** Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011.

TRAJANO, H. L., ENGLE, N. L., FOSTON, M., RAGAUSKAS, A. J., TSCHAPLINSKI, T. J., WYMAN, C. H. The rate of lignin during hydrothermal pretreatment. **Biotechnology for Biofuels.** v.6, n.110, 2013.

TRINH, L. T. P., LEE, Y. J., LEE, J. W., LEE, H. J. Characterization of ionic liquid pretreatment and the bioconversion of pretreated mixed softwood biomass. **Biomass and bioenergy.** 8:1, 2015.

UJU, ABE, K., UEMURA, N. OSHIMA, T., GOTO, M., KAMIYA, N. Peracetic acid–ionic liquid pretreatment to enhance enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology.** v.138, p.87–94, 2013.

VERDÍA, P., BRANDT, A., HALLET, J., RAY, M. J., WELTON, T. Fractionation of lignocellulosic biomass with the ionic liquid 1-butylimidazolium hydrogen sulfate. **Green Chemistry.** v.16. p.1617-1627, 2014.

WANG, C., YAN, D.; LI, Q., SUN, W., XING, J. Ionic liquid pretreatment to increase succinic acid production from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology.** v.172, p.283–289, 2014.

WOOD, T. M., BHAT, K. M. Methods for measuring cellulase activities. *Methods in enzymology.* **California: Academic Press,** v.160, p.87-116, 1988.

WU, H., MORA-PALE, M., MIAO, J., DOHERTY, T. V., LINHARDT, R. J., DORDICK, J. S. Facile Pretreatment of Lignocellulosic Biomass at High Loadings in Room Temperature Ionic Liquids. **Biotechnology and Bioengineering,** v. 108, n. 12, 2011.

WYMAN, C. E., DECKER, S. R., HIMMEL, M. E., BRADY, J. W., SKOPEC, C. E., VIIKARI, L. Hydrolysis of cellulose and hemicellulose. **Polysaccharides: structural diversity and functional versatility.** v.1, p.1023-1062, 2005.

YAN, B., LI, K.; WEI, L.; MA, Y.; SHAO, G.; ZHAO, D., WAN, W., SONG, L. Understanding lignin treatment in dialkylimidazolium-based ionic liquid–water mixtures. **Bioresource Technology.** v.196, p.509–517, 2015.

YOON, L. W., ANG, T. N., NGOH, G. C., CHUA, A. S. M. Regression analysis on ionic liquid pretreatment of sugarcane bagasse and assessment of structural changes. **Biomass and bioenergy**. v.36, p.160-169, 2012.

ZHENG, Y., ZHONGLI, P., ZHANG, R. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. **International Journal of Agricultural and Biological Engineering**. v.2. n.3. 2009.

APÊNDICE A - Caracterização dos LIPs

1. Densidade

Medida utilizando densímetro Anton Paar DMA- 5000 com tubo em formato de U, precisão de $0,0001 \text{ g/cm}^3$ e variação de $0,3^\circ\text{C}$ em sua temperatura interna. A faixa de temperatura verificada foi de 25°C .

2. Viscosidade

Medida em viscosímetro de rolamento automático de esfera da Anton Paar, modelo SVM 3000, caLIPar número 4.0 e esfera de 3.0 mm. Entre 30 e 60°C foi a temperatura do intervalo de estudo de viscosidade.

3. pH

Utilizou-se pHmetro da marca Digimed, modelo DM-22, utilizado em temperatura ambiente.

4. TG (Temperatura de degradação)

Foi utilizada uma faixa de 25 a 400°C , com taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$ e vazão de $50\text{mL}/\text{min}$, sob uma atmosfera inerte de nitrogênio e usando analisador termogravimétrico da marca Shimadzu, modelo TGA 50M. A amostra de aproximadamente 15 mg foi pesada em balança microanalítica (precisão de $0.1\mu\text{g}$) da marca Mettler Toledo, modelo MX5.

5. RMN

Foram realizadas análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de carbono-13 (^{13}C) e hidrogênio (^1H) em espectrômetro Bruker, modelo Avance DPX-250 MHz. Para os experimentos de RMN, a preparação das amostras consistiu em dissolver 20 mg em $0,5 \text{ mL}$ de água deuterada. Após a completa diluição do LI no

solvente, a solução foi transferida para o tubo de 5 mm padrão de RMN e inserida no equipamento.

