



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

THAYNARA CORADINI PIN

**BIORREFINARIA LIGNOCELULÓSICA EMPREGANDO LÍQUIDOS IÔNICOS
PRÓTICOS PARA PRODUÇÃO DE ETANOL E LIGNINA**

Campinas
2021

THAYNARA CORADINI PIN

BIORREFINARIA LIGNOCELULÓSICA EMPREGANDO LÍQUIDOS IÔNICOS
PRÓTICOS PARA PRODUÇÃO DE ETANOL E LIGNINA

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

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

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA
ALUNA THAYNARA CORADINI PIN, E
ORIENTADA PELO PROF^a. DR^a. ALINE
CARVALHO DA COSTA

Campinas

2021

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

P65b Pin, Thaynara Coradini, 1990-
Biorrefinaria lignocelulósica empregando líquidos iônicos próticos para produção de etanol e lignina / Thaynara Coradini Pin. – Campinas, SP : [s.n.], 2021.

Orientador: Aline Carvalho da Costa.

Coorientador: Sarita Cândida Rabelo.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Líquidos iônicos. 2. Lignina. 3. Caracterização estrutural. 4. Bagaço de cana. 5. Biomassa. 6. Etanol 2G. 7. Hidrólise enzimática. I. Costa, Aline Carvalho da, 1970-. II. Rabelo, Sarita Cândida, 1980-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Lignocellulosic biorefinery using protic ionic liquids for ethanol and lignin production

Palavras-chave em inglês:

Ionic liquids

Lignin

Structural characterization

Sugarcane bagasse

Biomass

2G Ethanol

Enzymatic hydrolysis

Área de concentração: Engenharia Química

Titulação: Doutora em Engenharia Química

Banca examinadora:

Aline Carvalho da Costa [Orientador]

Silvana Mattedi e Silva

Adilson Roberto Gonçalves

Michel Brienzo

Simone Coelho Nakanishi

Data de defesa: 16-09-2021

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-9597-1234>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/3396113160063398>

Folha de aprovada da Defesa de Tese de Doutorado defendida por Thaynara Coradini Pin, aprovada em 16 de setembro de 2021, pela banca examinadora constituída pelos doutores:

Profª Dr.ª Aline Carvalho da Costa – Presidente e Orientadora
FEQ/UNICAMP
Videdoconferência

Profª Drª Silvana Mattedi e Silva - Externa
DEQ/UFBA
Videdoconferência

Profº Drº Adilson Roberto Gonçalves - Externo
IPBEN/UNESP
Videdoconferência

Profº Drº Michel Brienzo - Externo
IPBEN/UNESP
Videdoconferência

Drª Simone Coelho Nakanishi – Externa
LNBR/CNPEM
Videdoconferência

ATA da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Dedico esse trabalho a minha mãe,
Marinete, que sempre me incentivou a
estudar e me desafiar. Eu levei tão a sério
que estou me tornando doutora.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradecer a Deus pelos direcionamentos, paciência e sabedoria ao longo desses anos para concluir essa etapa da minha vida.

Ao meu pai, Pin, e meu irmão, Arthur, pelo suporte, amor e compreensão mesmo na distância e minha família em geral, tios, tias e avó, que de alguma forma deram suporte do jeito que eles conseguiram e mesmo longe sempre estavam a disposição para ajudar.

Ao meu marido Jáder, pelo amor, incentivo, paciência, compreensão e tudo que envolva ser uma pessoa zen para aguentar minhas montanhas russas que envolviam desde risos de felicidade até surtos de desespero que terminavam comigo dormindo 12h seguidas ou procrastinação ativa limpando cada canto do apartamento.

As minhas orientadoras, Dr^a Aline e Dr^a Sarita pela grande oportunidade, orientação/direcionamentos e confiança ao longo desse trabalho, e principalmente o aprendizado. Foi uma troca enorme.

A todo o grupo do LEPFE/UNICAMP que fez parte desses anos e me ajudaram com dicas e ajudas nos experimentos, mas em especial Pedro e Dani que estavam sempre ao meu lado me ensinando, julgando e sempre parceiros do dia a dia.

A toda equipe do LNBR/CNPEM, Tati, Fer, Dani e Edilaine pela amizade e disposição em tornar o nosso local de trabalho um ambiente agradável, além de Vivi, Livia e Mirella pelas risadas, companhias e discussões de lignina. Vocês fizeram meus dias mais interessantes digamos assim.

Aos amigos que fiz pela FEQ que de alguma forma contribuíram para desenvolvimento do meu trabalho e que vou levar a amizade para sempre. Em especial Henrique, Daniel, Kathleen e Julcelly (essa já conheço há mais de 10 anos) que fizeram meus dias mais leves e sinceros no meio desses tantos desafios.

A todo o grupo do Dr. Arthur Ragauskas na UTK e no ORNL pela disposição, conversas e discussões em tornar o local de trabalho um ambiente agradável e mais leve em meio a muitos experimentos e artigos.

A galera de Knoxville/EUA, Erick, Matheus e Lu e sua família. Obrigada pelas comidas, passeios, coronas e blue moons, em especial Erick pelo acolhimento em boa parte da minha estadia na cidade e pelos nossos desabafos regados a muitas cervejas, rivotril e vinhos da

corujinha. Vocês são especiais e fizeram diferença nos resultados da minha tese, seja pra bom ou não rs.

As meninas que me deram uma calcinha escrita lignina no chá de lingerie. Naquele momento vocês fizeram eu entender o quanto eu estava sendo desafiada nesse doutorado e me fizeram lembrar também o quanto eu desejava terminar esse desafio e pegar o título. Guardo ela até hoje!

A meus remédios de ansiedade que fizeram o final do meu doutorado menos ansioso e desesperador.

FEQ/UNICAMP, LNBR/CNPEM, LNBIO/CNPEM (nº 22872) UTK e JIBS/ORNL pela infraestrutura e todos os funcionários ali envolvidos direto e indiretamente.

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (capes) – código de financiamento 001, e o Programa Santander de Mobilidade Internacional (nº 031/2018).

A todos que de alguma forma contribuíram para o meu progresso pessoal e profissional, muito obrigada!

*Nunca quis prejudicar ninguém,
só quis fazer o meu.
Fiz o que deu e fui feliz.*

RESUMO

Líquidos iônicos (LIs) podem ser utilizados no pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar e têm possibilitado rendimentos de hidrólise enzimática acima de 60%. Além disso, a valorização da lignina obtida nesses processos tem atraído interesse crescente devido ao valor agregado do produto. Neste trabalho, o bagaço de cana-de-açúcar, biomassa lignocelulósica altamente disponível no cenário industrial brasileiro, foi avaliado para uso em biorrefinarias de produção de etanol de segunda geração (E2G), sendo a lignina obtida como produto de valor agregado. A biomassa foi submetida ao pré-tratamentos com 20 solventes sintetizados a partir da combinação de cinco bases aminas - etilamina, etanolamina etilenodiamina, butilamina, hexilamina - com quatro ácidos - acético, fórmico, láctico e malônico. Os LIs resultantes são próticos, sendo considerados de baixo custo quando comparados aos LIs apróticos. As ligninas obtidas nesta fase de *screening* foram caracterizadas por 2D HSQC NMR, ³¹P NMR, GPC, FTIR, TGA e análise elementar para estudo e avaliação da sua estrutura quando diferentes solventes são empregados no processo de extração. As análises tiveram como objetivo avaliar fatores como inserções de nitrogênio na estrutura macromolecular, efeito do aumento da cadeia dos cátions na despolimerização da estrutura lignocelulósica e preservação das ligações β-O-4 da lignina. Estas características podem determinar a sua valorização em diferentes aplicações industriais. Analisando a eficiência das etapas de pré-tratamento e hidrólise, os líquidos iônicos próticos (LIPs) [2He][Lac] (Lactato de etanolamina), [Etid][Ac] (acetato de etilenodiamina) e [Etid][Lac] (Lactato de etilenodiamina) apresentaram maior potencial para conversão de celulose e hemiceluloses na hidrólise e solubilização de lignina no pré-tratamento. Os pré-tratamento com os três LIPs foram otimizados considerando tempo e temperatura como fatores do planejamento experimental. Foi observado que o [Etid][Ac] levou a uma remoção de lignina de 82,7%, a 140°C e 3 h, e conversões de celulose/hemiceluloses de 84,4 e 62,9%, respectivamente, após 48 h de hidrólise enzimática, destacando-se como um dos melhores LIPs. Já as ligninas obtidas dos LIPs não apresentaram diferenças em sua estrutura nas condições de tempo e temperatura utilizadas na otimização do pré-tratamento. Ao final dos planejamentos experimentais, as condições mais severas de pré-tratamento – 3 h e 140°C ([Etid][Ac]), 3h e 130°C ([Etid][Lac]) e 3h e 160°C ([2He][Lac]) - levaram ao melhor desempenho de conversão na hidrólise e solubilização de lignina. Assim, os hidrolisados enzimáticos obtidos foram submetidos a fermentação com a levedura *Spathaspora passalidarum*, considerada uma cepa robusta, capaz de consumir glicose e xilose. Todas as fermentações apresentaram alto rendimento de etanol, variando entre 82,9 e 85,3%, e produtividade entre 1,2 a 1,3 g/L.h para

concentrações iniciais de levedura entre 4 e 5g/L. O LIP [Etid][Ac] foi o mais eficiente no processamento do bagaço de cana quando se analisou o processo produtivo do E2G, chegando a uma produção de 248,5 L de etanol/ton de bagaço in-natura (base seca). Este LIP também foi considerado o melhor solvente para solubilização de lignina. Este trabalho contribuiu para novos avanços na elucidação da estrutura química da lignina e abre um novo caminho para a sua valorização dentro do conceito de biorrefinaria usando LIPs.

Palavras chaves: Pré-tratamento, líquidos iônicos, lignina, valorização de biomassa, caracterização estrutural

ABSTRACT

Ionic liquids (ILs) may be used in the sugarcane bagasse pretreatment and have enabled enzymatic hydrolysis yields above 60%. Furthermore, the lignin valorization obtained in these processes has attracted growing interest due to the value-added product. In this work, sugarcane bagasse, lignocellulosic biomass highly available in the Brazilian industrial scenario was evaluated for use in second-generation ethanol (2GE) biorefineries, with lignin being obtained as a value-added product. The biomass was subjected to pretreatment with 20 solvents synthesized from the combination of five amine bases - ethylamine, ethanolamine, ethylenediamine, butylamine, hexylamine - with four acids - acetic, formic, lactic and malonic. The ILs obtained are protic and are considered to be of low cost compared to aprotic ILs. The lignins obtained in this screening step were characterized by 2D HSQC NMR, ³¹P NMR, GPC, FTIR, TGA and elemental analysis to study and evaluate their structure when different solvents are used in the extraction process. The analysis aimed to evaluate factors such as nitrogen insertions in the macromolecular structure, the effect of increasing the cations chain length on the depolymerization of the lignocellulosic structure and preservation of the β -O-4 linkages of lignin. These characteristics can determine their value in different industrial applications. Analyzing the efficiency of the pretreatment and hydrolysis steps, the protic ionic liquids (PILs) [2He][Lac] (ethanolamine lactate), [Etid][Ac] (ethylenediamine acetate) and [Etid][Lac] (ethylenediamine lactate) showed greater potential for converting cellulose and hemicelluloses in hydrolysis and lignin solubilization in the pretreatment. Pretreatment of the three LIPs was optimized considering time and temperature as experimental planning factors. It was observed that [Etid][Ac] led to a lignin removal of 82.7%, at 140°C and 3 h, and cellulose/hemicellulose conversions of 84.4 and 62.9%, respectively, after 48 h of enzymatic hydrolysis, highlighting as one of the best LIPs. The lignins obtained from the LIPs did not show differences in their structure under the conditions of time and temperature used in the pretreatment optimization. Lastly, experimental planning, the most severe pretreatment conditions – 3 h and 140°C ([Etid][Ac]), 3h and 130°C ([Etid][Lac]) and 3h and 160°C ([2He][Lac]) - led to the best conversion performance in the hydrolysis and solubilization of lignin. Thus, the enzymatic hydrolysates obtained were submitted to fermentation with the yeast *Spathaspora passalidarum*, considered a robust strain, capable of consuming glucose and xylose. All fermentations showed high ethanol yield, ranging between 82.9 and 85.3%, and productivity between 1.2 to 1.3 g/L.h for initial yeast concentrations between 4 and 5g/L. The LIP [Etid][Ac]

was the most efficient in the processing of sugarcane bagasse when the 2GE production process was analyzed, reaching a production of 248.5 L of ethanol/ton of *in natura* bagasse (dry). This PIL was also considered the best solvent for lignin solubilization. This work contributed to new advances in the elucidation of the chemical structure of lignin and opens a new way for its valorization within the concept of biorefinery using LIPs.

Keywords: Pretreatment, ionic liquids, lignin, biomass valorization, structural characterization

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Resumo das etapas de resultados desta tese	26
Figura 2.1 - Composição da fibra vegetal.....	29
Figura 2.2 – Distribuição dos monolignóis da lignina e as varias ligações interunidades éter e carbono-carbono presentes.	31
Figura 2.3 - Exemplos de outras estruturas exclusivas das ligninas de gramíneas.	32
Figura 2.4 - Abordagem de processos de separação de lignina e consecutiva valorização.....	32
Figura 2.5 – Produtos provenientes de reação de despolimerização de lignina.	34
Figura 4.1 - pH and net-basicity of PIL (15 wt % in H ₂ O) for pretreatment. (a) anion influence and (b) cation influence.	56
Figura 4.2 - Lignin solubilization (—) and pH (●) in the PILs pretreatment. (a) Influence of anion groups (values are means for each anion combined with all the cations considered). (b) Influence of cations groups (values are means for each cation combined with all the anions considered). (c) and (d) Results for the PILs.....	57
Figura 4.3 - Cellulose (—) and hemicellulose (—) conversion in the pretreatment with PILs. (a) Influence of anion groups (values are means for each anion combined with all the cations considered). (b) Influence of cations groups (values are means for each cation combined with all the anions considered). (c) and (d) Results for the PILs.	60
Figura 5.1 - FTIR spectra of various lignin samples extracted with PILs.....	69
Figura 5.2 - Quantitative 2D HSQC NMR analyses for PIL-recovered lignins from sugarcane bagasse. Aliphatic ($\delta C/\delta H$ 50-110/3.0-5.5 ppm, left) and aromatic ($\delta C/\delta H$ 90-140/6.0-8.0 ppm, right) regions from (A) [2He][Ac], (B) [Etid][Ac] and [2He][For]. See Figure 5.5 for the lignins structures identified.	70
Figura 5.3 - Quantitative 2D HSQC NMR analyses for PIL-recovered lignins from sugarcane bagasse. Aliphatic ($\delta C/\delta H$ 50-110/3.0-5.5 ppm, left) and aromatic ($\delta C/\delta H$ 90-140/6.0-8.0 ppm, right) regions from (A) [2He][Lac] and (B) [Etid][Lac]. See Figure 5.5 for the lignins structures identified.....	71
Figura 5.4 - Quantitative 2D HSQC NMR analyses for PIL-recovered lignins from sugarcane bagasse. Aliphatic ($\delta C/\delta H$ 50-110/3.0-5.5 ppm, left) and aromatic ($\delta C/\delta H$ 90-140/6.0-8.0 ppm, right) regions from (A) [2He][Mal] and (B) [Etid][Mal]. See Figure 5.5 for the lignins structures identified.....	72
Figura 5.5 – Representation of the main structures present in the PIL-recovered lignins as identified in the 2D HSQC NMR spectra. A: β -O-4-structures; A': β -O-4-structures with acylated (by acetate or pCA) g-OH; B: phenylcoumaran structures formed by β -5-coupling; pCA: p-coumarate moieties; FA: ferulate moieties; (esterified with hemicelluloses); pCA': p-coumarate amide; FA': ferulate amide; H: p-hydroxyphenyl units; G: guaiacyl units; S: syringyl units; T: Tricin end-groups; I: ρ -hydroxycinnamyl alcohol end-groups. The structures are colored to match the assigned contours in the 2D HSQC NMR spectra in Figure 5.2 - 5.4....	73
Figura 5.6 - Hydroxyl group contents of lignin isolated from sugarcane bagasse as determined by ³¹ P NMR analysis according to PILs used for extracting.....	79

Figura 5.7 - Relative abundances of derived units from S, G, and H and simple monomers in Py-CG-MS.	80
Figura 5.8 - Radar classification based in S, G and H units, NCS and β -O-4 linkage for lignin samples obtained of different PILs.	85
Figura 5.9 - Quantitative 2D HSQC NMR analyses for PIL-recovered lignins from sugarcane bagasse. Aliphatic ($\delta C/\delta H$ 50-110/3.0-5.5 ppm, left) and aromatic ($\delta C/\delta H$ 90-150/6.0-8.0 ppm, right) regions from (A) [Eti][Ac], (B) [But][Ac] and (C) [Hex][Ac]. See Figure 5 for the lignins structures identified.	91
Figura 5.10 - Quantitative 2D HSQC NMR analyses for PIL-recovered lignins from sugarcane bagasse. Aliphatic ($\delta C/\delta H$ 50-110/3.0-5.5 ppm, left) and aromatic ($\delta C/\delta H$ 90-150/6.0-8.0 ppm, right) regions from (A) [Eti][For], (B) [But][For] and (C) [Hex][For]. See Figure 5 for the lignins structures identified.	92
Figura 5.11 - Quantitative 2D HSQC NMR analyses for PIL-recovered lignins from sugarcane bagasse. Aliphatic ($\delta C/\delta H$ 50-110/3.0-5.5 ppm, left) and aromatic ($\delta C/\delta H$ 90-150/6.0-8.0 ppm, right) regions from (A) [Eti][Lac], (B) [But][Lac] and (C) [Hex][Lac]. See Figure 5 for the lignins structures identified.	93
Figura 5.12 - Quantitative 2D HSQC NMR analyses for PIL-recovered lignins from sugarcane bagasse. Aliphatic ($\delta C/\delta H$ 50-110/3.0-5.5 ppm, left) and aromatic ($\delta C/\delta H$ 90-150/6.0-8.0 ppm, right) regions from (A) [Eti][Mal], (B) [But][Mal] and (C) [Hex][Mal]. See Figure 5 for the lignins structures identified.	94
Figura 5.13 - Representation of the main structures present in the PIL-recovered lignins as identified in the 2D HSQC NMR spectra. A: β -O-4-structures; A': β -O-4-structures with acylated (by acetate or <i>p</i> CA) g-OH; B: phenylcoumaran structures formed by β -5-coupling; <i>p</i> CA: <i>p</i> -coumarate moieties; FA: ferulate moieties; (esterified with hemicelluloses); <i>p</i> CA': <i>p</i> -coumarate amide; FA': ferulate amide; H: <i>p</i> -hydroxyphenyl units; G: guaiacyl units; S: syringyl units; T: Tricin end-groups; I: ρ -hydroxycinnamyl alcohol end-groups. The structures are colored to match the assigned contours in the 2D HSQC NMR spectra in Figure 5.1-5.4.	95
Figura 5.14 - Quantitative ^{31}P NMR analyses to determine the hydroxyl groups content in PIL-recovered lignins from sugarcane bagasse.	101
Figura 5.15 - Units S, G and H and simple monomers (phenol and syringol) by Py-GC/MS analysis of PIL-recovered lignins.	102
Figura 6.1.1 - Cellulose and hemicellulose conversion obtained in the enzymatic hydrolysis and lignin solubilization in the pretreatment step based on time and temperature for PILs pretreatment. (A) [Etid][Ac], (B) [Etid][Lac], (C) [2He][Lac].	112
Figura 6.1.2 - Radar tool with summarized data from 2D HSQC NMR, ^{31}P NMR and GPC analysis for recovered lignins by [Etid][Ac] (A), [Etid][Lac] (B) and [2He][Lac] (C) in relation to time (h):temperature ($^{\circ}\text{C}$).	114
Figura 6.1.3 - 2D HSQC NMR analysis for recovered lignins by [Etid][Ac] (A), [Etid][Lac] (B) and [2He][Lac] (C) in relation to time (h):temperature ($^{\circ}\text{C}$) optimized.	115
Figura 6.1.4 - Kinetic of results of sugar and conversion in the enzymatic hydrolysis for pretreatment in the optimized conditions: (a) [Etid][Ac] (140 $^{\circ}\text{C}$ and 3 h), (b) [Etid][Lac] (130 $^{\circ}\text{C}$ and 3 h) and (c) [2He][Lac] (160 $^{\circ}\text{C}$ and 3 h). Different letters above symbol indicate a significant difference among hydrolysis time ($p < 0.1$) by the Tukey test.	118