APÊNDICE B - Análises de caracterização do bagaço de cana-de-açúcar

A caracterização química da biomassa foi realizada segundo Sluiter *et al.*(2016).

1. Determinação do teor de umidade

Esta análise tem por objetivo medir a quantidade de água, a 105°C, na amostra de bagaço. O teor de umidade é calculado utilizando o analisador de umidade por infravermelho, (GEHAKA - IV2000). A balança é tarada e são pesados aproximadamente 0,5 g do material e determinada à porcentagem de umidade no final do tempo.

O cálculo para a quantidade de material úmido, a ser usado nos ensaios experimentais é determinado pela seguinte Equação 3:

$$\text{Material}_{\text{úmido}} \text{ (g)} = \frac{\text{Material}_{\text{seco}} \text{ (g)} \times 100}{100 - \text{umidade}(\%)} \quad (3)$$

2. Determinação do teor de cinzas

Com o objetivo de quantificar o material inorgânico da amostra, este procedimento foi empregado nas análises da biomassa *in natura* e pré-tratada, e consistiu nas etapas seguintes.

Os cadinhos foram levados à estufa por 3 h e posteriormente colocados em um dessecador para serem pesados quando resfriados (M_1). Nos cadinhos devidamente pesados são colocados cerca de 2,0 g da amostra descontando o teor da umidade (M_2).

Os cadinhos foram levados para a mufla e a calcinação foi programada em três rampas de aquecimento. A primeira sequência a mufla está a 105°C por 18 minutos, seguidos de 250°C por 37 minutos e por fim, 575°C por 3 horas e 20 minutos. Após o resfriamento da mufla, os cadinhos foram transferidos para a estufa por 3h, em seguida levados a um dessecador para resfriamento e, posteriormente,

efetuada a pesagem em uma balança analítica, tendo suas massas devidamente anotadas (M_3).

O teor de cinzas foi calculado a partir da Equação 4:

$$\text{Teor de cinzas (\%)} = \frac{M_3 - M_1}{M_2} \quad (4)$$

3. Determinação de extrativos

A análise de extrativos tem por finalidade remover o material não estrutural da biomassa antes da quantificação da lignina e dos carboidratos, para que não haja interferência nestas etapas. Essa análise é realizada somente no bagaço *in natura* e está baseada na norma NREL “Determination of Extractives in Biomass” (SLUITER *et al*, 2005) e adaptada por RABELO (2010).

Foram pesados 3 gramas de bagaço (em base seca) (M_1) dentro de cartuchos feitos a partir de papel de filtro. Os cartuchos são inseridos individualmente em cada Soxhlet e são adicionados 190,0 mL de álcool etílico em cada balão de vidro do extrator juntamente com pedras de ebulição.

O banho de refrigeração para circulação da água nos condensadores do sistema é ajustado para 10 °C e as placas de aquecimento do Soxhlet são ajustadas para fornecer pelo menos 10 sifonações por hora, e manter o ciclo de extração para que o solvente em torno do cartucho de extração se torne incolor, regulando os mantos de aquecimento se necessário.

Por fim, há transferência dos sólidos para cadinhos de filtração (M_2) com placa porosa, já devidamente secos e pesados. O material é lavado com 100 mL de etanol, com filtração a vácuo, e posterior secagem em estufa a 105 °C até a obtenção de uma massa constante (M_3).

Para o cálculo de extrativos é utilizado a seguinte Equação 5:

$$\text{Extrativos (\%)} = \frac{M_1 - (M_3 - M_2)}{M_1} \times 100 \quad (5)$$

4. Determinação de carboidratos, lignina total, grupo acetil, furfural e 5-hidroximetilfurfural

As análises seguintes tem como objetivo a determinação de xilose, arabinose, glicose, celobiose, lignina solúvel e insolúvel e serão baseadas nos procedimentos padrões do NREL “Determination of Acid Soluble Lignin Concentration Curve by UV-Vis-Spectroscopy (HYMAN *et al*, 2007), “Determination of Acid-Insoluble Lignin in Biomass” (TEMPLETON e EHRMAN, 1995), “Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass” (SLUITER *et al.*, 2008a), “Determination of Sugars, Byproducts and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples (SLUITER *et al*, 2008b), nas normas ASTM “Determination of Carbohydrates in Biomass by High Performance Liquid Chromatography” (ASTM E1758, 1996) e “Test Method for the Determination of Acid-Insoluble Residue in Biomass” (ASTM E1721, 1995). As análises de quantificação foram realizadas em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC), modelo 1260 da marca Infinity HPLC Agilent Technologies com detector de índice de refração IR e DAD UV-Vis.

5. Hidrólise ácida

Para a realização dos experimentos, de acordo com as normas citadas anteriormente, foi necessário que o bagaço esteja livre de extrativos, tenha umidade menor que 10% e esteja moído a uma granulometria de 0,08mm.

Foi pesado 0,3 g de amostra de bagaço em tubos de ensaio e adicionou 3,0 mL de ácido sulfúrico a 72% (m/m) em cada tubo. Os tubos foram encubados em um banho termostático a 30°C por 1 h. A cada 10 minutos, os conteúdos nos tubos foram homogeneizados com a ajuda de um bastão de vidro, sem remover os tubos do banho, a fim de garantir uma hidrólise homogênea.

Após este tempo, foram adicionados 84 mL de água destilada e os tubos foram fechados, e autoclavados a 121°C por 1 hora, com a finalidade de hidrolisar totalmente os oligômeros formados. Posteriormente, os frascos foram retirados da autoclave e resfriados a temperatura ambiente para ser filtrado á vácuo em cadinho de filtração, previamente seco e pesado. O conteúdo filtrado foi analisado

posteriormente quanto à lignina solúvel, furfural, 5-hidroximetilfurfural, grupo acetil e carboidratos e o material retido no cadinho, por sua vez, é utilizado para analisar a lignina insolúvel.

6. Determinação de lignina solúvel

A determinação da lignina solúvel foi determinada por medida de absorvância em espectrofotômetro UV-visível em cubeta de quartzo e a 280nm. Cada hidrolisado ácido foi diluído de acordo com sua coloração para balões volumétricos de 100 mL que devem ser aferidos com água destilada.

Segue a Equação 6 para o cálculo de teor de lignina solúvel:

$$\text{Teor de lignina solúvel (\%)} = \left(\frac{C_{\text{ls}} \cdot V_f \cdot \text{FD}}{M_a} \right) * 100 \quad (6)$$

$$C_{\text{ls}} = (41,87 \cdot (A_T - A_{\text{PD}}) - 0,3279) \cdot 10^{-3} \quad \text{e} \quad A_{\text{PD}} = C_1 \varepsilon_1 + C_2 \varepsilon_2$$

Onde:

A_T - absorvância da solução de lignina junto com os produtos de degradação, em 280 nm;

A_{PD} - absorvância, a 280 nm, dos produtos de decomposição dos açúcares (furfural e HMF), calculada através da Equação 4, cujas concentrações C_1 e C_2 serão determinadas previamente por CLAE e ε_1 e ε_2 são as absortividades de furfural e HMF (146,85 e 114,00 $\text{Lg}^{-1}\text{cm}^{-1}$), determinadas experimentalmente (HYMAN *et al.*, 2007);

C_{ls} - concentração de lignina solúvel, em g/L;

V_f - Volume do hidrolisado filtrado, 0,084 L;

FD - fator de diluição do hidrolisado;

M_a - massa do bagaço utilizando na hidrólise, em gramas.

7. Determinação de Lignina Klason (insolúvel)

Após a filtração realizada no item 4.1 deste apêndice, o material retido no cadinho de filtração foi lavado com água destilada. Após esse procedimento, o

material retido no filtro foi colocado em uma estufa a 100°C até massa constante. Em seguida, este foi removido da estufa e deixado em dessecador até temperatura ambiente, para posteriormente ser pesado.

Uma fração desse material insolúvel é constituído de cinzas e para não haver uma superestimação dos dados de lignina insolúvel, o teor de cinzas foi determinado para o material, segundo o item 2 (Apêndice B), e assim descontado do valor de lignina insolúvel obtida.

O cálculo do teor de lignina insolúvel segue na Equação 7:

$$\text{Teor de lignina insolúvel } (\%) = \left(\frac{M_{c+l} - M_c}{M_a} \right) \times 100 - \text{cinzas } (\%) \quad (7)$$

Onde:

M_{c+l} – Massa do cadinho + lignina insolúvel seca, em gramas;

M_c – Massa do cadinho, em gramas;

M_a – Massa da amostra seca, em gramas.

8. Determinação de carboidratos

Os açúcares celobiose, xilose, glicose e arabinose, presentes no filtrado da hidrólise ácida, item 4.1 deste apêndice, têm seus teores determinados por HPLC. Além disso, as amostras provenientes da hidrólise enzimática também têm seus açúcares quantificados.