Figura 6.1.5 - Fermentation of glucose and arabinose/xylose for pretreatment in the optimized conditions: (a) [Etid][Ac] (140°C and 3h), (b) [Etid][Lac] (130°C and 3h) and (c) [2He][Lac] (160°C and 3 h), (d) control. (■) Glucose; (●) Arabinose/xylose; (▲) Glycerol; (▼) Xylitol; (◄) DCW; (◆) Acetic acid; (—) Ethanol. 119

Figura 6.1.6 - Mass balance in the optimized conditions of pretreatment using [Etid][Ac] (black color), [Etid][Lac] (blue color), and using [2He][Lac] (grey color). 122

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Materiais derivados da lignina de acordo com produtos e potenciais aplicações.	36
Tabela 3.1 – Cátions e ânions.	46
Tabela 3.2 – Dados para bagaço <i>in natura</i> .	47
Tabela 3.3 - Temperaturas de pré-tratamento.	48
Tabela 3.4 - Planejamento experimental do pré-tratamento com LIPs [Etid][Ac], [Etid][Lac] e [2He][Lac].	49
Tabela 4.1 - The mass loss (%) for PILs on the temperature ranges employed in the TGA analyses.	55
Tabela 5.1 - Elemental composition (C/H/N/O) and C9-formula of the lignins isolated from sugarcane bagasse and literature lignins.	67
Tabela 5.2 - Structural characteristics (lignin inter-unit linkages, end-groups, aromatic units, and S/G ratio and cinnamate content) from the integration of ¹³ C- ¹ H correlation peaks in the HSQC spectra of the lignins.	76
Tabela 5.3 - The molecular weight of lignins after PILs pretreatment.	81
Tabela 5.4 - Weight loss percentage at different temperature regions under nitrogen atmosphere for the lignin samples obtained after PIL pretreatment.	83
Tabela 5.5 - Sugarcane bagasse lignin solubilization (%) in the pretreatment with different PILs.	90
Tabela 5.6 - Structural characteristics (lignin inter-unit linkages, end-groups, aromatic units, and G/S ratio and cinnamate content) from the integration of ¹³ C- ¹ H correlation peaks in the HSQC spectra of the PIL-recovered lignins.	99
Tabela 5.7 - Weight-average (M _w) and number-average (M _n) molecular weights and polydispersity (M _w /M _n) of the PIL-recovered lignins.	104
Tabela 5.8 - Elemental composition of the PIL-recovered lignins, C900 formula and degree of unsaturation (DOU).	105
Tabela 5.9 - Weight loss percentage at different temperature regions for PIL-recovered lignins.	106
Tabela 6.1.1 - Fermentation in the optimized conditions [Etid][Ac] (140°C and 3 h), [Etid][Lac] (130°C and 3 h) and [2He][Lac] (160°C and 3 h) using <i>S. passalidarum</i> at 30°C, 18h and 150 rpm . Different letters mean that the values are different significantly for Tukey test.	119

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	20
Introdução	20
1. Objetivos	23
1.1. Objetivo geral	23
1.2. Objetivos específicos	23
1.3. Relevância científica e contribuições	23
1.4. Organização do trabalho	25
CAPÍTULO 2	27
2. Revisão bibliográfica	27
2.1 Conceito de biorrefinaria	27
2.2 Bagaço de cana-de-açúcar	28
2.2.1 Celulose	29
2.2.2 Hemiceluloses	30
2.3 Lignina	30
2.4 Líquidos iônicos	36
2.5 Pré-tratamento com líquidos iônicos	39
2.6 Hidrólise enzimática e fermentação alcoólica	42
CAPÍTULO 3	46
3. Metodologia experimental	46
3.1. Síntese e análise dos LIPs	46
3.2. Preparação e caracterização química do bagaço	47
3.3. Pré-tratamento	48
3.4. Hidrólise enzimática	49
3.5. Fermentação	49
3.6. Caracterização das ligninas	50
CAPÍTULO 4	52
4. Design de LIPs e a influência da sua estrutura no pré-tratamento	52
4.1. Structural features of protic ionic liquids and their impact on pretreatment performance for 2G ethanol production	53
4.1.1. Abstract	54
4.1.2. Results and discussion	54
4.1.2.1. PILs analysis	54
4.1.2.2. Biomass components solubilization in PILs	56

4.1.2.3. Influence of PILs on the enzymatic hydrolysis	60
4.1.3. Conclusion	63
4.2. Considerações	63
CAPITULO 5	64
5. Influência do cátion/ânion dos LIPs na estrutura da lignina.....	64
5.1. Structural characterization of sugarcane lignins extracted from different protic ionic liquid pretreatments	65
5.1.1. Abstract.....	66
5.1.2. Results and discussion	66
5.1.2.1. Elemental analysis and C900 formula determination	66
5.1.2.2. FTIR analysis	68
5.1.2.3. 2D-HSQC-NMR analysis	69
5.1.2.4. 31P NMR analysis	78
5.1.2.5. Py-GC/MS analysis.....	80
5.1.2.6. Weight-average molecular weight (Mw)	81
5.1.2.7. TGA analysis	83
5.1.2.8. Potential uses of lignin.....	84
5.1.3. Conclusion	87
5.2. Influence of of chain length in protic ionic liquids on physicochemical and structural features of lignins from sugarcane bagasse	88
5.2.1. Abstract.....	89
5.2.2. Results and discussion	89
5.2.2.1. PIL-recovered lignins structural units and inter-unit linkages elucidation by 2D HSQC NMR analysis	89
5.2.2.2. Determination of hydroxyl groups in PIL-recovered lignins via quantitative 31P NMR spectroscopy	100
5.2.2.3. PIL-recovered lignins composition by Py-GC/MS analysis.....	101
5.2.2.4. PILs lignin molecular weight characterization	103
5.2.2.5. Elemental analysis of the PIL-recovered lignins	104
5.2.2.6. Thermal analysis of the PIL-recovered lignins.....	105
5.2.3. Conclusion	106
5.3. Considerações	107
CAPITULO 6	108
6. Otimização de pré-tratamento e sua influência na estrutura da lignina.....	108
6.1. Effect of protic ionic liquids in sugarcane bagasse pretreatment for lignin valorization and ethanol production	109

6.1.1.	Abstract.....	110
6.1.2.	Results e discussion	110
6.1.2.1.	Effects of temperature and time on the pretreatment, enzymatic hydrolysis and lignin structure	110
6.1.2.2.	Enzymatic hydrolysis and fermentation	117
6.1.2.3.	Mass balances for ethanol production using PILs in pretreatment	121
6.1.3.	Conclusion	123
6.2.	Considerações	123
CAPITULO 7		124
7.	Conclusões	124
7.1.	Sugestões trabalhos futuros	126
REFERÊNCIAS		127
APÊNDICE A	- Material suplementar dos artigos.....	150
APÊNDICE B	- Análises dos LIPs	192
APÊNDICE C	- Análises de caracterização do bagaço de cana-de-açúcar.....	194
APÊNDICE D	- Procedimento de pré-tratamento, hidrólise e fermentação	199
APÊNDICE E	- Caraterização de lignina	203

CAPÍTULO 1

Introdução

O material mais disponível em larga escala para suprir a demanda de combustíveis líquidos é o petróleo, e uma forma de atender parcialmente essa demanda e reduzir a emissão de gases de efeito estufa é a produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica, como resíduos agrícolas, madeira ou culturas energéticas.¹⁻³

Dentre as biomassas lignocelulósicas, o bagaço, obtido após o processamento da cana-de-açúcar para extração da sacarose, é uma das biomassas mais abundante no mercado brasileiro. Estima-se a geração de ~86 milhões de toneladas de bagaço na safra 2020/2021⁴. Juntamente com a palha da cana, vem despertando interesse do mercado devido ao seu baixo custo, além das distintas possibilidades de utilização, sendo empregado na produção de etanol de segunda geração (E2G)⁵, de bioeletricidade, biogás e ou mesmo na geração de calor, entretanto a palha é ainda subaproveitada nessa área.

O bagaço, constituído predominantemente por celulose, hemiceluloses e lignina, onde a lignina dificulta o acesso das enzimas à celulose e hemiceluloses⁶, sendo, portanto, desejável sua remoção total/ou parcial da biomassa, através da etapa de pré-tratamento. O aproveitamento da lignina para outros fins pode tornar o processo bem atrativo, já que se trata de uma fração com potencial valor agregado.^{7,8} Em geral, o pré-tratamento é considerado uma das etapas mais caras nas biorrefinarias e possui a função de diminuir a recalcitrância do material, além de facilitar as etapas subsequentes, hidrólise enzimática e fermentação.^{9,10}

Diversos tipos de pré-tratamento são relatados na literatura¹¹⁻¹³, sendo os líquidos iônicos (LIs) mencionados como uma alternativa promissora por serem capazes de desestruturar a celulose, remover parcialmente as hemiceluloses e promover uma eficiente remoção de lignina, permitindo, assim, uma maior acessibilidade aos carboidratos e a obtenção de uma lignina com alta pureza (>90%) a ser explorada.^{2,3,14,15} No geral, são empregadas condições de pré-tratamento moderadas – tempo (1 a 2h) e temperatura (100 a 150°C).^{16,17}

Alguns LIs possuem propriedades físico-químicas únicas e ajustáveis, uma vez que são não inflamáveis, são termicamente e quimicamente estáveis, apresentam pressões de vapor baixas, ponto de fusão menor que 100°C e podem ser reciclados no processo.¹⁸⁻²⁰ Os LIs são divididos em dois grupos, próticos e apróticos. Os próticos, diferente dos apróticos (*e.g.*, base

de imidazólio), apresentam simplicidade na síntese (reação de Brønsted), presença de um hidrogênio ionizável, não requerem etapas de purificação, não há geração de resíduos e subprodutos, perda de solventes ou geração de CO₂. Além disso, possuem baixo custo em relação aos apróticos (1\$/kg para 3,2\$/kg).^{19,21-23} e apresentam uma alta seletividade na desconstrução de biomassa lignocelulósica e com resultados apreciáveis.²¹

Estudos demonstram que o pré-tratamento com líquidos iônicos próticos (LIPs) promovem uma deslignificação de 60 a 95% e, conseqüentemente, a conversão dos polissacarídeos na hidrólise enzimática.^{16,17} Isso é devido a mudanças estruturais que ocorrem na celulose após o pré-tratamento e, conseqüentemente, a suscetibilidade à hidrólise aumenta. É de conhecimento que diferentes LIPs (diferentes combinações de cátions e ânions) e diferentes condições (tempo e temperatura) usadas no pré-tratamento podem resultar em diferentes alterações estruturais da biomassa, por causa das propriedades de solvatação ajustáveis dos LIs, que podem ser projetados para fins específicos e que afetarão diretamente o fracionamento em uma biorrefinaria. Como exemplo temos a extração seletiva de hemicelulose que pode ser realizada usando um LI produzido a partir de uma amidina, álcool e CO₂.²⁴

O uso de LIP na biomassa lignocelulósica apresenta benefícios e vantagens frente a outros pré-tratamentos e as desvantagens citadas na literatura ainda são limitadas, sendo a principal o custo do processo. Para contornar os custos e tornar o solvente competitivo economicamente, medidas devem ser apresentadas, tais como, reciclo e reuso no processo >98%^{21,25}, misturar LIP e água^{16,17,26} e dessa forma, mitigar problemas com viscosidade, além de usar menores quantidades de solvente, facilitando operações de separação¹⁵, recuperação de calor residual >90%.²² Todos esses pontos torna o processo economicamente competitivo com o pré-tratamento usando ácido sulfúrico, e são considerações otimistas no cenário atual da tecnologia, só necessitando de mais pesquisas.

Em geral, é importante entender como LIPs, com suas diferentes combinações de cátions e ânions, podem atuar diretamente na solubilização da lignina durante a etapa de pré-tratamento e, assim, auxiliar na conversão dos polissacarídeos durante a etapa de hidrólise enzimática. Neste sentido, os LIPs podem ser aplicados no fracionamento de biomassas dentro de um conceito de biorrefinarias, aumentando assim não apenas a eficiência da produção de biocombustíveis, mas também permitindo a obtenção de uma lignina de qualidade e com características atrativas para a produção de compostos químicos de alto valor agregado²⁷, o que pode contribuir para minimizar o custo da etapa de pré-tratamento.

A lignina é frequentemente considerada um subproduto de baixo valor, onde na maioria dos setores (biocombustíveis, celulose e papel etc.) é geralmente queimada para produção de energia. Entretanto, apresenta um alto potencial para a produção de produtos de química fina e aromáticos, devido à sua alta funcionalidade. Trata-se de uma macromolécula aromática complexa composta por unidades *p*-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e/ou siringil (S), cujas proporções diferem de acordo com sua origem.²⁸ A lignina isolada de gramíneas, como o bagaço de cana-de-açúcar, também apresentam em sua estrutura quantidade considerável de ácidos *p*-cumárico (*p*CA) e ferúlico (FA)^{29,30}. As unidades de lignina são reticuladas por diferentes ligações químicas do tipo β -O-4', β -5', β - β' , 5-5' e 5-O-4', cujas características estruturais são influenciadas por vários fatores, incluindo a fonte de biomassa e as condições de extração.^{30,31}

A lignina pode ser usada após sua despolimerização/fragmentação ou pode ser posteriormente modificada, por meio de processos químicos e biotecnológicos, como pirólise, hidrogenação, catálise química ou enzimática, oxidação e gaseificação, em formas mais simples e utilizáveis. O mercado global de lignina é estimado em uma receita de US\$ 1.122,2 milhões em 2027³², e os maiores enfoques estão no uso na formulação de adesivos, cosméticos, energia, construção e automobilísticos.³³ A demanda crescente pela fabricação de produtos livres de derivados de fenol, por exemplo, impulsiona o refinamento de tecnologias de pré-tratamento para facilitar ainda mais a recuperação de lignina e possibilitar modificações catalíticas para obter propriedades químicas e físicas desejadas.³⁴

Neste trabalho, 20 LIPs foram projetados para avaliar a influência dos cátions e ânions no pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com o objetivo de maximizar a solubilização de lignina e consequentemente, a conversão dos polissacarídeos em açúcares fermentescíveis, sendo esses resultados ausentes na literatura para os solventes utilizados. As ligninas precipitadas tiveram suas características estruturais avaliadas por meio de uma ampla gama de técnicas analíticas com o intuito de entender as modificações na estrutura relacionadas à extração com os PILs, já que estudos deste tipo ainda são bastante escassos na literatura. Além disso, foi possível avaliar novas perspectivas de aplicações para as ligninas isoladas, que podem contribuir, de forma efetiva, na visão das biorrefinarias de lignocelulose.

1. Objetivos

1.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência dos cátions e ânions na construção de líquidos iônicos próticos (LIPs) visando o fracionamento do bagaço de cana-de-açúcar para maximizar a recuperação da lignina e obtenção dos açúcares fermentescíveis visando a produção de etanol de segunda geração (E2G). Além disso, buscou-se avaliar como a composição dos LIPs interferiram na estrutura química e macromolucular das ligninas extraídas, com a intenção de prospectar novas aplicações desses compostos, de modo a tornar o processo mais atrativo economicamente.

1.2. Objetivos específicos

1. Sintetizar e caracterizar 20 LIPs compostos pela combinação de bases amônio - etilamina, etanolamina, etilenodiamina, butilamina e hexilamina - e ânions acetato, lactato, formiato e malonato;
2. Realizar um estudo das condições operacionais do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar para avaliar o desempenho dos pré-tratamentos com os diferentes PILs considerando a da solubilização de lignina e a conversão dos polissacarídeos em açúcares fermentescíveis no processo de hidrólise enzimática;
3. Caracterizar as ligninas obtidas no processo de pré-tratamento visando avaliar a influência da escolha do cátion e do ânion dos LIPs nas estruturas;
4. Otimizar as condições operacionais dos pré-tratamentos (tempo e temperatura) por panejamento fatorial considerando os três LIPs que alcançaram os melhores desempenhos na etapa anterior;
5. Realizar a caracterização das ligninas obtidas dos ensaios de otimização, a fim de avaliar a influência das condições de pré-tratamento na estrutura da lignina solubilizada;
6. Fermentar os hidrolisados enzimáticos obtidos dos três LIPs com o melhor desempenho no pré-tratamento, para produção de E2G;

1.3. Relevância científica e contribuições

A produção de E2G a partir de bagaço é ainda um desafio no cenário brasileiro atual, principalmente pela falta de tecnologia economicamente viável para uma competitividade

comercial. Entretanto, é promissora pela disponibilidade de bagaço e palha no cenário sucroalcooleiro, e os rendimentos estão se mostrando competitivos para essa finalidade.

O pré-tratamento é a etapa mais cara do processo devido aos altos custos de produção/manutenção do reator necessárias para suportar a corrosão causada pelos solventes (*e.g.*, ácidos e explosão de vapor) utilizados nessa etapa. Os LIPs são solventes que merecem atenção quando utilizados nesse processo por poderem ser sintetizados para propósitos específicos, pelas combinações de cátion/ânion que levam a interações específicas com a biomassa, resultando em conversões e solubilizações competitivas quando comparados aos solventes comumente estudados. Além disso, entre as principais vantagens desses solventes está a possibilidade de manutenção dos principais açúcares, glicose e xilose, na fase sólida, evitando que os inibidores que estão presentes na fase líquida influenciem a etapa de fermentação. Estes solventes podem ser reciclados e reutilizados, sendo que trabalhos na literatura mostram que o solvente pode ser reutilizado pelo menos 4 vezes sem perdas de desempenho.²⁵

Adicionalmente, não existem estudos na literatura com o uso dos solventes utilizados nesse trabalho para o pré-tratamento de bagaço, e não foram publicados estudos com a estrutura da lignina obtida a partir dos mesmos. A elucidação estrutural das ligninas solubilizadas durante a etapa de pré-tratamento é um desafio analítico, mas torna-se necessário para prover informações de como agregar valor ao processo e torná-lo economicamente viável. As técnicas empregadas demandaram avaliação e correlação dos dados obtidos com as características necessárias para possíveis aplicações.

Sendo assim, um conjunto de combinações entre cátions e ânions foram realizadas para customização de 20 LIPs e posterior elucidação de desempenho na solubilização de lignina e da fermentabilidade dos hidrolisados. O desenvolvimento dos métodos, juntamente com a interface de análise dos dados empregada e reportada nesse trabalho foram de grande contribuição para o grupo de pesquisa.

1.4. Organização do trabalho

O presente trabalho encontra-se dividido em nove capítulos visando a melhor abordagem dos resultados, nos quais cinco capítulos correspondem aos resultados obtidos neste estudo.

O **Capítulo 2** “Revisão bibliográfica” aborda os conceitos da estrutura da biomassa lignocelulósica, enfatizando a estrutura da lignina. Apresenta os pré-tratamentos utilizando LI comumente empregados no fracionamento de biomassa e destaca o LIP e seu baixo custo de síntese. Esta seção aborda também hidrólise enzimática e fermentação, procesos comumente utilizados para obtenção de etanol de segunda geração

O **Capítulo 3** “Metodologia experimental” apresenta a metodologia dos experimentos e análises utilizadas neste estudo, com foco nos pré-tratamentos com LIPs, hidrólise enzimática e fermentação, além dos detalhes das técnicas analíticas, 2D HSQC NMR, ^{31}P NMR, GPC, FTIR, e outras usadas para obter informações das estruturas das ligninas.

O **Capítulo 4** “*Design* de LIPs e a influência da sua estrutura no pré-tratamento” apresenta resultados das caracterizações (TGA, pH e acidez e basicidade) dos LIPs e descreve o comportamento desses 20 LIPs no pré-tratamento do bagaço para solubilização de lignina e posterior hidrólise enzimática. Aponta os melhores solventes e a influência de cada cátion e ânion, junto as suas características nos resultados obtidos de conversão e solubilização.

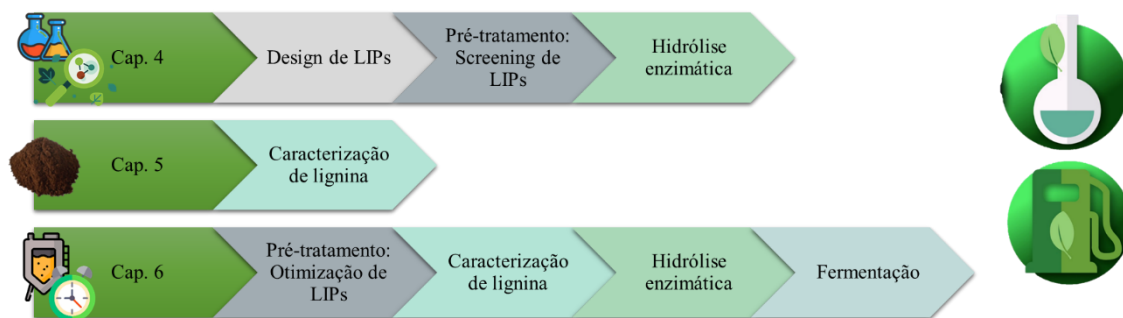
O **Capítulo 5** “Influência da estrutura dos LIPs na obtenção de lignina” aborda o desempenho dos cátions e ânions dos LIPs em modificar a estrutura da lignina na sua extração. Apresenta a identificação das principais estruturas presentes na lignina, como unidades S, G e H, e massa molares médias.

O **Capítulo 6** “Otimização de pré-tratamento e sua influência na estrutura da lignina” apresenta a influência da variação do tempo e da temperatura para os três solventes selecionados, [Etid][Ac], [Etid][Lac] e [2He][Lac] no pré-tratamento do bagaço. Além disso, também são apresentadas a influência dessas condições de pré-tratamento nas ligninas extraídas através da ferramenta de radar, usando os resultados resumidos das técnicas analíticas.

As condições ótimas de cada LIP no pré-tratamento são utilizadas para avaliação da fermentação dos açúcares, glicose e xilose, usando *S. passalidarum*, e por fim as etapas de pré-tratamento, hidrólise e fermentação são resumidas em balanço de massa.

O **Capítulo 7** “Conclusões” resume os resultados de maior relevância no trabalho e também sugestões de trabalhos futuros.

Figura 1.1 - Resumo das etapas de resultados desta tese



Acervo do autor

CAPÍTULO 2

2. Revisão bibliográfica

2.1 Conceito de biorrefinaria

A biorrefinaria é uma unidade industrial que se refere ao processo integrado de conversão da biomassa para a produção de combustível, eletricidade, calor e derivados refinados a partir da biomassa. O conceito de biorrefinaria é dinâmico e ainda está em desenvolvimento e, portanto, não há modelos e padrões consagrados, mas são apresentadas vantagens, entre elas a obtenção de intermediários da biomassa que maximizam seu valor^{27,35}.

O objetivo de uma biorrefinaria é otimizar o uso de recursos e minimizar a geração de efluentes, maximizando os benefícios e o lucro³⁵, onde quase todos os tipos de matérias-primas de biomassa podem ser convertidas em diferentes classes de biocombustíveis e (bio)químicos por meio de tecnologias de conversão aplicadas em conjunto. Um modelo desejado de biorrefino é aquele em que tem a exploração total da biomassa, e uma série de produtos de valor agregado são extraídos e absorvidos pelo mercado³⁶. Normalmente, dentro das biorrefinarias podem ser obtidos grandes volumes de produtos de baixo valor econômico unitário, como é o caso dos biocombustíveis, e produtos em menor volume, mas com alto valor agregado, como é o caso das especialidades químicas e aditivos³⁷.

O conceito de biorrefinaria pode apresentar vantagens na obtenção de produtos a partir de componentes, maximizando o valor agregado desta matéria-prima, pois são integradas diversas rotas de conversão, bioquímicas, químicas e termoquímicas³⁸. Por outro lado, é exigido o desenvolvimento de uma maior gama de tecnologias de processamento e sistemas de biorrefino para lidar com as diferenças de composição da biomassa^{38,39}.

Atualmente existem algumas biorrefinarias em operação no Brasil e ao redor do mundo. No Brasil podemos destacar o setor sucroenergético, com a produção de açúcar, etanol e bioeletricidade a partir da cana-de-açúcar e milho; as fábricas de óleo, ração animal, biodiesel e diversos outros derivados a partir da soja; empresas do setor de celulose e papel, com produção de diferentes tipos de celulose, papéis, energia e lignina, dentre outras³⁶. De toda forma, ainda há muito espaço para uma maior integração da química verde no setor, considerando, especialmente, o uso de tecnologias de baixo impacto ambiental, visando o estabelecimento de futuras cadeias de produção sustentáveis de biocombustíveis e produtos químicos de alto valor

a partir da biomassa. O objetivo destas indústrias é ser competitiva no mercado e conduzir à substituição progressiva dos produtos obtidos nas refinarias de petróleo³⁵.

2.2 Bagaço de cana-de-açúcar

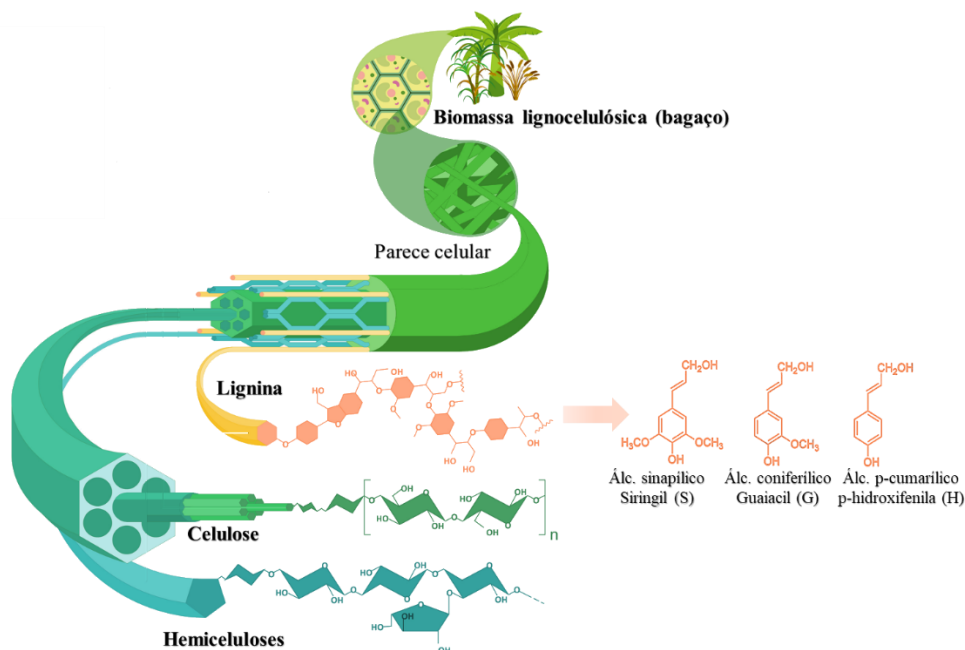
O bagaço de cana-de-açúcar é uma biomassa lignocelulósica resultante dos procedimentos de preparo e extração da sacarose para fins de produção de etanol e açúcar. Essa biomassa pode ter diversos usos, tais como produção de energia através da sua queima nos processos conhecidos como cogeração, produção de E2G e produtos de alto valor agregado a partir de polissacarídeos e lignina, suplementação de ração animal, dentre outros⁴⁰.

Essa biomassa é constituída de celulose, hemiceluloses, lignina, cinzas e extrativos Figura 2.1. Esta composição varia de acordo com a variedade genética da planta, o solo, as técnicas de colheitas, o manuseio e armazenagem, variando de 38 a 50% de celulose, 25 a 27% de hemiceluloses, 20 a 30% de lignina e 5 a 8% de extrativos⁴¹.

Em áreas tropicais e subtropicais, o bagaço de cana é uma das principais biomassas disponíveis e uma das principais fontes de material lignocelulósico que podem ser utilizados dentro da biorrefinaria⁴². O bagaço possui uma parede celular com estrutura dividida em camadas distintas química e morfológicamente. Inicialmente, possui uma parede primária espessa e consideravelmente lignificada, circundando a parede secundária que é constituída de uma sequência de três lamelas, onde a camada central determina as propriedades mecânicas da fibra e as outras lamelas são formadas por longas cadeias de celulose^{43,44}.

Os polissacarídeos presentes no bagaço de cana podem ser convertidos em açúcares através da etapa de hidrólise enzimática, e podem ser posteriormente fermentados pela ação de microrganismos, para a obtenção de biocombustíveis e outros produtos fermentativos.^{45,46}

Figura 2.1 - Composição da fibra vegetal



Adaptado de Magalhães (2019)⁴⁷.

2.2.1 Celulose

A celulose é um polímero natural de estrutura linear, cristalina e com partes amorfas, que resulta de ligações de hidrogênio inter e intra cadeiras e apresenta fibras compactas e resistentes à degradação. É encontrada em proporções que variam desde 20% até 90% nas espécies.^{48,49}

A celulose tem como unidade repetitiva a celobiose, que consiste em dímeros de glicose unidos por ligações do tipo β -D (1 $\rightarrow$ 4) glicosídicas. Essas ligações são caracterizadas pelas suas distâncias, pelos respectivos ângulos formados e pelos grupos hidroxila que estabelecem interações do tipo ligações de hidrogênio intra e intermoleculares.^{43,44,48}

A celulose pode apresentar reatividade e possuir em sua estrutura partes cristalinas atribuídas às ligações de hidrogênio, o que a torna de baixa solubilidade. O grau de cristalinidade pode variar de acordo com a natureza da biomassa vegetal e seu processamento. As celulosas originadas de bagaço apresentam cerca de 60% de cristalinidade.⁵⁰ Além das ligações de hidrogênio, a presença de hemiceluloses e lignina na espécie também dificultam o acesso de reagentes e catalisadores à celulose, tornando necessário um pré-tratamento para a remoção parcial ou total destes componentes.⁴²

2.2.2 Hemiceluloses

As hemiceluloses são polissacarídeos heterogêneos de massas molares relativamente baixas (xilose ~ 132 g/mol), com uma estrutura bastante hidrofílica e não cristalina⁵¹. Apresentam reatividade na sua cadeia com caráter amorfo, logo são mais vulneráveis à solubilização. Além disso, estão associadas à celulose nas paredes celulares através de pontes de hidrogênio, e apresentam uma facilidade de interação por apresentarem ramificações em sua estrutura^{42,44,52}.

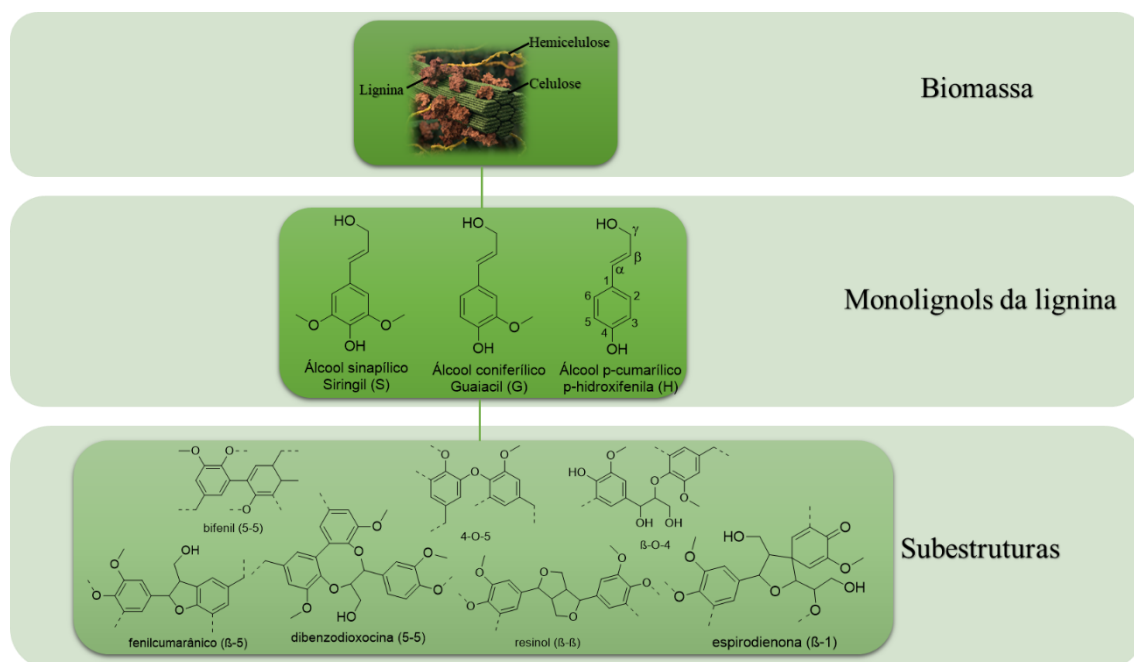
Na biomassa vegetal representam de 15 a 35% e são compostas por diferentes açúcares,⁵³ que são as pentoses (xilose e arabinose) e hexoses (glucose, manose e galactose), além de ácidos urônicos (4-O-metil-D-glucoronico, ácido D-galacturônico, e ácido D-glucurônico), sendo a xilose a principal e cada composto apresenta uma propriedade particular e sua proporção pode variar de acordo com a parede celular vegetal, sendo neste caso principal para bagaço de cana-de-açúcar.⁵⁴

2.3 Lignina

A lignina é uma macromolécula amorfa, hidrofóbica, heterogênea, ramificada e que atua como estrutura no interior das fibras. É comumente distribuída em combinação com as hemiceluloses em torno dos filamentos de celulose nas paredes celulares primária e secundária, e covalentemente ligada à estrutura de celulose e outros polissacarídeos da parede celular⁵⁵, criando uma adesão e uma barreira física que é de vital importância como material estrutural e de proteção (raios UV e ataques de patógenos) e que representa cerca de 20 a 30% na biomassa vegetal.⁴³

Essa macromolécula possui uma estrutura tridimensional complexa constituída por um arranjo irregular de vários grupos fenilpropano que não se degrada facilmente⁵⁶. Sua formação ocorre por três principais unidades aromáticas básicas, *p*-hidroxifenil (H), siringil (S) e guaiacil (G)⁵⁷ (Figura 2.2), que são resultantes da polimerização de três unidades de fenilpropano chamados de monolignols - *p*-cumaril, coniferil e sinapil. As principais ligações entre os monômeros são éter do tipo β -O-4, que compõem mais de 80% das ligações da lignina do bagaço de cana-de-açúcar²⁹, sendo o alvo crucial para a maioria dos mecanismos de degradação. Outras ligações encontradas em menores porcentagens incluem o fenilpropano tipo β -5, β - β' resinol, α -O-4 éter, 4-O-5 difenil éter, 5-5 bifenil e β -1 difenil metano.⁵⁵

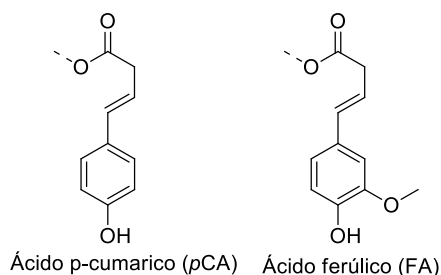
Figura 2.2 – Distribuição dos monolignóis da lignina e as várias ligações interunidades éter e carbono-carbono presentes.



Adaptada de Schutyser (2018)⁵⁸.

A composição da lignina varia com a origem da biomassa e, por isso, as biomassas são frequentemente divididas em madeiras moles, madeiras duras e gramíneas, considerando as respectivas proporções dos monômeros S, G e H^{59,60}. Em geral, as ligninas das madeiras duras contêm principalmente unidades G e S, com traços de unidades H, enquanto as ligninas das madeiras moles contêm unidades G predominantemente, com unidades H muito baixas. A lignina de gramíneas, como é o caso do bagaço de cana-de-açúcar, é composta por unidades de relação S:G semelhantes e baixo teor de unidades H. Em comparação com ligninas de madeiras, as ligninas das gramíneas contêm mais unidades H⁵⁸ e também a presença de ácidos ferúlico (FA) e p-cumárico (pCA) (Figura 2.3). Ambos são ácidos p-hidroxinâmicos que apresentam capacidade de estabilizar ligações covalentes entre a lignina e outros componentes poliméricos da parede celular vegetal (exemplo, hemiceluloses). O pCA é encontrado acilando a cadeia lateral da lignina e é responsável pela ligação éster entre a posição γ das cadeias laterais das unidades siringilas da lignina (Figura 2.2), enquanto o FA acila resíduos de arabinose das cadeias de arabinosilana e se liga tanto aos polissacarídeos pela ligação do tipo éster, quanto às unidades de lignina via mecanismos de acoplamento radicalar, levando a inúmeros tipos de ligação éter e carbono-carbono²⁹.

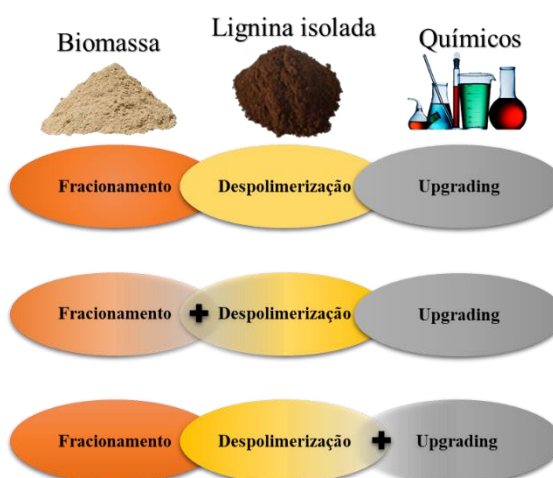
Figura 2.3 - Exemplos de outras estruturas exclusivas das ligninas de gramíneas.



Acervo do autor

Diferentemente da celulose e das hemiceluloses, a estrutura química da lignina na forma nativa deve ser considerada aproximada devido à diversidade dos métodos de obtenção de informações e dados estruturais dos fragmentos^{61–64}. A extração bem-sucedida desta estrutura complexa como matéria-prima para produtos é conduzida pela interação do (i) método de fracionamento de biomassa, da (ii) tecnologia de despolimerização de lignina, e (iii) subsequente *upgrading* para produtos direcionados. Esses três estágios interconectados formam a linha principal da valorização de lignina na indústria. Essas operações podem ser executadas principalmente como processos consecutivos, separados fisicamente, ou por abordagens combinatórias em que ocorrem duas etapas simultaneamente em um único processo⁵⁸, como observado na Figura 2.4.

Figura 2.4 - Abordagem de processos de separação de lignina e consecutiva valorização.



Adaptada de Schutyser (2018)⁵⁸.

A lignina apresenta a estrutura mais firme quando comparada aos demais macrocomponentes das biomassas lignocelulósicas e, por sua vez, a sua degradação e/ou solubilização envolve múltiplas reações que devem ocorrer simultaneamente para que a estrutura seja quebrada e/ou rearranjada. No geral, a estrutura é alterada por meio de uma combinação de reações de des- e repolimerização, seguidas de inúmeras outras reações, entre elas recondensação para produtos de alta massa molar ou estabilização para monômeros fenólicos de baixa massa molar. A despolimerização é a etapa mais desafiadora na conversão de lignina em produtos valiosos, e depende fortemente do mecanismo subjacente no ambiente de fracionamento (i) base, ácido, biológico, redutor, oxidativo, térmico, e bem como catálise homogênea e heterogênea e (ii) qualidade da lignina/biomassa lignocelulósica^{58,65}, levando ao fracionamento dos compostos aromáticos em estruturas mais simples ao final do tratamento.

A despolimerização/fragmentação química pode ser conduzida por diferentes processos: pirólise, hidrogenação, hidrólise, oxidação e gaseificação. A escolha do processo e a eficiência da fragmentação dependem, principalmente, do tipo de lignina utilizada.⁶⁶ Métodos biológicos também têm sido considerados para a despolimerização da lignina por meio de oxidação enzimática ou conversão microbiana com o uso de bactérias e fungos capazes de decompor biomassa para realizar suas funções metabólicas.^{66,67}

Schutyser et. al. (2018)⁵⁸ resumem uma visão geral das possíveis reações que ocorrem durante o processamento da lignina. Os autores focam nas ligações β -O-4, por serem as ligações mais reativas da estrutura, e que são normalmente o alvo primário no fracionamento e despolimerização da biomassa lignocelulósica. A Figura 2.5 fornece uma visão geral dos possíveis produtos - em sua maior parte monômeros e dímeros - resultantes das reações químicas durante o processamento da lignina/biomassa lignocelulósica. Reações indesejáveis acontecem em qualquer processamento de lignina, e são muito difíceis de evitar, entretanto, grupos de pesquisa têm realizado esforços para minimizar essas reações secundárias indesejadas e maximizar o valor da lignina.

moléculas na estrutura ou na sua fragmentação em compostos aromáticos, originando produtos que podem ser utilizados em outras aplicações.^{58,66,83}

Uma das formas de maximizar o valor da lignina é a sua utilização em produtos químicos, e para incentivar a evolução de uma produção à base de petróleo para uma produção à base de biomassa, é necessário desenvolver uma rota viável do uso de lignina para uma ampla variedade de produtos de química fina contendo outros elementos além de C, H e O, comumente adquiridos em ligninas derivadas de métodos como hidrogenólise, oxidação e hidrólise. Reações de introdução de heteroátomo (X) durante a despolimerização da lignina permite novas ligações C – X e O – X e, conseqüentemente, nova formação, ampliando o escopo dos produtos^{83,84}. Um exemplo é a inserção de nitrogênio a partir da reação de aminação na lignina, essencial para produtos farmacêuticos, materiais poliméricos, agroquímicos e síntese orgânica.⁸³

Diferentes métodos de extração têm sido aplicados e alguns resultam em produtos intermediários que podem ter também diversas aplicações, enquanto outros reduzem ou previnem reações indesejáveis, ou conseguem introduzir heteroátomos na fase de extração a partir dos solventes utilizados.^{58,85} A capacidade de remoção de radicais da lignina não é a mesma para todas as frações, mas dependendo do teor de hidroxila, da massa molar e da solubilidade, entre vários outros fatores, as aplicações podem variar muito.