No HPLC foi utilizado uma coluna BioRad Aminex, HPX87H, equipada com pré-coluna no em detector RID. As condições de análise são: Volume de injeção de 15 µL; Fase móvel de H₂SO₄ 0,01N desgaseificada; Taxa de fluxo de 0,6 mL/min; Tempo de corrida de 13 minutos; Temperatura de RID e forno da coluna de 35°C para ambas.

Para as amostras de caracterização, foram filtrados 2 mL diretamente em vials utilizando membrana de celulose com poros de 0,22 µm (JetBiofil). Já para as amostras de hidrólise enzimática, os tubos de eppendorf foram centrifugados (Catel, NT810) a 3280 rpm por 10 minutos. Após o termino da centrifugação, o sobrenadante foi filtrado utilizando a membrana de celulos com poros de 0,22 µm e

diluídas em água MiliQ, na proporção de 1:4 (v/v), para que não ocorra extrapolação da curva de calibração.

As curvas de calibração são previamente determinadas com amostras de D-(+) celobiose, D-glicose, D-xilose, D-arabinose com concentrações conhecidas de 4g/L para a hidrólise ácida, e na hidrólise enzimática as concentrações são respectivamente 10, 20, 10 e 5 g/L.

As concentrações dos açúcares estudados foram obtidas pela correlação entre as áreas dos cromatogramas e suas respectivas curvas padrão. Para os cálculos de concentração, foi utilizada a Equação 8:

$$\text{Açúcares}_{(\%)} = \left(\frac{C_{\text{CLAE}} \cdot \text{CA} \cdot V_{\text{filtrado}}}{M_1} \right) \cdot 100 \quad (8)$$

Onde:

C_{HPLC} - concentração do açúcar quantificado por HPLC, em g/L;

CA - anidro correção para calcular a concentração polimérica dos açúcares dada a concentração monomérica dos açúcares. Para a glicose, celobiose, xilose e arabinose temos, 0,90; 0,95; 0,88 e 0,88, respectivamente (KAAR e BRINK, 1991a; KAAR *et al.*, 1991b).;

V_{filtrado} - volume do hidrolisado filtrado, 0,087 L;

M_1 - massa do bagaço utilizando na hidrólise, descontado o teor de umidade, em g.

9. Determinação de furfural e 5-hidroximetilfurfural

Para análise de furfural e 5-hidroximetilfurfural (HMF) foi utilizada uma coluna Nova-Pak C18, 4 μm (Waters) e detector DAD. As condições de análise são: Volume de injeção de 20 μL ; Fase móvel de acetonitrila/água (1:8 com 1% de ácido acético) desgaseificada; Taxa de fluxo de 0,8 mL/min; Tempo de corrida de 10 minutos; Temperatura de DAD e forno da coluna são ambiente e 30°C, respectivamente; Comprimento de onda de 280 nm.

As áreas dos picos correspondentes ao furfural e 5-hidroximetilfurfural são utilizados para calcular suas concentrações na amostra com base na curva de calibração feita em concentrações de 0,1 a 0,01 g/L, respectivamente. Além disso,

os fatores de conversão utilizados para o furfural é 1,37 e o 5-hidroximetilfurfural é 1,29.

Para os cálculos das concentrações, são utilizadas as Equação 9 e 10:

$$\text{Furfural}_{(\%)} = \left(\frac{C_{\text{HPLC}} \cdot \text{FC} \cdot V_{\text{filtrado}}}{M_1} \right) \cdot 100 \quad (9)$$

Onde:

C_{HPLC} - concentração de furfural quantificado por HPLC, em g/L;

FC - fator de conversão do furfural, 1,37;

V_{filtrado} - volume do hidrolisado filtrado, 0,084 L;

M_1 - massa do bagaço utilizado na hidrólise descontado o teor de umidade, em grama.

$$\text{HMF}_{(\%)} = \left(\frac{C_{\text{HPLC}} \cdot \text{FC} \cdot V_{\text{filtrado}}}{M_1} \right) \cdot 100 \quad (10)$$

Onde:

C_{HPLC} - concentração de ácido acético quantificado por HPLC, em g/L;

FC - fator de conversão do 5-hidroximetilfurfural, 1,20;

V_{filtrado} - volume do hidrolisado filtrado, 0,087L;

M_1 - massa do bagaço utilizado na hidrólise descontado o teor de umidade, em grama.