Em geral, os produtos de valor agregado derivados da lignina podem ser divididos em três grupos principais: biocombustíveis, macromoléculas e aromáticos, que poderiam ser utilizados por diferentes setores. Muitos estudos relataram a possibilidade de usar a lignina como um produto de alto valor, no entanto, ainda não alcançaram a escala industrial e, até agora, o uso de lignina foi restrito.^{28,64,86} A Tabela 2.1 destaca os principais materiais derivados da lignina, produtos funcionais e suas aplicações potenciais.

Estima-se que a produção anual de lignina seja de 50 milhões de toneladas.⁸⁷ Ligninas com baixa pureza (*e.g.*, kraft e lignosulfonatos) variam entre 50-280 USD/MT, já as de alta pureza disponíveis no mercado (*e.g.*, organosolve com ~90% de pureza) têm preços mais elevados, que podem chegar a 750 USD/MT.^{15,88} Indústrias na América do Norte, Reino Unido e Europa (*e.g.*, Alberta-Pacific, Domtar Corporation, Northway, Borregaard LignoTech, MeadWervaco, Lennox Polymers Ltd, KMT, Technaro GmbH e Innventia) têm sido muito ativas na pesquisa para promover a utilização de lignina em escala industrial e estão produzindo

diferentes tipos de produtos como, por exemplo, produtos químicos, adesivos, películas agrícolas, revestimentos, fibras de carbono, entre outros.^{7,28}

Tabela 2.1 - Materiais derivados da lignina de acordo com produtos e potenciais aplicações.

Tipo de lignina	Produtos	Potencial aplicação
Kraft; Lignossulfonato; Organosolve; Soda; Pirólise; Explosão de vapor; Lignina hidrolisada.	Biochar, bio-óleo, gás de síntese, carvão ativado, fibras de carbono, negro de fumo.	Compósitos poliméricos leves, adsorventes, dispositivos eletroquímicos, automotivos.
Kraft; Lignossulfonato; Organosolve; Soda; Pirólise; Explosão de vapor; Líquido iônico;	Monômeros e dímeros de lignina, fenóis aromáticos, alquilfenóis, aldeídos aromáticos, álcoois aromáticos, ácidos, aril cetonas, antioxidantes, dispersantes, poliuretanos, adesivos, resinas fenólicas, vanilina.	Produtos químicos industriais, adesivos de base biológica, materiais multifuncionais, blocos de construção para produtos de base biológica.
Kraft; Organosolve.	Resina de impressão 3D (surfactante catiônico), andaimes, nanotubos de lignina, hidrogéis, nanotubos de lignina.	Aplicações biomédicas, engenharia de tecidos, administração de medicamentos.
Kraft; Organosolve; Líquido iônico;	Li-ion, Na-ion baterias (eletrodos), supercapacitores, células solares, dispositivos de energia, bateria, células de combustível.	Dispositivos de energia, bateria, células de combustível.
Kraft; Lignossulfonato; Organosolve; Soda; Líquido iônico.	Condicionador de solo, fertilizantes e pesticidas de liberação controlada, agente sequestrante, absorvente de contaminante, retardante de fogo.	Pavimentos de construção, cimento agricultura, têxteis, recuperação de solo, purificação de água, supressão de incêndio.

Adaptado de Hodásová et al. (2015) e Bajwa et al. (2019).^{7,88}

2.4 Líquidos iônicos

Os líquidos iônicos (LIs) são compostos formados por um cátion orgânico e um ânion inorgânico ou orgânico e apresentam uma temperatura de fusão inferior geralmente a 100°C.⁸⁹ A síntese é um campo que está crescendo significativamente, justamente pelo fato de que existem um grande número de cátions e ânions que podem ser combinados, portanto, são solventes altamente customizáveis, e consequentemente, com uma ampla gama de aplicações.¹⁹

LIs já são aplicados em 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.^{19,90–92}

Os LIs são subdivididos em dois grupos: líquidos iônicos próticos (LIPs) e líquidos iônicos apróticos (LIAs). Os líquidos iônicos próticos (LIPs) são sintetizados através da reação de neutralização estequiométrica com ácidos e bases de Brønsted (Eq. 1), que atribui uma característica única, um próton disponível no cátion. Os demais LIs são classificados como apróticos (LIAs).



Os cátions mais comuns na síntese de LIPs podem incluir aminas primárias, secundárias e terciárias e ânions orgânicos (carboxilatos) e inorgânicos (nitrato ou hidrogenossulfato). Essa gama de combinações pode gerar propriedades de interesse para o mercado em diversas áreas, além desses LIs serem um grupo que se encontra em crescimento. Como reportado Greaves et al. (2008, 2015)^{19,91}, recentemente houve um aumento no número de publicações abordando o uso de eletroquímica e aplicações biológicas¹⁹.

A maioria dos LIPs são considerados ambientalmente e economicamente amigáveis porque não requerem etapas de purificação e não há geração de resíduos e subprodutos, perda de solventes e emissão reduzida de CO₂. Em contraste, os LIs de imidazol, que são LIAs comumente aplicados ao fracionamento de biomassa, apresentam custos de produção mais elevado por questões de purificação e ambientes controlados. Os LIPs apresentam propriedades interessantes como pressão de vapor próxima de zero, alta condutividade e, diferentemente dos LIAs, apresentam um hidrogênio ionizável.

A caracterização dos LIs pode ser realizada por análises físico-químicas que incluem ponto de fusão, ponto de ebulição, temperatura de decomposição, densidade, índice de refração, tensão superficial, viscosidade, condutividade iônica, entre outros. A estabilidade térmica é avaliada por valores de temperatura de decomposição definidos pela perda de massa de 10% do LI, usando análise termogravimétrica. Os ânions apresentam a principal influência para uma maior estabilidade térmica, principalmente ânions com poucas interações com outros íons. Uma exceção é o ânion formiato, que apresenta uma menor estabilidade térmica devido a uma reação de condensação.^{93–95}

A viscosidade, considerada a principal característica dos LIs, é dependente das interações íon-íon, interações van der Waals e ligações de hidrogênio, com maiores interações levando a maiores viscosidades. A estrutura do ânion tem um efeito muito maior sobre a viscosidade do que o cátion. Em LIPs, os cátions aumentam a viscosidade com o aumento do comprimento da cadeia alquila, ou também com substituição de hidroxila ou metila na cadeia.⁹¹

Os artigos mais completos sobre LIPs são de Greaves e Drummond^{19,91}, que apresentam aproximadamente 315 sínteses de LIPs com cátions de grupos alquilamônio, imidazólio e heterocíclico combinados com uma gama de ânions, suas respectivas propriedades térmicas e aplicações. Outro trabalho é o de Bicak⁹⁴, que sintetizou um LIP a partir da neutralização de monoetanolamina com ácido fórmico. Greaves et al. (2006)⁹⁵ propuseram diferentes LIPs a partir de aminas primárias com ácidos inorgânicos e orgânicos. Verdía et al. (2014)⁹⁶ sintetizaram LIPs a partir da mistura de 1-butilimidazol 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)⁹⁷ 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. Pin et al. (2019)¹⁷ realizaram uma triagem de onze LIPs combinando cátions com aminas primárias, secundárias e terciárias e ânions acético e hidrogenossulfato para verificar o comportamento da biomassa em meios ácidos e alcalinos.

Os autores citados afirmam que esses LIPs possuem uma elevada estabilidade térmica, reduzindo o risco de degradação, além de evitar resíduos associados ao processo. É enfatizado também o baixo custo baseado nas estruturas utilizadas²¹ e a simplicidade de síntese¹⁶ dos LIPs, vistos como uma vantagem que impulsiona o interesse do mercado, além de não haver formação de subprodutos e serem solúveis em água.^{91,98} Além disso, a reciclagem de LI é possível devido à sua estabilidade térmica e permite a redução dos custos de pré-tratamento e mitigação dos efeitos ambientais.^{21,22,99,100} A reciclagem do solvente é obrigatória para se obter um processo economicamente viável, e até o momento, já foi demonstrado que é possível reciclar um líquido iônico mantendo sua capacidade de solubilizar a lignina da biomassa na mesma medida.^{21,25}

2.5 Pré-tratamento com líquidos iônicos

A eficiência de separar os macrocomponentes das biomassas lignocelulósicas, incluindo a lignina, é um parâmetro crucial, uma vez que impulsiona a conversão das frações no desenvolvimento do produto final.⁸⁸ Diversos processos de pré-tratamentos podem ser empregados a fim de modificar/solubilizar as frações da biomassa lignocelulósica, cujos rendimentos e custos variam de acordo com o tipo de biomassa, processo de separação e condições operacionais do pré-tratamento. Alguns métodos visam solubilizar parcialmente a lignina e diminuir a cristalinidade da fração celulósica ou, dependendo do tipo de pré-tratamento, promover a solubilização da fração hemicelulósica da biomassa.^{92,101}

Diferentes métodos de pré-tratamentos têm sido desenvolvidos, cada um com suas vantagens e desvantagens. Como exemplo, podemos citar o processo de explosão à vapor com amônia (AFEX), que aumenta a área superficial da biomassa, mas apresenta baixa eficiência de extração em biomassas com altos teores de lignina; o ácido diluído, que solubiliza altas frações de hemiceluloses, mas baixas frações de lignina, e o processo organossolve, onde pode ser observada uma alta solubilização da fração de lignina, mas que acarreta um alto custo no processo.¹¹ No geral, procedimentos alcalinos e empregando solventes orgânicos são os métodos mais eficientes para extração de lignina, a qual pode ser usada como uma macromolécula inalterada ou pode ser posteriormente modificada, por meio de processos de despolimerização (ou fragmentação), em formas mais simples e utilizáveis.⁸

Um pré-tratamento efetivo está relacionado com a baixa degradação da celulose, promoção de um material altamente hidrolisável e diminuição do consumo de energia e de reagentes. Estudos recentes apontam o desenvolvimento do processamento de biomassa lignocelulósica com LIs.^{16,17,25,102,103} Este pré-tratamento mostra a facilidade do solvente em interagir com a biomassa, a alta efetividade na dissolução de frações da mesma e um reagente que pode ser reciclado dentro do processo, além das perspectivas de chegarem ao preço de pré-tratamentos mais baratos ao longo dos anos.^{3,9,21}

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.¹⁰⁴ Uma alternativa atual são os LIs, considerados de grande potencial frente aos demais pré-tratamentos encontrados em literatura, pois alguns deles apresentam uma alta eficiência na solubilização de lignina e acessibilidade de celulose na etapa de hidrólise enzimática, além do solvente ser considerado reciclável e reutilizável no processo.^{3,96} Alguns LIs podem diminuir a

cristalinidade da celulose, aumentar a solubilidade da lignina e ainda manter a fração hemicelulósica junto à biomassa.^{16,21}

A forma de interação do LIP com a biomassa ainda é considerada uma caixa preta na literatura e os autores partem de suposições baseadas na combinação dos cátions e ânions formados, pois a força e a direcionalidade de interações entre os LIPs e os principais componentes da biomassa ainda é objeto de debate. Os cátions possivelmente têm 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.^{3,105} Uma característica importante do cátion é o tamanho de sua cadeia, neste caso a interação é facilitada quando a cadeia for menor, consequentemente penetrando mais facilmente nas fibras.¹⁶

A interação do ânion com a biomassa também pode ser observada. Os ânions acetato, formiato, propionato e lactato apresentam alguns resultados eficazes e isto pode estar ligado à interação com grupos hidroxila a partir da formação de fortes ligações de hidrogênio. Em contrapartida, o hidrogênio ionizável do LIP pode competir com um grupo hidroxila do mesmo, se houver, diminuindo o ataque às hidroxilas.^{3,91,104,106-108} Alguns autores afirmam que ânions de cadeia orgânica pequena combinados com cátions pequenos podem interagir de forma mais eficiente com os grupos hidroxilas da celulose, pois os ânions interagem com os grupos hidroxilas, competindo com as interações entre as lamelas da celulose, separando as cadeias e seus vizinhos laterais^{3,91,105,109}. Já quando o ânion é combinado com cadeias de cátions maiores, consequentemente podem ser geradas interações de Van der Waals e ligações de hidrogênio mais intensas que dificultam a interação com o meio.^{105,110}

As hemiceluloses, em alguns casos, são mantidas junto à biomassa lignocelulósica, sem a necessidade de sua recuperação na fração líquida, o que para alguns processos, pode ser desejável.¹⁶ Além disso, o LIP muitas vezes consegue agir de forma eficiente na solubilização da lignina, podendo esta ser recuperada por precipitação no licor extraído após o pré-tratamento.^{3,16} A recuperação da lignina é uma das vantagens do pré-tratamento com LI, grande influência da sua solubilização é devida à natureza do ânion.¹¹¹ Essa fração pode ser considerada para produtos químicos de maior valor agregado, que podem diminuir alguns custos do processo como um todo.^{112,113}

Os LIPs em geral podem ser considerados de baixo custo para o processo de pré-tratamento de biomassa lignocelulósica.⁹⁷ Brandt-Talbot et al. (2017)²¹ apresentaram o custo

de LIP de aproximadamente US\$ 0,50 por kg de LIP quando combinado com o processo de recuperação e reciclo de 99% no pré-tratamento, valor esse abaixo do estimado por Klein-Marcuschamer et al. (2011)¹¹³, entre US\$ 2,50 a 50 por kg de LI para LIAs.

Apesar dos custos ainda não serem atraentes, os LIs estão se encaminhando para se tornarem competitivos no mercado, especialmente por promoverem resultados competitivos quando comparados com outras tecnologias de pré-tratamento. Verdía et al. (2014)⁹⁶ utilizaram o hidrogenossulfato de 1-butilimidazólio [C₄mim:H₂SO₄] com razões molares ácido-base de 1,00:0,99 diluídos em água (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. Brandt-talbot et al. (2017)²¹, também trabalharam com *Miscanthus giganteus* e após 168 h de hidrólise obtiveram 77% de rendimento de glicose no pré tratamento com hidrogenossulfato de trietilamônio a 120°C por 8 h e 20% de água. Os autores citados utilizaram no máximo 10% de sólidos durante a etapa de pré-tratamento e 1% na hidrólise enzimática. Os tempos utilizados, tanto de pré-tratamento quanto de hidrólise, são considerados longos, o que pode favorecer o maior rendimento de hidrólise enzimática e, quando combinados com a adição de água no pré-tratamento, resultaram em conversões de celulose mais elevadas.^{21,96}

Temperaturas mais elevadas podem ser usadas para diminuir o tempo de pré-tratamento, entretanto deve-se ter cuidado para minimizar as reações secundárias e manter a estabilidade da molécula do LI utilizado sem degradação¹¹⁴. Já a adição de água é o diferencial, pois quantidades apreciáveis adicionadas ao processo podem contribuir de forma eficaz ao pré-tratamento com LIPs, eliminando a necessidade de condições anidras e diminuindo quantidades excessivas de LI no processo. Brandt et al. (2015)¹¹⁵ comentam que a interação da água e do LIP gera um mecanismo onde o próton com maior mobilidade pode estar mais disponível no processo.

Rocha et al. (2017)¹⁶ utilizaram 15% de água no pré-tratamento de bagaço com 2HEAA (acetato de 2-hidroxietanolamônio) por 2 h a 150°C, seguido de hidrólise enzimática (Cellic Ctec2) por 48h e obtiveram 77,4% de conversão de celulose. Além da promissora conversão, esse LIP apresenta alta eficiência na solubilização de lignina e mantém as hemiceluloses na biomassa pré-tratada. Pin et. al. (2019)¹⁷ avaliaram alta solubilização de lignina do bagaço utilizando utilizando ânion acetato [Ac], este considerado promissor na solubilização de celulose, uma vez que combinado de maneira correta com o cátion pode gerar

altas conversões de celulose junto à solubilização de lignina.^{6,116} Rashid et al. (2016)¹¹⁷ obtiveram solubilizações de 70%, 64% e 55% (m/m) de lignina para os LIs com ânion formiato, acetato e propionato, respectivamente, combinados com cátion piridínio à temperatura de 75°C. O aumento do comprimento da cadeia do ânion resultou na diminuição da solubilidade da lignina.

O uso de LIPs para processamento da biomassa lignocelulósica é uma alternativa promissora pela alta solubilização de lignina e, conseqüentemente, altas conversões de açúcares na hidrólise enzimática posterior. O *design* dos solventes (combinação cátion/ânion) é desejável para obter diferentes produtos, principalmente alterar quimicamente a estrutura da lignina obtida, tornando-a mais interessante do ponto de vista econômico e em termo de novas aplicações.

2.6 Hidrólise enzimática e fermentação alcoólica

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.¹¹ A produção destes açúcares depende do complexo enzimático escolhido, da estrutura física da biomassa e da remoção de lignina, que favorece a melhora do desempenho do processo de hidrólise, embora não seja imprescindível.

Zheng et al. (2009)¹¹⁸ e Alvira et al. (2010)¹¹ afirmam que a hidrólise enzimática é considerada a chave para a produção de E2G 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.^{9,119}

As enzimas são consideradas os agentes mais importantes no processo de hidrólise. As enzimas celulasas, que são altamente específicas, são utilizadas na conversão da fração celulósica em glicose. As celulasas são um complexo enzimático cujos três maiores grupos envolvidos no processo são: endoglucanases; exoglucanases e β -glucosidases¹²⁰. Esse complexo trabalha em sinergia, onde as enzimas endoglucanases agem de forma aleatória, clivando a ligação do tipo β -1-4 entre duas moléculas de glicose dentro da cadeia de celulose, enquanto 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.¹²¹

Dependendo da composição da biomassa a ser hidrolisada, enzimas acessórias (lacases, peroxidases, galactanase, mananases, liase e pectinase) também se fazem necessárias. A presença dessas enzimas acessórias torna a celulose mais acessível ao ataque enzimático, algumas até promovem a dissolução da hemicelulose e a degradação da celulose^{122,123}.

Para alcançar altos rendimentos na hidrólise enzimática há diversos fatores que devem ser levados em consideração, entre eles concentração de sólidos, agitação, temperatura, pH e carga enzimática. Altas concentrações de sólidos implicam em um aumento da inibição enzimática por produto, portanto a hidrólise é conduzida normalmente em torno de 10-15% de sólidos¹²⁴. A agitação em torno de 150-200 rpm ajuda a quebrar a dificuldade de mistura do meio reacional, principalmente em cargas de sólidos mais elevadas. A temperatura e o pH apresentam faixa ideal de 50-60°C e de 5-6, respectivamente, para desempenho eficiente da enzima^{42,121,125-127}. Por fim, a relação enzima-substrato é 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^{42,125,127,128}, entretanto atividades na faixa de 10-15 FPU/g de substrato são os valores limites para que o processo seja economicamente viável em processos industriais¹²⁹. Atualmente, o principal coquetel enzimático comercial utilizado é o Cellic CTec da Novozymes, produzido a partir de fungos e suplementado com outras enzimas, a fim de se obter formulações otimizadas eficientes.¹³⁰

A busca por condições cada vez mais eficientes e que se adequam às condições necessárias para cada etapa do processo de produção do etanol lignocelulósico tem se intensificado. Além de estudos no processo de hidrólise^{131,132}, podem ser obtidos melhores resultados conduzindo a etapa de hidrólise simultaneamente à fermentação (SSF), ou realizar as duas etapas separadamente (SHF). Neste trabalho, a hidrólise e a fermentação foram realizadas em unidades independentes, sendo a principal vantagem desse processo a possibilidade de se conduzir ambas as etapas em condições ótimas de pH e temperatura, além de ser possível reciclar a biomassa na etapa de fermentação, o que é necessário para minimizar custos.