10. Determinação do grupo acetil

O ácido acético será quantificado através da coluna ácida Biorad Aminex, HPX87H, equipada com uma pré-coluna no detector RID. As condições de análise são: Volume de injeção de 15 μL ; Fase móvel de H_2SO_4 0,01N desgaseificada; Taxa de fluxo de 0,6 mL/min; Tempo de corrida de 18 minutos; Temperatura de RID e forno da coluna de 30 e 35°C, respectivamente.

As áreas obtidas pelo cromatograma, correspondentes ao ácido acético, são utilizadas para calcular a concentração dos grupos acetil com base na curva de calibração feita na concentração de 4g/L de ácido acético. Além disso, é necessário

o fator de conversão de 0,72, utilizado para transformar o teor de ácido acético em acetato (KAAR e BRINK, 1991a; KAAR *et al.*, 1991b).

Para os cálculos foi utilizada a Equação 11 abaixo:

$$\text{Acetato}_{(\%)} = \left(\frac{C_{\text{HPLC}} \cdot \text{FC} \cdot V_{\text{filtrado}}}{M_1} \right) \cdot 100 \quad (11)$$

Onde:

C_{HPLC} - concentração de ácido acético quantificado por HPLC, em g/L;

FC - fator de conversão do ácido acético, 0,72;

V_{filtrado} - volume do hidrolisado filtrado, 0,087 L;

M_1 - massa do bagaço utilizado na hidrólise descontado o teor de umidade, em grama.

11. Lignina insolúvel do licor de pré-tratamento

O licor disponível após o pré-tratamento e já com a adição do antissolvente (água) foi levado para centrifuga por 10 minutos a uma rotação de 3060g. O sobrenadante foi armazenado em frasco plástico e mantido sob refrigeração para posterior análise, caso necessário.

O precipitado foi lavado com água destilada e centrifugado até a retirada total de resíduos do licor (por exemplo, LIP) e em seguida levado para estufa a uma temperatura média de 75°C até sua secagem completa para a sua pesagem e assim se obter a massa (lignina insolúvel).

A lignina insolúvel é baseada na quantidade de biomassa *in natura* em base seca utilizada no pré-tratamento.

APÊNDICE C - Atividade enzimática

A atividade enzimática da enzima é determinada de acordo com a metodologia de Ghose (1987), Wood *et al.* (1988) e Adney e Baker (1996), conforme recomendado pela IUPAC.

A análise de proteína total da enzima é determinada de acordo com a metodologia de Bradford (1976).

1. Solução tampão

Para o preparo do tampão citrato 0,05 mol/L pH 4,8, 10,5 g de ácido cítrico monohidratado foram dissolvidos em 37,5 mL de água destilada. Em seguida, foi adicionado hidróxido de sódio até que a solução atinja o pH de 4,3. O volume da solução é completado para 50 mL e, em seguida, mede-se o pH. Quando necessário mais hidróxido de sódio é adicionado à solução para que o pH atinja 4,5 e, assim, obtenha-se uma solução tampão de citrato pH 4,5 a 1 mol/L. Para obter a concentração de 0,05 mol/L, a solução de 50 mL será transferida para um balão volumétrico de 1 L, que tem seu volume aferido com água destilada. Neste momento, o pH deve subir para 4,8.

2. Reagente DNS (ácido dinitro-3,5-salicílico)

Descrita por RABELO, (2010), para preparar a solução DNS foi necessário dissolver 10,6 g de reagente DNS e 19,8 g de NaOH em 1000 mL de água destilada. Adicionou-se 7,6 mL de fenol fundido a 50 °C e 8,3 g de metabisulfito de sódio. O material foi filtrado com papel de filtro Whatman nº 1, em seguida foi transferido o reagente em um frasco âmbar e estocou sob refrigeração.

Na determinação dos açúcares redutores totais (ART), foi transferido 100 mL do reagente de DNS para um béquer, adicionou-se 30,6 g de tartarato de sódio e potássio e dissolveu o material com agitação e leve aquecimento. Em seguida aferiu o volume com água destilada para 141,6 mL, filtrou o material com papel de

filtro Whatman nº 1, e identificou o frasco como solução padrão de DNS para posterior utilização na atividade enzimática.

3. Reagente de Brandford

O reagente de Brandford foi preparado pela diluição de 100 mg do corante Brilliant Blue BG-250 em 50 mL de etanol 95%, em seguida foram adicionados 100 mL de ácido fosfórico 85% (m/v) e a mistura foi diluída em 1 L.

4. Atividade da celulase

Para essa análise, foi utilizada a solução tampão e reagente DNS (item 1 e 2 deste apêndice), para determinação dos açúcares redutores totais (ART) utilizadas para a quantificação destes açúcares liberados durante a análise da atividade enzimática da celulase.

Também foi construída uma curva analítica de glicose, com concentrações de 0,00 até 2,50 mg/mL de glicose. Foi realizada a leitura das amostras em espectrofotômetro a 540 nm após a aplicação do método DNS, para que seja possível obter um gráfico linear da concentração de glicose (açúcar redutor) em função da absorbância.

A atividade da celulase é determinada como unidade de papel de filtro (Filter Paper Unit – FPU). A reação foi realizada em tubos de ensaio em que são adicionados 1,0 mL do tampão citrato, 50 mg de papel de filtro e 0,5 mL da enzima em diferentes diluições. Os tubos foram incubados em banho termostático a 50°C por 60 minutos. Após o final da reação é aplicado o método DNS em cada amostra e realizada a leitura em espectrofotômetro a 540 nm. Uma vez obtidas as leituras de absorbância, foi possível determinar a concentração de ART liberado pela enzima, calculada através da curva analítica de glicose, previamente obtida.

Para cálculo da atividade da celulase, foi utilizada a seguinte Equação 12 (GHOSE, 1987):

$$\text{FPU/mL} = \frac{2,0}{(0,18016,0,5,60.[\text{fator de diluição da enzima}])} \mu\text{mol. min}^{-1} . \text{mL}^{-1}$$

$$\text{FPU/mL} = \frac{0,037}{[\text{fator de diluição da enzima}]} \quad (12)$$

Para a celulase, uma unidade da atividade de enzima (FPU) é baseada na liberação de exatamente 2,0 mg de glicose equivalente, isto é, 2,0/0,18016 μmol de 50 mg de papel de filtro por 0,5 mL de enzima diluída em 60 minutos de reação.

5. Proteína total do complexo hemicelulolítico

A proteína total foi realizada pelo método de calorimétrico de Bradford. Para esta análise foi utilizado o reagente de Bradford (item 3 deste apêndice), no qual foram adicionados 3 mL do reagente a 0,3 mL da solução protéica. Em seguida, a absorbância da solução foi medida no comprimento de onda de 595 nm no espectrofotômetro UV-1203 – Shimadzu.

A concentração das proteínas foi determinada utilizando uma curva de calibração baseada em Albumina de soro bovina - Sigma A-2153 com a adição de 2,1% de água destilada como padrão.

Para o cálculo da determinação da concentração de proteína foi utilizada a Equação (13) abaixo.

$$\text{CP} = \frac{\text{ABS}-b-(\text{BE})}{a} \times D \quad (13)$$

Onde:

CP – concentração de proteína em mg/mL;

ABS – absorbância;

b – coeficiente linear da curva padrão de Bradford;

a – coeficiente angular da curva padrão de Bradford;

BE – absorbância do branco da enzima;

D – diluição do extrato enzimático.

APÊNDICE D - Cálculo de rendimentos do pré-tratamento, conversão e de rendimento global da hidrólise.

Os cálculos de rendimentos das etapas de pré-tratamento, conversão e de rendimento global da hidrólise são calculados com base a metodologia adotada por Rabelo (2010).

O rendimento do pré-tratamento foi calculado com a comparação do bagaço em base seca (g) que entra no reator (antes do pré-tratamento) com o bagaço final obtido após o pré-tratamento.

A conversão de celulose em glicose e de hemiceluloses em xiloses foi calculada após a determinação da composição química do material subsequente à etapa de pré-tratamento (caracterização do material pré-tratado) e à quantificação dos açúcares presentes no meio reacional após a hidrólise enzimática (Equação 14). Para o fator de conversão da celulose é considerado 0,9.

$$\text{Conversão(\%)} = \frac{\text{Concentração de açúcar} \times 0,9}{\text{Concentração de celulose após pré-tratamento}} \times 100 \quad (14)$$

Já o rendimento global da hidrólise foi calculado a partir da quantidade de glicose ou xilose obtida após hidrólise em comparação com a glicose ou xilose disponível no bagaço antes do pré-tratamento.