A fermentação alcoólica é um processo biológico no qual açúcares são convertidos por microrganismos em E2G e CO₂. O bagaço geralmente contém os seguintes açúcares principais, D-glicose da celulose e D-xilose das hemiceluloses. Atualmente, a produção de etanol combustível nas destilarias brasileiras é realizada pela levedura *Saccharomyces*

cerevisiae, método bem estabelecido capaz de metabolizar e converter as hexoses em etanol, processo conhecido como etanol de primeira geração (1G).¹³³ No entanto, a *S. cerevisiae* é incapaz de fermentar pentoses (C5), o segundo açúcar mais abundante na natureza, reduzindo o rendimento potencial de etanol de biomassa lignocelulósica.^{134,135}

A fermentação de açúcar hemicelulósico é fundamental para a conversão econômica da biomassa lignocelulósica em biocombustíveis. Entre as espécies selvagens que fermentam xilose encontradas na literatura, as leveduras mais comuns são *Scheffersomyces stipitis* e *Spathaspora passalidarum*, que são consideradas as cepas mais interessantes por sua capacidade de fermentar xiloses e glicose a etanol. Por outro lado, ainda existem alguns desafios técnicos, como baixa tolerância ao etanol, em torno de 30 a 35 g/L, preferência em primeiro metabolizar a glicose, consequentemente reduzindo a taxa de captação de xilose e a existência da necessidade de controle do fluxo de oxigênio para o equilíbrio redox.^{136–138}

Com o intuito de resolver problemas de consumo dos açúcares. Farias e Maugeri (2019) utilizaram combinação de leveduras (*S. cerevisiae*, *S. stipitis* e *S. passalidarum*) para fermentar hexoses e pentoses com o interesse de melhorar a produção de etanol a partir do bagaço. Estes autores sugeriram que a eficiência melhorada e boa escalabilidade do processo de fermentação de ambos os açúcares é uma base importante para a viabilidade econômica da produção de bioetanol a partir de lignoceluloses. Outra forma de melhorar os resultados de consumo de açúcares disponíveis é o uso de cepas modificadas para obter melhores resultados e até mesmo para resolver um problema específico. Hahn-Hägerdal et al. (2007)¹³⁹ revisaram diversas modificações genéticas de *S. cerevisiae* capaz de fermentar todos os açúcares disponíveis. No entanto, alguns desafios permanecem, como a afinidade da levedura pela xilose ser muito mais baixa do que a glicose e o microrganismo ser mais sensível a substâncias tóxicas¹⁴⁰.

Atualmente, a produção de etanol depende fortemente da levedura utilizada na fermentação de carboidratos. Por outro lado, alguns dos compostos formados durante o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica têm um potencial efeito inibitório no processo de fermentação. Esses compostos oriundos de decomposição de açúcar e degradação de lignina são ácidos alifáticos (acéticos), furaldeídos (furfural e 5-hidroximetilfurfural) e compostos aromáticos^{141–143}. A concentração desses compostos varia com o tipo de matéria-prima, materiais e condições de pré-tratamento, mas são comumente observados em pré-tratamentos ácidos^{134,135,143}. Em contrapartida, hidrolisados obtidos de pré-tratamentos com líquidos iônicos

(alcalinos) praticamente não apresentam tais inibidores, principalmente quando comparado aos hidrolisados obtidos de pré-tratamentos ácidos, que apresentam concentrações de inibidores que podem reduzir o rendimento de etanol em 80%, necessitando de uma etapa de destoxificação para minimizar este problema, o que aumenta os custos do processo.¹⁴⁴

CAPÍTULO 3

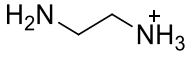
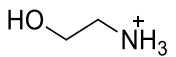
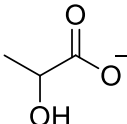
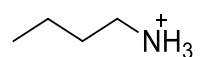
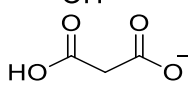
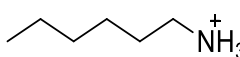
3. Metodologia experimental

Neste capítulo são apresentadas as metodologias utilizadas ao longo do estudo, desde síntese dos 20 LIPs até especificações das análises das ligninas realizadas em parceria com o LNBR/LNBio/CNPEM em Campinas/SP e a University of Tennessee/Oak Ridge National Laboratory nos EUA (2D HSQC NMR, ^{31}P NMR, GPC, FTIR, TGA, Py-GC/MS e análise elementar), assim como a descrição das etapas de pré-tratamento, hidrólise enzimática e fermentação. Os detalhes dos procedimentos realizados estão descritos nos Apêndices.

3.1. Síntese e análise dos LIPs

O estudo avaliou 20 LIPs oriundos da combinação de ácidos acético, fórmico, láctico e malônico com as bases etilamina, etanolamina, etilenodiamina, butilamina e hexilamina. Na Tabela 3.1 são apresentadas as estruturas de cátions e ânions com suas respectivas siglas e nomes.

Tabela 3.1—Cátions e ânions.

Cátions			Ânions		
Nome	Fórmula molecular	Abreviação	Nome	Fórmula molecular	Abreviação
Etilamina		[Eti]	Acetato		[Ac]
Etilenodiamina		[Etid]	Formiato		[For]
Etanolamina		[2He]	Lactato		[Lac]
Butilamina		[But]	Malonato		[Mal]
Hexilamina		[Hex]			

Todos os LIPs foram sintetizados no Laboratório de Engenharia de Processos Fermentativos e Enzimáticos (LEPFE), da Faculdade de Engenharia Química (FEQ) na UNICAMP. As sínteses foram baseadas no trabalho de Rocha et al. (2017)¹⁶ e foram realizadas

pelo método de neutralização ácido-base, utilizando uma razão equimolar. A base foi adicionada em um reator de vidro encamisado de 500 mL com uma tampa de três bocas, sendo acoplada a um funil de decantação com gotejador para o ácido e um agitador mecânico (Marconi, MA-259) com agitação de 120 rpm. O reator foi resfriado por banho termostático (Marconi, MA-184) com circulação de água na camisa para manter a temperatura em 5°C, pois a reação é exotérmica. O ácido foi gotejado no reator pelo funil de decantação para não haver excesso de aquecimento no momento da reação. Após a síntese, foram realizadas análises para obtenção de dados físico-químicos dos solventes, como concentração de água, usando titulador Karl Fischer; espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR); análise termogravimétrica (TGA), determinação do pH e cálculos de acidez, basicidade e net-basicity. Os procedimentos analíticos e descrições detalhadas de cada análise e cálculos foram apresentadas no Apêndice B.

3.2. Preparação e caracterização química do bagaço

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado nos experimentos foi fornecido pela usina Santa Maria, localizada município de Manduri, no estado de São Paulo. O bagaço foi obtido após a extração do caldo de cana e mantido em uma pilha descoberta, proveniente de cana colhida durante a safra de 2016/2017. O material foi seco em temperatura ambiente e armazenado em sacos plásticos em ambiente ausente de umidade para posterior utilização.

A caracterização do bagaço *in natura* (Tabela 3.2) e após cada etapa de pré-tratamento foi realizada no LNBR e o Laboratório de Bioenergia (Bioen), localizado na FEQ/Unicamp, e foram quantificados os teores de cinzas, extrativos, celulose, hemiceluloses e lignina. As metodologias são baseadas em Sluiter et al. (2016)¹⁴⁵ e os detalhes apresentados analíticos foram apresentados no Apêndice C.

Tabela 3.2 – Dados para bagaço *in natura*.

Composição	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Cinzas (%)	Extrativos (%)
	33,9 ± 0,9	21,75 ± 0,6	25,2 ± 0,9	4,4 ± 0,0	8,98 ± 0,0
Hidrólise enzimática	Concentração (g/L)		Conversão (%)		
	Glicose	Xilose	Glicose	Xilose	
	7,25 ± 0,61	2,78 ± 0,48	15,13 ± 0,58	10,43 ± 0,37	

3.3. Pré-tratamento

Em uma primeira etapa foi realizado um estudo com 20 LIPs projetados com a intenção de avaliar o efeito do tamanho da cadeia e a influência dos diferentes radicais do cátion e também da interação de diferentes grupos de ânions. Baseado nas análises de TGA dos LIs foi possível determinar a temperatura de degradação (T_{onset}) correspondente a cada LIP e determinar qual a maior temperatura do pré-tratamento que poderia ser usada sem que ocorresse a degradação do LIP ($\sim 10^\circ\text{C}$ abaixo da T_{onset}), conforme apresentado na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 - Temperaturas de pré-tratamento.

LIP	Temperatura (°C)
[Etid][For]	90
[Eti][Ac]	105
[Eti]For]	120
[But][Ac]	125
[Eti]Mal]; [Etid][Lac]	130
[Hex][Ac]; [Hex][For]	135
[Etid][Ac]; [But][For]; [But][Mal]	140
[Hex][Mal]	145
[2He][Mal]	150
[Eti]Lac]	155
[Etid][Mal]; [2He][For]; [2He][Lac]	160
[But][Lac]; [Hex][Lac]	165
[2He][Ac]	175

Os pré-tratamentos com os diferentes PILs sintetizados foram realizados na temperatura máxima determinada (Tabela 3.3) e empregando o bagaço de cana sem passar por qualquer etapa de moagem ou lavagem, com 10% (m/m) de sólido (base seca), por 2 h e com uma razão LIP:H₂O de 5:1 (m/m), com base no trabalho de Rocha et al. (2017)¹⁶. Esses ensaios foram realizados para se determinar quais os LIPs mais promissores com base na solubilização de lignina e na conversão na hidrólise enzimática (item 3.4). Os detalhes do procedimento de pré-tratamento foram apresentados no Apêndice D.

Após determinar quais os solventes mais promissores em termos de recuperação de açúcares fermentescíveis após a etapa de hidrólise enzimática e solubilização da lignina no pré-tratamento, três planejamentos experimentais, um para cada um dos solventes, foram realizados com o intuito de otimizar a conversão dos polissacarídeos e solubilização de lignina,

considerando o tempo e a temperatura como fatores. Na Tabela 3.4 podem ser observadas as condições do planejamento realizado com 10% (m/m) de sólidos (base seca) e razão LIP:H₂O de 5:1 (m/m).

Tabela 3.4 - Planejamento experimental do pré-tratamento com LIPs [Etid][Ac], [Etid][Lac] e [2He][Lac].

LIP	Temperatura (°C)			Tempo (h)		
	Nível					
	-1	0	+1	-1	0	+1
[Etid][Ac]	120	130	140	1	2	3
[Etid][Lac]	110	120	130			
[2He][Lac]	140	150	160			

Nesta etapa, o LIP [2He][Ac] também alcançou resultados competitivos para um solvente promissor, mas não foi selecionado por já ter estudos concretos dentro do grupo de pesquisa por Rocha et al. (2017)¹⁶ e Nakasu et al. (2020;2021)^{25,146} no tema pré-tratamento, hidrólise enzimática e fermentação.

3.4. 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. Tanto na etapa de *screening* com todos os LIPs quanto na otimização do pré-tratamento com os 3 LIPs escolhidos (Tabela 3.4), as hidrólises foram realizadas por 72 h para se obter o máximo de açúcares fermentecíveis das amostras. Todas as hidrólises foram realizadas em shaker orbital (Marconi, MA 832) a 10% (m/m) de sólidos, em tampão citrato 0,05 mol/L, pH 4,8, à 50°C e 150 rpm, empregando uma carga enzimática de 15 FPU/g de bagaço (Cellic Ctec2, Novozymes). Os detalhes do procedimento experimental da etapa de hidrólise foram descritos no Apendice D.

3.5. Fermentação

A partir do planejamento experimental realizado de acordo com a Tabela 3.4 foi escolhida a condição que apresentou o melhor desempenho no pré-tratamento e na hidrólise

enzimática para cada LIP avaliado. Os ensaios foram realizados empregando *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907, estocada em meio Ágar YPD a 4°C, capaz de metabolizar xilose e glicose. Inicialmente foram realizadas as etapas de pré-inóculo, inóculo e propagação de célula, conforme detalhes do procedimento experimental descritos no Apêndice D.

A fermentação foi realizada em erlenmeyer de 500 mL, com 200 mL de meio, em shaker, nas condições de 30°C e 150 rpm. O meio continha (g/L): células em suspensão (8,0); hidrolisado (50,0); extrato de levedura (3,0); ureia (2,3) e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1,0). A fermentação foi mantida até os açúcares presentes no meio serem consumidos, e alíquotas de 2 mL eram retiradas periodicamente para análise de concentração de açúcares, etanol, ácido acético, glicerol e xilitol em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os parâmetros calculados para avaliar a performance da fermentação foram: rendimento (η), produtividade volumétrica do etanol (Q_P), conversão de açúcar em etanol ($Y_{P/S}$) e em biomassa celular ($Y_{X/S}$). Todas as equações foram apresentadas no Apêndice D.

3.6. Caracterização das ligninas

As ligninas recuperadas em cada um dos processos de pré-tratamento (Apêndice E) foram caracterizadas por ressonância magnética nuclear 2D, usando correlação heteronuclear de quantum único (2D HSQC NMR); Ressonância magnética nuclear do fósforo (^{31}P NMR), pirólise acoplada a cromatografia a gás/espectrometria de massas (Py-GC/MS); Cromatografia de permeação em gel (GPC); Espectroscopia no infravermelho por transformada de fourier (FTIR); Análise elementar, determinação da C_{900} fórmula, grau de insaturação (DOU), estruturas não condensadas (NCS) e análise termogravimétrica (TGA).

As análises 2D HSQC NMR, Py-GC/MS, TGA e FTIR foram realizadas no Laboratório de Biociências (LNBio) e Laboratório Nacional de Biorenováveis (LNBR), pertencentes ao Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), localizado em Campinas, SP/Brasil, como auxílios à usuário externo. A análise de GPC foi realizada no grupo do Dr Jason P. Hallet da Imperial College/Londres durante doutorado sanduíche de um dos membros do grupo de pesquisa.²⁶ As análises 2D HSQC NMR, ^{31}P NMR, GPC e FTIR foram realizadas durante o período de pesquisadora visitante da autora no grupo do Dr. Arthur Ragauskas na Universidade do Tennessee - Knoxville e no Laboratório Nacional de Oak Ridge (ORNL) nos Estados Unidos da América.

As ligninas obtidas a partir do estudo de screening de pré-tratamento foram analisadas empregando todas as técnicas mencionadas, enquanto as ligninas obtidas dos planejamentos experimentais foram analisadas empregando as técnicas de 2D HSQC RMN, ^{31}P RMN, GPC e FTIR. As análises de GPC nesta segunda fase foram realizadas no grupo do Dr. Ragauskas e, sendo assim, foi considerada a inserção de uma etapa de acetilação das amostras de ligninas precipitadas, devido as demandas específicas do grupo de pesquisa. Os detalhes experimentais das análises foram descritos no Apêndice E.

CAPÍTULO 4

4. *Design de LIPs e a influência da sua estrutura no pré-tratamento*

Os LIPs, líquidos à temperatura ambiente, atraíram atenção ao longo dos anos pela gama de aplicações, principalmente na área de química verde. Estes LIs são qualitativamente diferentes, porque a sua ionicidade é ajustável em virtude das diferentes forças motrizes geradas pela transferência de prótons, o qual pode ser escolhido.¹⁴⁷ Esses solventes possuem a capacidade de ter sua função direcionada de acordo com suas características, já que a escolha de cátions e ânions geram diferentes características e estas podem atuar de forma a se correlacionar de forma positiva ou negativa aos resultados obtidos no pré-tratamento da biomassa.

O pré-tratamento é a etapa mais importantes entre as etapas de uma biorefinaria, mas também está entre as etapas mais caras, por isso é tão visada em estudos para otimizar e diminuir os custos do processo. O pré-tratamento usando LIPs tem o intuito de promover a susceptibilidade dos polissacarídeos à hidrólise enzimática e solubilizar a lignina para aproveitamento em outros fins de valor agregado.

Neste capítulo serão mostrados os resultados de síntese e caracterização dos LIs, juntamente com a sua atuação para o pré-tratamento de bagaço. O uso de distintos LIPs elucidam a influência da estrutura do cátion e do ânion no pré-tratamento do bagaço. Ele será apresentado na forma de um artigo que foi aceito na revista *Energy*¹⁴⁸. No final do artigo apresenta-se um item de considerações para fechamento e o supplementary information (SI) no Apêndice A.

4.1. Structural features of protic ionic liquids and their impact on pretreatment performance for 2G ethanol production

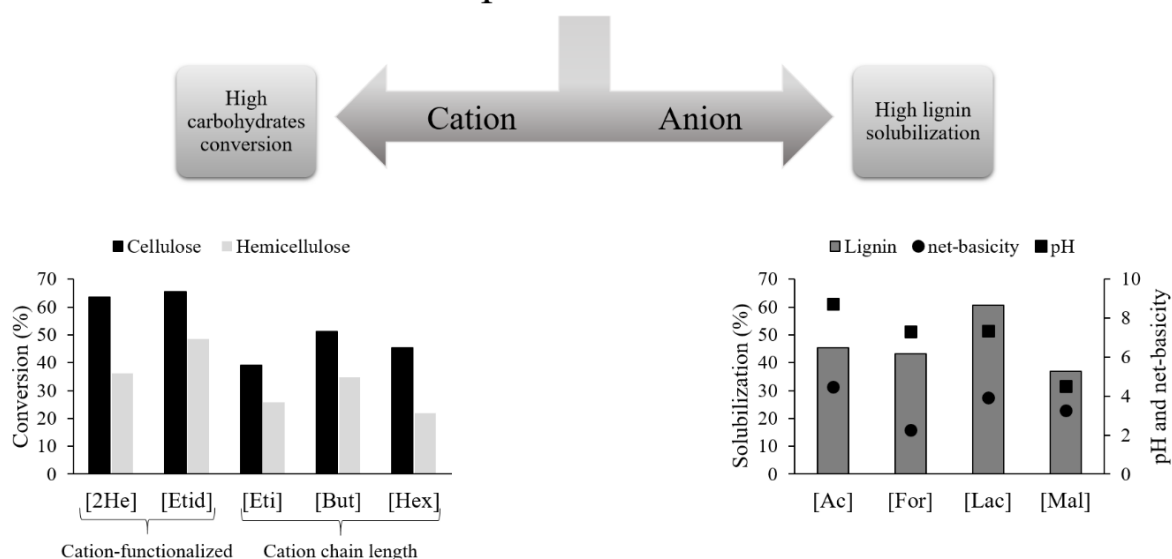
Thaynara C. Pin¹, Pedro S. Y Nakasu¹, Sarita C. Rabelo², Aline C. Costa^{*1}

¹Chemical Engineering School, University of Campinas - UNICAMP, Av. Albert Einstein, 500, Campinas, São Paulo, 13083-852, Brazil.

²Department of Bioprocess and Biotechnology, College of Agricultural Sciences, São Paulo State University (UNESP), Av. Universitária, 3780, Botucatu, São Paulo, 18610-034, Brazil.

*Corresponding author. E-mail: accosta@feq.unicamp.br and Tel: +55 19 3521 3959.

Biomass pretreatment with PILs



4.1.1. Abstract

Biomass pretreatment with protic ionic liquids (PILs) is a promising source of renewable energy and bioproducts, in which different cation/anion combinations may present different behavior towards biomass modification such as selective lignin and/or carbohydrate solubilization. The potential of 20 PILs as pretreatment agents was investigated, whose cations presented two different functional groups and different carbon chain lengths. The best solvent in terms of lignin solubilization during pretreatment was obtained by cations with a functional group (-OH and -NH₂). High cellulose conversion was obtained with ethanolamine and ethylenediamine monoacetate ([2He][Ac] and [Etid][Ac]), under different pretreatment conditions (175 °C and 140 °C for 2 h, respectively). The presence of an alkaline anion and a functionalized cation enhanced the pretreatment effectiveness. The results presented in this work will be useful to design novel protic ionic liquids for pretreatment applications in biofuel processes, which can also be integrated to produce bioproducts within the biorefinery concept.

4.1.2. Results and discussion

4.1.2.1. PILs analysis

TGA analysis showed increasing PIL mass loss (wt %) with temperature increase (Tabela 4.1). TGA graphs can be seen in Appendix A. Cations without functional groups showed positive correlation between stability and chain length, [Et] > [But] > [Hex]. [Et] was more prone to degradation when compared to [But] and [Hex], which can be observed by the mass loss in temperatures higher than 200 °C. The presence of functional groups in the cations, [Etid] and [2He], provided a higher thermal stability (presence of mass in the range 200°C - 400 °C) due to PIL interaction via hydrogen bonds. Such increase in thermal stability also was observed by Cao and Mu, (2014)¹⁴⁹, considering 66 ILs different.

Tabela 4.1 - The mass loss (%) for PILs on the temperature ranges employed in the TGA analyses.

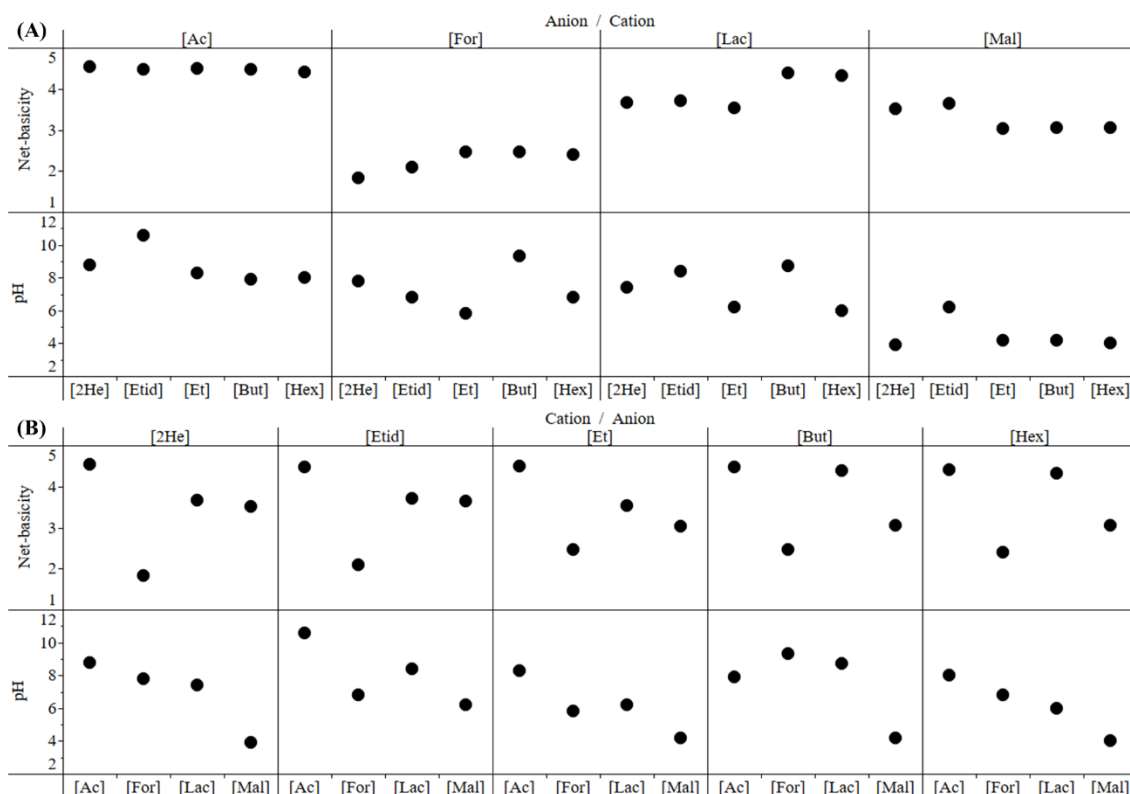
PIL	25-100°C	100-150	150-200°C	200-300°C	300-400°C
[Et][For]	20.0	58.3	-	-	-
[Et][Ac]	22.7	-	-	-	-
[Et][Lac]	15.5	30.7	73.6	-	-
[Et][Mal]	8.6	38.0	-	-	-
[2He][For]	2.7	7.7	31.2	-	-
[2He][Ac]	1.4	4.7	20.0	88.0	99.5
[2He][Lac]	5.0	10.9	20.3	97.2	99.8
[2He][Mal]	3.9	13.1	75.0	99.7	-
[Etid][For]	10.0	34.3	59.6	99.0	-
[Etid][Ac]	4.5	17.4	60.2	99.8	-
[Etid][Lac]	7.5	17.7	31.2	66.4	98.8
[Etid][Mal]	5.0	14.0	59.4	97.0	-
[But][For]	2.9	17.6	90.1	-	-
[But][Ac]	11.2	43.7	-	-	-
[But][Lac]	5.7	18.4	51.4	99.8	-
[But][Mal]	3.7	13.5	99.7	-	-
[Hex][For]	3.1	16.7	71.9	99.9	-
[Hex][Ac]	4.4	26.8	99.2	-	-
[Hex][Lac]	4.1	13.1	35.6	99.2	-
[Hex][Mal]	4.1	16.0	99.5	-	-

Where: “-“ means not analyzed.

Besides thermal stability, other physical and chemical properties can help understanding PIL:Biomass interactions^{17,108,150}. In this work, we focused on pH and net-basicity, once they can greatly impact on the biomass pretreatment performance^{151,152}. It can be noticed that anions (Figura 4.1a) have higher influence on the pH of the solutions when compared to cations (Figura 4.1b). The anions employed in this study are strong hydrogen bond bases (*e.g.*, [Ac] anion)¹⁵³.

Anion [Ac] is the most alkaline group (pH ~ 8.7 and net-basicity ~ 4.5), on the other hand, [Mal] have shown acidic conditions (pH ~ 4.5 and net-basicity ~ 3.2). Pretreatments with alkaline characteristics and higher net-basicity are better to solubilize lignin^{17,152}. Sun et al. (2017)¹⁵² observed high net basicity (1.7) and alkaline conditions (7.8) for ethanolamine acetate following high lignin removal (~65%) and Rocha et al. (2017)¹⁶ achieved ~ 50% of lignin removal in reaction using PILs under alkaline conditions.

Figura 4.1 - pH and net-basicity of PIL (15 wt % in H₂O) for pretreatment. (a) anion influence and (b) cation influence.



4.1.2.2. Biomass components solubilization in PILs

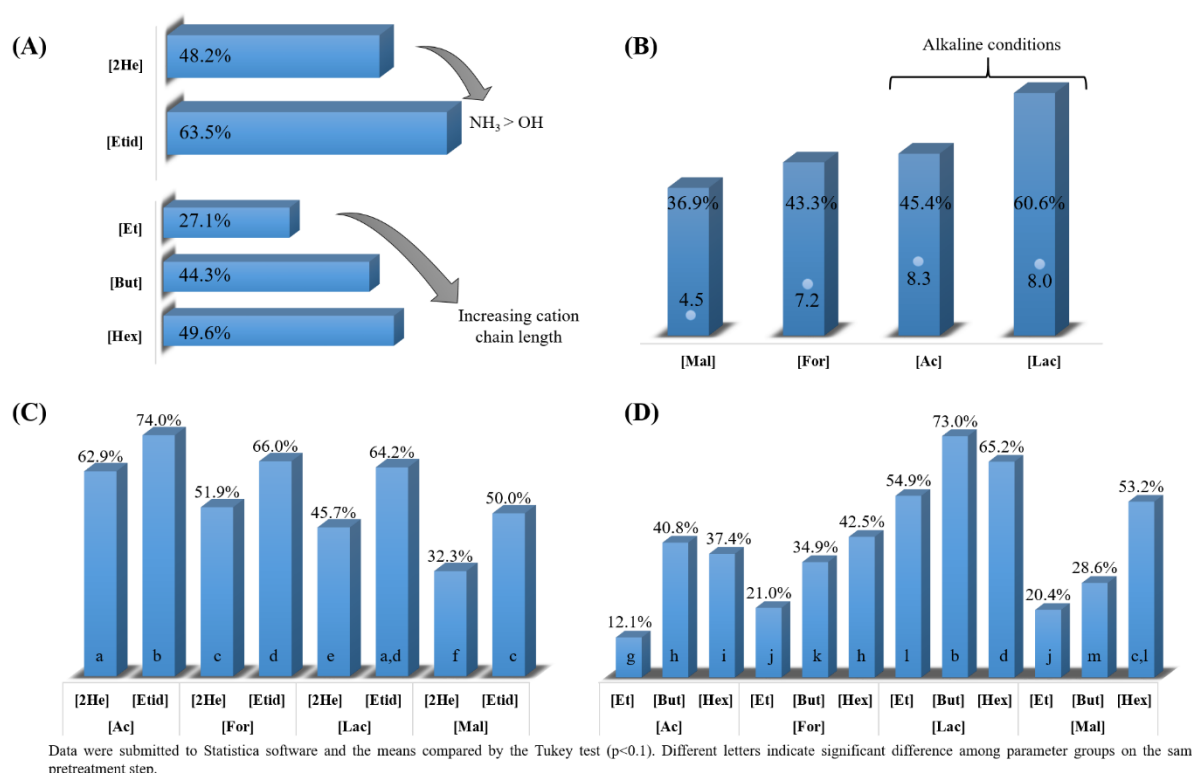
The solubility of lignin was determined and evaluated with respectively Tukey test and standard deviation for lignin solubilization were <0.8% (Figura 4.2). Cellulose and hemicellulose solubilization may be observed in SI, which shows that there was not a significant difference between the PILs studied.

Lignin solubilization was high in average (74.0 wt %) and, interestingly, carbohydrate solubilization of cellulose and hemicellulose was low. Cellulose solubility was less than 9 wt % and, for hemicellulose, the highest solubilization was 30% with [Etid][Ac]. George et al. (2015)⁹⁷ and Verdía et al. (2014)⁹⁶ used ILs with the anion [HSO₄⁻], which solubilized all the hemicellulose due the high severity of the pretreatment and the low pH associated with this anion.

Selectivity for lignin solubilization makes these PILs promising as pretreatment agents, as maintaining the carbohydrates in the solid fraction of the biomass is desirable for the

hydrolysis and fermentation steps. Carbohydrate solubilization for other common pretreatment with similar characteristic is diluted NaOH (130 °C, 30 min), 28.2% of cellulose and 56.1% of hemicellulose solubilization¹⁵⁴. PIL pretreatment can also lead to carbohydrate solubilization depending on the PIL choice and pretreatment conditions^{3,96,104}, as, for example, [2He][Ac] (75, 100, 125 and 150 °C, 3.5 h), 3% - 10% of cellulose and 12 - 52% of hemicellulose solubilization and [2He][Ocaproic] (75, 100, 125 and 150 °C, 3.5 h), 2% - 10% of cellulose and 11% - 48% of hemicellulose solubilization¹⁶. The selectivity of ILs is an important factor to preserve the carbohydrates and should be considered in the design step.

Figure 4.2 - Lignin solubilization (—) and pH (●) in the PILs pretreatment. (a) Influence of anion groups (values are means for each anion combined with all the cations considered). (b) Influence of cations groups (values are means for each cation combined with all the anions considered). (c) and (d) Results for the PILs.



It can be seen in Figure 4.2c and d that [Etid][Ac] and [But][Lac] showed the highest values of lignin solubilization, $74.0 \pm 0.0\%$ and $72.9 \pm 0.2\%$, respectively, which were not significantly different at the 90% confidence level by the Tukey test. These values were

followed by [Etid][For] ($66.0 \pm 0.3\%$), which was statistically equivalent to [Etid][Lac] ($64.1 \pm 0.3\%$) and [Hex][Lac] ($65.2 \pm 0.3\%$).

As for the cation-functionalized PILs, the lignin solubility showed a clear dependence on the functional group structures (Figura 4.2b). PILs with cation [Etid] showed an average lignin solubilization of 63.5% and PILs with cation [2He] of 48.2%. On the other hand, PILs with non-functionalized cation [Et] showed an average lignin solubilization of only 27.1%. Lignin solubility increased in the following order: [Et] < [2He] < [Etid], except for the anion [Lac]. [Et][Lac] showed good thermal stability and lignin solubility ($54.9\% \pm 0.2$) when compared with [Et] combined with other anions (<21.0%) (Figura 4.2c and d). This anion could be inducing the cleavage of different linkages in the lignocellulosic biomass, mainly in lignin, which can also impact on the reduction of the molecular weight¹⁵⁵. As observed in the literature^{17,152,155,156}, the anion seems to be the main influence of lignin solubilization, and the results of Figura 4.2a show the following order [Mal] < [For] < [Ac] < [Lac]. Pu et al. (2007)¹¹¹ studied the solubilization of lignin using various aprotic ionic liquids. They showed a tendency to increase lignin solubility with increasing anion basicity. The order found was [MeSO₄] > [Cl] ~ [Br]/[PF₆], all associated with the cation [BMIM]. These authors also concluded that ILs with large anions showed low solubilization for lignin, as is the case of the [Mal] anion evaluated in the present study.

A study by Jiang et al. (2021)¹⁵⁶ studied the structure of the PIL cholinium lysinate, [Ch][Lys], water and guaiacol (a lignin model residue) using neutron diffraction. The results have shown that the lysinate anion can interact with the lignin residue by hydrogen bonding with the phenol hydroxyl. Similarly, carboxylate anions, such as the ones employed in the present work, may play an important role on lignin deconstruction by interacting with the residues via hydrogen bonds, which has already been supported by Raj et al. (2016)¹⁵⁷ in a simulation with the aprotic IL [EMIM][Ac]. Rocha et al. (2017)¹⁶ showed that the PIL [2He][Ac] solubilized more than 70% of the lignin of sugarcane bagasse and Qin et al. (2015)¹⁵⁸ used pure ethylenediamine [Etid] in the pretreatment of corn stover, with nearly 80% of lignin solubilization.

In average lignin solubilization with PILs increased with the chain length of the cations (Figura 4.2b): [Et] < [But] < [Hex]. However, Figura 4.2c shows that in the case of PILs with anions [Ac] and [Lac], solubilization for PILs with cation [But] were higher than with cations [Et] and [Hex]. George et al. (2015)⁹⁷ using cations monoethylammonium,

diethylammonium and triethylammonium combined with $[\text{HSO}_4]^-$ and Rocha et al. (2017)¹⁶, using $[\text{2He}][\text{Ac}]$ and $[\text{2De}][\text{Ac}]$, observed that lignin solubilization decreased with increasing chain length. The difference in the results obtained in the present work can be due to different pretreatment conditions, as time and temperature.

Hart et al. (2015)¹⁵⁹ investigated the influence of some cations ($[\text{BMIM}]$, $[\text{EMIM}]$, $[\text{BPyr}]$, $[\text{BM}_2\text{IM}]$ and $[\text{tri-nbutyloctylammonium}]$) combined with the anion $[\text{CF}_3\text{SO}_3]$ on lignin solubilization and found that the hydrogen bond basicity of the anion and the nature of the cation play a major role in the solubilization. They claimed that planar cations may be more efficient to deconstruct cellulose, therefore maximizing molecular interactions.

Achinivu et al. (2014)¹⁶⁰ studied the solubilization of kraft lignin with PILs containing the anion $[\text{Ac}]$. They employed three quaternary ammonium cations: pyridinium (Py), 1-methylimidazolium (Mim) and pyrrolidinium (Pyr). All three PILs were very efficient in solubilizing lignin, with more than 50% (w/w) being solubilized after stirring at 90 °C and 24 h. The lignin extraction increased in the order $\text{Py} < \text{Mim} \ll \text{Pyr}$, which is also the increasing order of pKa of the bases, 5.13, 7.50 and 11.27. In the present work, as all bases have similar pKa (in the range of 9.47 (ethanolamine) to 10.78 (butylamine)), the difference in reactivity stems from the presence of the hydroxyl and amino functional groups (ethanolamine and ethylenediamine), which can interact with biomass through hydrogen bonds. In addition, there is an influence of the size of the carbon chain, with longer alkyl chains interacting more with lignin via van der Waals interactions.

In general, literature¹⁶¹ show that the anions impact the most on lignin solubilization. However, Hart et al. (2015)¹⁵⁹ suggested that although the anion is likely to influence the initial solubilization process and a minimum hydrogen bonding basicity is required for the solubilization to occur, it does not seem to play an important role in the solvation of the lignin in the ionic liquid when compared to the cation.

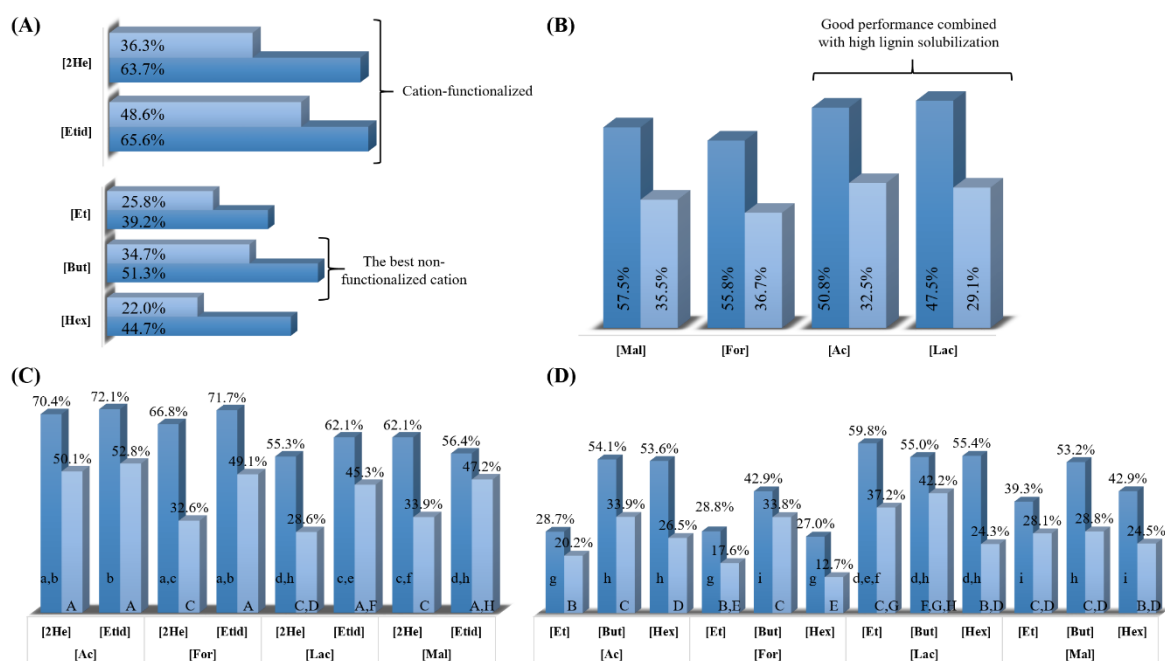
The degree of lignin extractability of ILs depends on a few factors. One of them is the pH¹⁷ and net-basicity¹⁵² can also impact on lignin solubilization (Figura 4.2b). As noted previously PILs with the anions $[\text{Ac}]$ and $[\text{Lac}]$ led to more alkaline conditions (8.7 and 7.4) and higher net-basicity (4.5 and 3.9), which led to higher lignin solubility (45.5% and 60.6%). Other authors^{16,17,102} observed that $[\text{Ac}]$ showed good performance in lignin solubilization. On the other hand, $[\text{Mal}]$ showed an average of 36.9% of lignin solubilization, as well as low pH (4.5) and net-basicity (3.2). The low lignin solubilization may be attributed to a low efficiency

in the breakage of β -O-4 linkages due to decarboxylation reactions that occur between PIL:biomass in the presence of the anion [Mal]¹⁶².

4.1.2.3. Influence of PILs on the enzymatic hydrolysis

To determine the enhancement of the biomass enzymatic digestibility after pretreatment with the different PILs, pretreated bagasse was subjected to enzymatic hydrolysis. The conversions were calculated based on quantifications of glucose and xylose at 48 h of reaction (Figura 4.3).

Figura 4.3 - Cellulose (—) and hemicellulose (—) conversion in the pretreatment with PILs. (a) Influence of anion groups (values are means for each anion combined with all the cations considered). (b) Influence of cations groups (values are means for each cation combined with all the anions considered). (c) and (d) Results for the PILs.



Data were submitted to Statistica software and the means compared by the Tukey test ($p < 0.1$). Different letters indicate significant difference among parameter groups on the same pretreatment step.

It can be seen in Figura 4.3b that in average cellulose conversion was higher for biomass pretreated with cation-functionalized PILs ([2He] and [Etid], which were statistically equivalent), except when the PIL anion was [Lac] (Figura 4.3c and d), in which case cellulose conversion was similar when pretreatment was performed with PILs with all the cations

considered, although [Etid][Lac] and [Et][Lac] showed the highest performance. This trend was the same for lignin solubilization, as can be seen in Figura 4.2, which is expected, as lignin forms a barrier that makes the enzyme access to the carbohydrates in biomass more difficult¹¹.

As shown in Figura 4.3c, pretreatment with [2He][Ac] and [Etid][Ac] led to high conversions of cellulose, of $70.4 \pm 1.4\%$ and $72.1 \pm 1.2\%$, respectively, which were statistically equivalent to [Etid][For] and [2He][For] - due to the extensive removal of lignin. ILs with stronger capacity for lignin extraction also provided higher cellulose digestibilities, as observed with [Etid][Ac]. The trend was the same as has been reported by Fu et al. (2010)¹⁶³ using [Emim][Ac] at 90 °C and 24 h, which achieved 97% cellulose yield and 30.3% lignin extraction. Reis et al. (2017)¹⁰² and Rocha et al. (2017)¹⁶ observed similar performances for pretreatment with [2He][Ac], around 70% cellulose conversion.

The trend of hemicellulose conversion in Figura 4.3c and d was similar to that of cellulose. The values are lower compared to cellulose conversion and the highest values were for [2He][Ac] and [Etid][Ac], $50.0 \pm 0.5\%$ and $52.8 \pm 1.4\%$, respectively, which were statistically equivalent to [Etid][For], [Etid][Lac] and [Etid][Mal]. When compared to results of the literature, hemicellulose conversions were similar or higher. Pin et al. (2019)¹⁷ and Sun et al. (2017)¹⁵² reported values around 30 and 40% when biomass was pretreated with PILs combining different cations with the anion [Ac].

The results of enzymatic hydrolysis of the sugarcane bagasse pretreated with PILs with different cation chain lengths can be seen in Figura 4.3b. In average, cellulose conversion follows the order: [Et] < [Hex] < [But]: 39.1% for cation [Et], 51.3% for [But] and 44.7% for [Hex]. On the other hand, average hemicellulose conversions were 25.7% for [Et], 34.7% for [But] and 22.0% for [Hex]. The lowest carbohydrates conversion for bagasse pretreated with PILs with the cation [Et] may be attributed to the presence of high contents of lignin after pretreatment, also to the easy degradation of [Et], already mentioned in the TGA analysis results. There is not an apparent correlation between the conversion with PIL cation chain length, differently of the results obtained by Rocha et al. (2017)¹⁶, but the cation [But] seems to be a good a choice among the nonfunctionalized cations in combination with most of the anions considered, except for the anion [Lac], for which [Et][Lac] showed better performance.

In average anions [Ac] and [Lac] showed the highest conversions and all showed significant statistical difference following the order [Lac] > [Ac] > [Mal] > [For] for cellulose conversion, while for hemicellulose conversion [Ac] > [Lac] > [Mal] > [For] (Figura 4.3a).

Anions can impact on carbohydrate preservation in bagasse during pretreatment. Pin et al. (2019)¹⁷ showed low enzymatic conversions of bagasse cellulose for PIL pretreatments with the anion [HSO₄] (<35%) when compared to the anion [Ac] (25 - 70%) for several temperature/time conditions and 15% water loading (w/w). On the other hand, George et al. (2015)⁹⁷ and Verdía et al. (2014)⁹⁶, using and PILs with the anion [HSO₄], achieved 45% and 80% glucose yields in hydrolysis, respectively. George et al. (2015)⁹⁷ pretreatment conditions were 120 °C and 3 h using Switchgrass and the pretreatment conditions of Verdía et al. (2014)⁹⁶ were 20% water (w/w), acid-base ratio 1.01:1.00 at 120 °C and 4 h using *Miscanthus giganteus*. The [HSO₄] anion shows a high catalytic activity due to its high acidity and should be used carefully with an acid-base ratio not greater than 1. The acid media promotes hemicellulose solubilization as opposed to the carbohydrate preservation conferred by the more basic anions [Ac] and [Lac].

Considering the non-functionalized cations of Figura 4.3d, the best value of cellulose conversion was for bagasse pretreated with the PIL [Et][Lac] ($59.8 \pm 0.2\%$), followed by [But][Ac], [But][Lac], [But][Mal], [Hex][Ac] and [Hex][Lac], which were statistically equivalent. Hossain et al. (2019)¹⁶⁴ demonstrated that despite being effective for lignin extraction, some PILs ([Eim][OAc] and [Eim][HCOO]) cannot promote biomass disruption to enhance biomass digestibility. Interestingly, the PIL [Eim][Cl] was effective in biomass modification, resulting in 75% of glucose yield in hydrolysis and it could also be recovered by vacuum distillation and recycled a number of times without decreased effectiveness. Nakasu et al. (2020)²⁵ Brandt et al. (2017)²¹ and Rocha et al. (2017)¹⁶ also performed PIL recycle without a drop in PIL performance along the cycles.

In the design of PILs, the knowledge of the influence of cations and anions characteristics may aid in the choice of the ideal combination of cations and anions for a given task. The cation interacts with the biomass through hydrophobic interactions, helping the solvent to permeate the biomass structure and break the linkages between carbohydrates and lignin, allowing it to act efficiently in cellulose^{165,166}. The anion may favor the formation of multiple hydrogen bonds with the biomass; this positive influence of the hydrogen bonds in the structure plays a crucial role in the modification of the lignocellulosic ultrastructure, allowing the PIL to permeate the biomass³.

4.1.3. Conclusion

Designing the best PIL for biomass pretreatment process is a crucial factor for efficient hydrolysis because it influences the solubility of the lignin and carbohydrates. We have demonstrated that the introduction of hydroxyl and amino groups into the cation led to improved lignin solubilization capacities, resulting in higher conversions in the hydrolysis step. Cation functionalization was shown to have more influence in the performance of the pretreatment than modifying cation chain length. There are positive correlations between lignin solubility and conversion of carbohydrates with dependence on the pH and net-basicity values.

4.2. Considerações

Escolher um LIP a partir da combinação de cátion e ânion é um fator crucial que pode influenciar diretamente na atuação desses solventes na biomassa. Todos os LIPs sintetizados foram usados no pré-tratamento para avaliar sua influência na estrutura do bagaço, e a partir disso foi observado que todos os solventes mostraram alguma influência na biomassa.

Solventes com características alcalinas são promissores na solubilização de lignina, logo LIPs com ânions [Ac] e [Lac] com net-basicity > 4 apontaram correlações positivas neste resultado. Cátions [Etid] and [2He] no geral provomoveram altas estabilidades térmicas, indicando que grupos funcionais nas cadeias dos cátions são promissores para reuso e reutilização do LIP dentro do processo de pré-tratamento.

De todos os solventes, [2He][Lac], [Etid][Ac], [Etid][Lac] e [2He][Ac] alcançaram resultados promissores na solubilização de lignina e posterior conversão de polissacarídeos, sendo este último já estudado em nosso grupo de pesquisa desde 2013 e com resultados concretos de pré-tratamento, hidrólise e fermentação.

No próximo capítulo o foco ainda é o estudo da influência do cátion e ânion na estrutura da biomassa, só que neste caso o objetivo é entender como a estrutura da lignina extraída dos pré-tratamentos se comporta nesses LIPs.

CAPITULO 5

5. Influência do cátion/ânion dos LIPs na estrutura da lignina

Baseado no capítulo anterior foi possível observar como o LIPs contribuem na solubilização de lignina na etapa de pré-tratamento, com o intuito de reaproveitar o material fenólico dentro da indústria para ser matéria-prima na produção de produtos de valor agregado, além da queima para a produção de energia. Inicialmente, se faz necessário um estudo de caracterização da lignina para entender a sua estrutura e as unidades presentes, porque esse conhecimento pode abrir caminhos a uma aplicação, tendo como alvo a produção de química fina, biopolímeros e cosméticos.

Neste capítulo os resultados serão apresentados na forma dos artigos já publicados nas revistas *Renewable Energy*⁸⁵ e *Industrial Crops and Products*¹⁶⁷. Ao final são feitas considerações finais e o SI está no Apêndice A.

5.1. Structural characterization of sugarcane lignins extracted from different protic ionic liquid pretreatments

Thaynara C. Pin ^{a,c}, Viviane M. Nascimento ^{a,b}, Aline C. Costa ^a, Yunqiao Pu ^d, Arthur J. Ragauskas ^{c,d,e}, Sarita C. Rabelo ^{f*}

^aChemical Engineering Faculty, University of Campinas (UNICAMP), Av. Albert Einstein, Campinas, São Paulo, 13083-852, Brazil.

^bBrazilian Biorenewables National Laboratory (LNBR), Brazilian Center for Research in Energy and Materials (CNPEM), 13083-970, Campinas, São Paulo, Brazil.

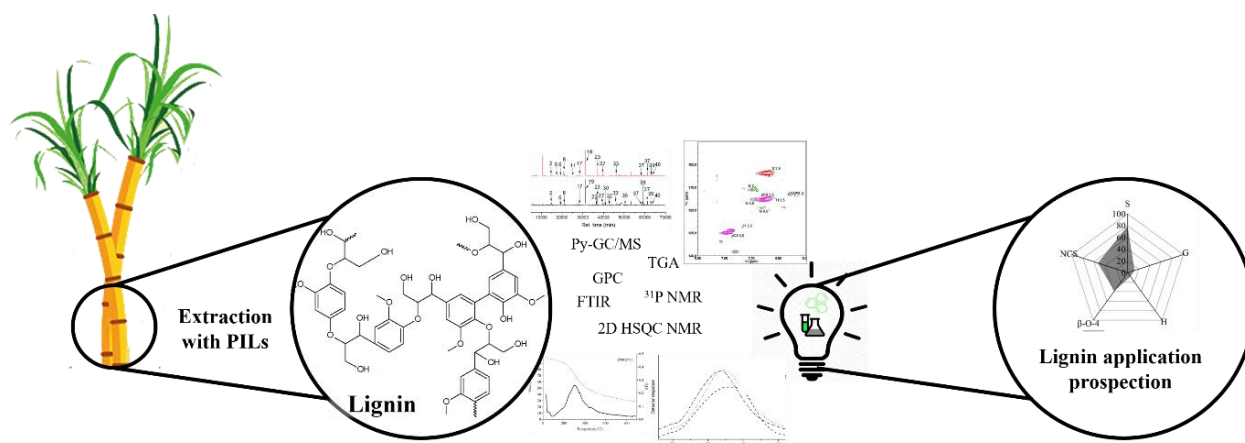
^cDepartment of Chemical and Biomolecular Engineering, University of Tennessee, Middle Dr, Knoxville, TN, 37916, USA.

^dBiosciences Division, Joint Institute for Biological Sciences, Oak Ridge National Laboratory (ORNL), Bethel Valley Rd. Oak Ridge, TN, 37831, USA.

^eCenter for Renewable Carbon, Department of Forestry, Wildlife, and Fisheries, University of Tennessee, Institute of Agriculture, Morgan Cir Dr, Knoxville, TN 37996, USA

^fDepartment of Bioprocess and Biotechnology, College of Agricultural Sciences, São Paulo State University (UNESP), Av. Universitária, Botucatu, São Paulo, 18610-034 Brazil

*Department of Bioprocess and Biotechnology, College of Agricultural Sciences, Sao Paulo State University (UNESP), Av. Universitária, Botucatu, São Paulo, 18610-034 Brazil. E-mail address: sarita.rabelo@unesp.br.



5.1.1. Abstract

Previous studies based on protic ionic liquids have shown them to be effective for extracting lignins from biomass. Moreover, ILs synthesized with amine cations can promote the insertion of nitrogen into lignin, favoring its valorization for industrial applications. In this study, lignins extracted from sugarcane bagasse by eight different PILs were analyzed. Several techniques of characterization were employed (2D HSQC NMR, ^{31}P NMR, GPC, Py-GC/MS, TGA, FTIR, and elemental analysis), seeking a deeper understanding of lignin structure post-PILS treatment. In particular, lignin obtained with acetate and lactate anions with monoethanolammonium cations showed similar structural compositions. Lignins obtained from ethylenediamonium cation combined anions acetate and lactate exhibited relatively higher molecular weights compared to the other lignins studied. The elemental analysis of these lignins further revealed the presence of nitrogen in their structures, suggesting that amination occurred. In this work we used PILs not yet reported in the literature for this purpose, and consequently obtained lignins with specific structures. Overall, our results demonstrated that depending on the PILs used, lignins with distinct properties could be obtained which might be used for value-added applications. This work covered new advances in elucidation of lignin chemical structure and opened a new path for lignin valorization.

5.1.2. Results and discussion

5.1.2.1. Elemental analysis and C_{900} formula determination

Tabela 5.1 depicts the elemental composition (C, H, N, O), methoxyl content, and C_{900} formula for each lignin. The C_{900} formula is estimated by elemental analysis and ^1H NMR (*i.e.*, methoxy content) results. These data show the effects of different PILs on the elemental composition and methoxyl content of lignins and for comparison purposes. Data on raw bagasse used for lignin extraction are available in Appendix A.

Nitrogen content increase was observed for the lignins obtained after extraction with PIL, especially compared to the lignins analyzed by Menezes et al. (2017)¹⁵⁴ and raw bagasse lignin (0.3% nitrogen). The sample extracted with [Etid][Ac] contains 5.5% N, indicating the presence of nitrogen groups in lignin. The nitrogen content increase is possibly from the PILs cation (amine bases), which was also observed by Nikafshar et al. (2017)¹⁶⁸, Achinivu (2018)¹⁶⁹ and Wang et al. (2018)¹⁷⁰.

The degree of unsaturation (DOU) (Tabela 5.1) showed values from 279 to 422, indicating that lignin fragmentation occurs in the extraction with these PILs. Cation [2He] combined with any anion showed larger values than [Etid], suggesting that the lignin extracted has more unsaturated bonds in the side-chain. The values of DOU are similar to other lignins extracted with ILs from the literature^{171,172}, but it should be considered that extraction conditions have a strong influence in DOU results. Mild conditions lead to less unsaturated bonds and harsh conditions to more double bonds/aromatics rings present after extraction. However, similar DOU values for lignins extracted by different ILs may indicate similar reactions between biomass and solvents.

Tabela 5.1 - Elemental composition (C/H/N/O) and C9-formula of the lignins isolated from sugarcane bagasse and literature lignins.

Lignin	%C	%H	%N	%O	OCH ₃	C ₉₀₀ -formula	DOU
Present work							
[2He][Ac]	55.7	6.3	3.9	33.6	0.7	C ₉₀₀ H ₁₂₁₃ O ₄₀₈ N ₅₄	322
[Etid][Ac]	50.9	6.3	5.5	37.2	0.3	C ₉₀₀ H ₁₃₂₇ O ₄₉₄ N ₈₃	279
[2He][For]	37.0	4.0	1.5	57.5	0.2	C ₉₀₀ H ₁₁₅₉ O ₁₀₅₀ N ₃₁	337
[Etid][For] ^a	31.6	4.3	4.1	60.1	-	-	-
[2He][Lac]	55.1	5.1	2.5	37.4	0.7	C ₉₀₀ H ₉₉₃ O ₄₅₉ N ₃₅	422
[Etid][Lac]	47.8	5.2	3.7	43.2	1.2	C ₉₀₀ H ₁₁₆₇ O ₆₁₁ N ₆₀	348
[2He][Mal]	41.5	4.6	2.1	51.8	0.5	C ₉₀₀ H ₁₁₈₉ O ₈₄₃ N ₃₉	326
[Etid][Mal]	42.8	4.9	4.0	48.3	0.2	C ₉₀₀ H ₁₂₂₈ O ₇₆₂ N ₇₂	323
Literature							
Menezes et al. (2017) ⁸	59.4	7.0	-	33.0	1.0	-	-
Achinivu (2018) ²⁰	62.2	6.1	0.9	30.8	-	-	-
Achinivu (2018) ²⁰	64.5	7.2	4.0	24.3	-	-	-
Achinivu (2018) ²⁰	52.1	10.3	10.1	27.5	-	-	-
Nikafshar et al. (2017) ²⁵	55.9	7.58	4.6	29.8	-	-	-

a) not showed reliable data in 2D-HSQC-NMR

5.1.2.2. FTIR analysis

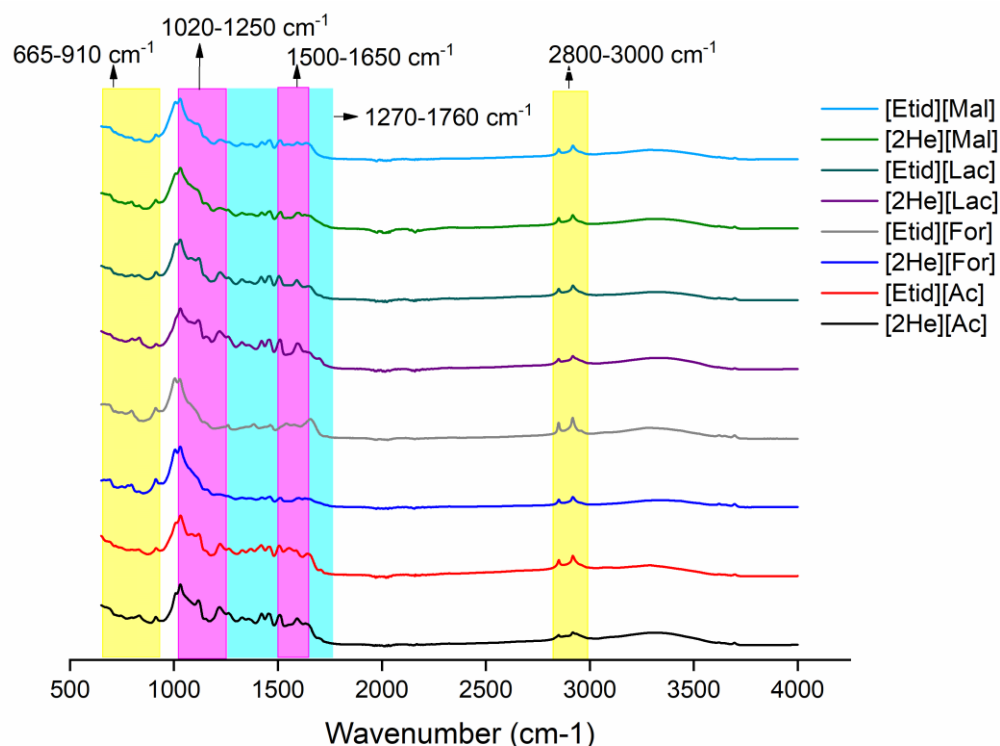
The extracted lignins were characterized by FTIR spectra (Figura 5.1). These analyses report the chemical structure of lignins through their distinct absorptions. For example, the absorption band seen at 835 cm^{-1} bands originates from H units¹⁷³, which is also observed and reported in the data in Tabela 5.8, consistent with HSQC analyses to be discussed later.

The region of $1020\text{-}1250\text{ cm}^{-1}$ with reported peaks at 1040 and 1220 cm^{-1} corresponds to the PIL used for lignin extraction and associated with C-N stretching vibrations in aliphatic amines¹⁷⁴. Besides that, lignin aromatic ring modifications and cleavage of ester linkages can be observed at the peak at 1117 cm^{-1} . The different shapes and intensities of this band are attributed to different PILs used during extraction. For lignins extracted by PILs a band at 1170 cm^{-1} , characteristic of C-O stretch¹⁷⁵, was also observed, indicating ester-bound residual hydroxycinnamic acids.

The peaks attributed to the lignin structural spectral vibration regions are reported at $1260\text{-}1760\text{ cm}^{-1}$ ^{176,177}. The peak at 1270 cm^{-1} is assigned to derivatives of the guaiacyl unit and the peak 1325 cm^{-1} , C-O stretching, to the syringyl unit. These peaks were present in all samples with different intensities, confirming that changing the PILs cation group alters the lignin structure. The 1688 cm^{-1} absorption band was observed less frequently and may be associated with carbonyl groups conjugated with aromatic rings, which are attributed to the chemical binding of FA and *p*CA. The region at $1500\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$ exhibited a band at $1500\text{-}1515\text{ cm}^{-1}$ and 1600 cm^{-1} , which represents C-C stretching of the aromatic ring of lignin^{169,178}.

The peak at 1650 cm^{-1} is attributed to the bending of N-H curvature vibrations for primary amines¹⁷⁴, suggesting the presence of the amino group. The FTIR spectra showed a small absorbance obtained in the regions described (700 , 1040 , 1220 and 1650 cm^{-1}), suggesting that low amounts of amines from the PILs may be incorporated into the lignin samples after recovery¹⁶⁹. The region $2800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ presented a band at 2850 cm^{-1} , which is generally assigned to -CH_2 in aromatic methoxy groups and a band at 2925 cm^{-1} , assigned to the C-H stretching vibration from methyl and methylene groups and C-H stretching aromatic methoxyl groups¹⁶⁹. All these signals are presented in Tabela 5.1.

Figura 5.1 - FTIR spectra of various lignin samples extracted with PILs.



5.1.2.3. 2D-HSQC-NMR analysis

The 2D-HSQC spectra of the lignin samples are shown in Figura 5.2, Figura 5.3, and Figura 5.4, along with the main structural assignments (Figura 5.5). The lignin samples extracted with the PIL [Etid][For] were not analyzed by the 2D-HSQC NMR technique due to their low solubility in the NMR solvent. Del Rio et al. (2015)²⁹ reported data on the isolation of sugarcane bagasse lignin, trying to preserve its structure as much as possible. These results will be used for comparison with the data obtained in the present work.

Figura 5.2 - Quantitative 2D HSQC NMR analyses for PIL-recovered lignins from sugarcane bagasse. Aliphatic ($\delta\text{C}/\delta\text{H}$ 50-110/3.0-5.5 ppm, left) and aromatic ($\delta\text{C}/\delta\text{H}$ 90-140/6.0-8.0 ppm, right) regions from (A) [2He][Ac], (B) [Etid][Ac] and [2He][For]. See Figure 5.5 for the lignins structures identified.

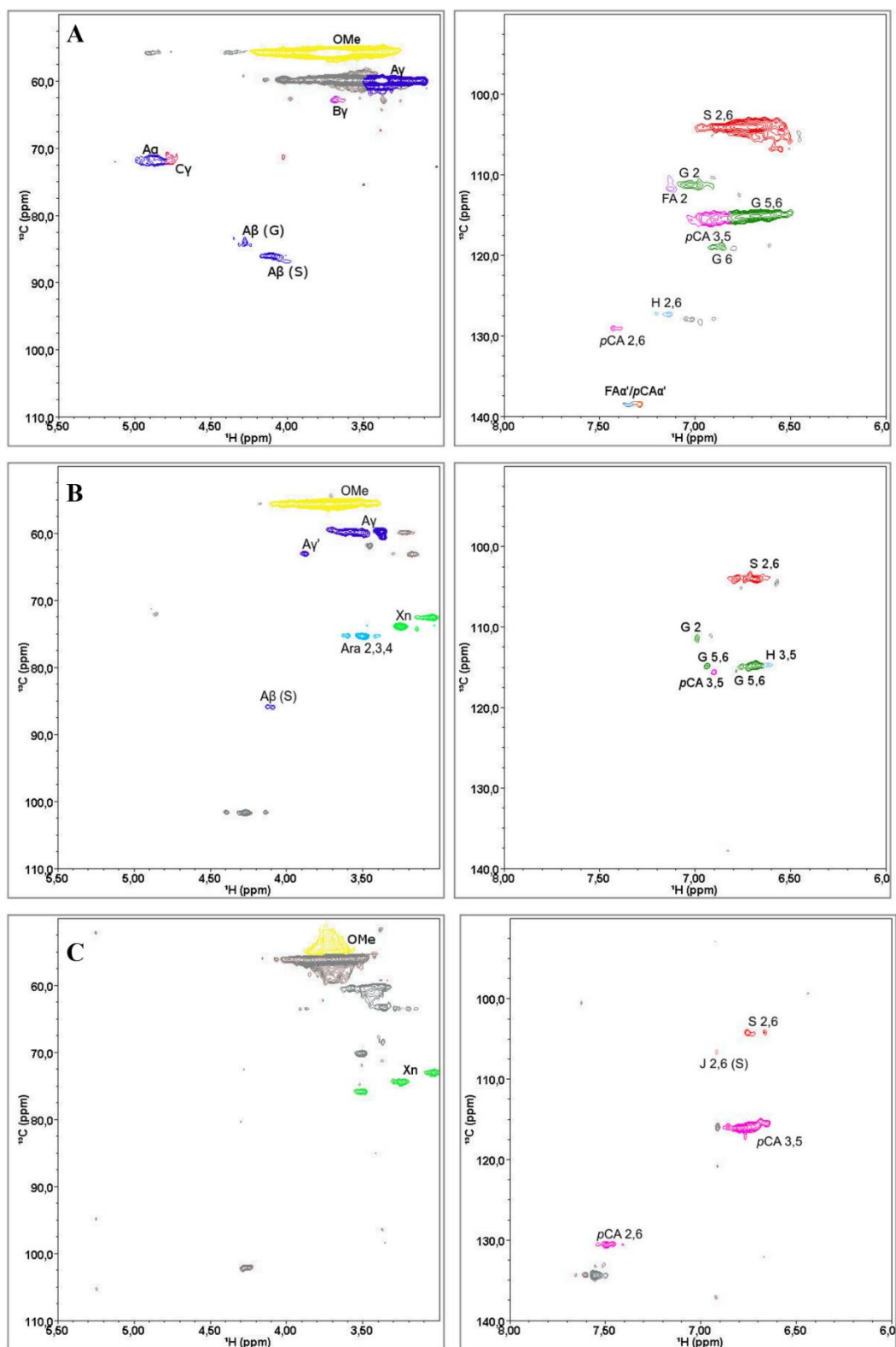


Figure 5.3 - Quantitative 2D HSQC NMR analyses for PIL-recovered lignins from sugarcane bagasse. Aliphatic ($\delta C/\delta H$ 50-110/3.0-5.5 ppm, left) and aromatic ($\delta C/\delta H$ 90-140/6.0-8.0 ppm, right) regions from (A) [2He][Lac] and (B) [Etid][Lac]. See Figure 5.5 for the lignins structures identified.

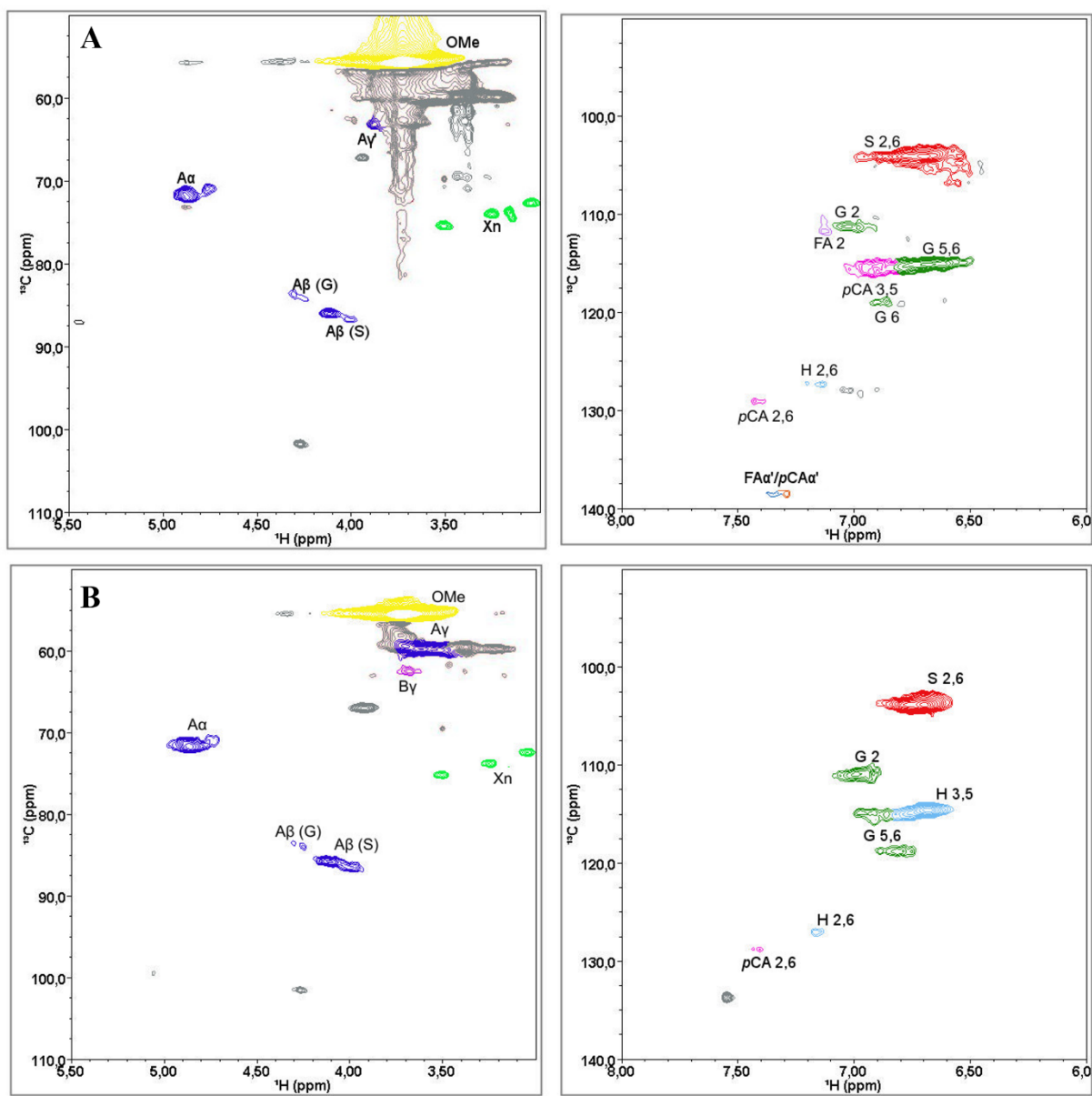


Figure 5.4 - Quantitative 2D HSQC NMR analyses for PIL-recovered lignins from sugarcane bagasse. Aliphatic ($\delta\text{C}/\delta\text{H}$ 50-110/3.0-5.5 ppm, left) and aromatic ($\delta\text{C}/\delta\text{H}$ 90-140/6.0-8.0 ppm, right) regions from (A) [2He][Mal] and (B) [Etid][Mal]. See Figure 5.5 for the lignins structures identified.

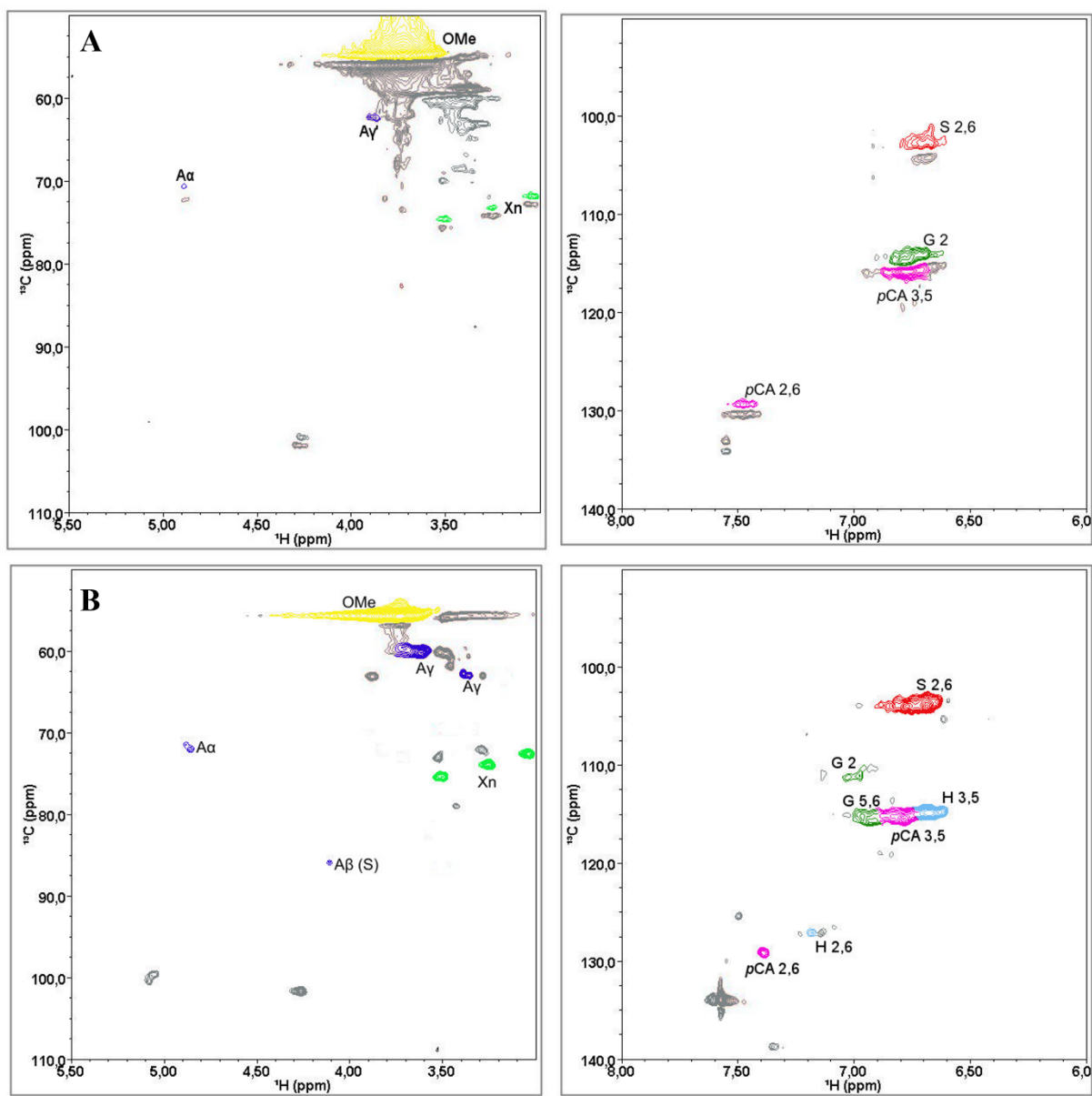
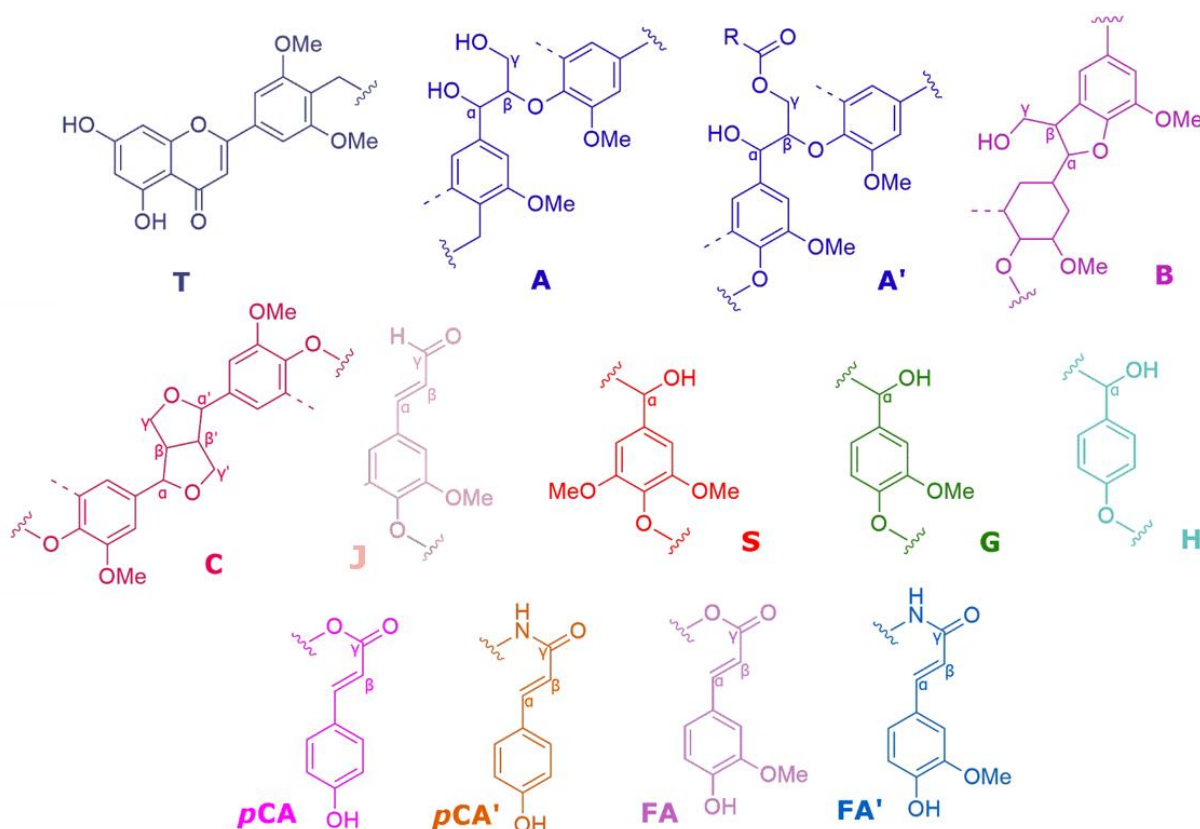


Figure 5.5 – Representation of the main structures present in the PIL-recovered lignins as identified in the 2D HSQC NMR spectra. A: β -O-4-structures; A': β -O-4-structures with acylated (by acetate or *p*CA) g-OH; B: phenylcoumaran structures formed by β -5-coupling; *p*CA: *p*-coumarate moieties; FA: ferulate moieties; (esterified with hemicelluloses); *p*CA': *p*-coumarate amide; FA': ferulate amide; H: *p*-hydroxyphenyl units; G: guaiacyl units; S: syringyl units; T: Tricin end-groups; I: *p*-hydroxycinnamyl alcohol end-groups. The structures are colored to match the assigned contours in the 2D HSQC NMR spectra in Figure 5.2 - 5.4.



The aliphatic-oxygenated region of the lignin spectra is typically assigned to δ_C/δ_H 50-110/3.0-5.5 ppm, and carbohydrate signals as xylans (X_n) and arabinofuranose ($Ara_{2,3,4}$) are also found in this region and somewhat overlapped with signals from correlations in the β -O-4 substructures¹⁷⁹. 2D HSQC NMR analysis (Figure 5.2, Figure 5.3, and Figure 5.4) indicates the presence of low concentrations of carbohydrates - the lignin purity was not obtained using a gravimetric methodology, due to low sample availability. These carbohydrates are strongly linked with lignin, making their complete removal exceedingly difficult. The presence of these carbohydrate signals (X_n and $Ara_{2,3,4}$) interferes with the identification of g-acylated units of C γ /H γ (A'), which was also reported by Del Rio et al. (2015)²⁹. Lignin fragments appear to

present a much better reactivity over PILs amine than carbohydrates, this is attributed to interaction through the formation of oxocarbenium ion. Carbohydrates present nonconformationally favour reaction sites for oxocarbenium ion reaction while lignin may react with amine from PILs by carbocation intermediate^{180,181}. However, amines could react with the terminal C-OH group via the aldehyde¹⁸¹.

The aliphatic region of the spectra also showed other signals corresponding to the C α /H α , C β /H β and C γ /H γ correlations of β -O-4 substructures (A and A')¹⁸². Another type of lignin substructure, phenylcoumarans (B) (β -5'), was also detected although with low signal intensity.

Pretreatment may cause degradation of lignin chains, in the case of pretreatment with primary amine-based PILs, this may include chemical alterations due the amination of G units^{170,172}, which can lead to the introduction to the aromatic ring and amine group, as described by Nikafshar et al. (2017)¹⁶⁸ in the region of 59.5 ppm for ¹³C. Lignin amination was suggested but was not confirmed since the NMR signal of amination is overlapped with A γ (59.0/3.4 ppm), thus making it difficult to be identified. The literature suggested that A γ could be used in lignin quantifications performed before and after extraction, but it is not an accurate procedure due to many reactions that occur during extraction with PIL¹⁷⁰.

Amination can be suggested since signal enhancement was observed in the A γ (59.0/3.4 ppm) region in different intensities for all the lignins extracted with [Ac] anions. This is supported by elemental analysis with nitrogen results, *e.g.*, the [Etid] cation showed a 5.5% higher N content value, possibly due to the presence of a substituted amine. As mentioned previously, the presence of amines in lignin was suggested in the FTIR data. On the other hand, FTIR and elemental analysis suggests residual PIL in the lignin samples, and the choice of water to wash lignin was made to avoid PIL residues in the samples.

Analysis of lignins extracted with [EMIM][OAc] IL indicate that the ionic liquid may be physically and chemically linked to the lignin through β -O-4, α -O-4 and β - β linkages. This happens because the structure of the ionic liquid contains an imidazolium-based salt with a cationic nitrogen¹⁵. The same may have occurred in this work with the ILs containing amine cations, which eliminate of extra steps of amination.

The aromatic HSQC region is assigned to δ_C/δ_H 90-140/ 6.0-8.0 ppm of the spectra, with characteristic herbaceous lignin signals, mainly from guaiacyl (G), syringyl (S), triclin (T), p-coumarate (pCA), and ferulate (FA) units²⁹. The signal from S-units is present in lignins as

C_{2,6}/H_{2,6} at δ_C/δ_H 103.9/6.69 ppm and G as C₂/H₂, C₅/H₅, and C₆/H₆ at δ_C/δ_H 109.7-110.5-111.2/6.99-7.03, 116.0/6.96, 114.7/6.69, 114.9/6.78 and 118.9/6.8 ppm.

Del Rio et al. (2015)²⁹ found 60% of S and 38% of G for lignin of raw bagasse using HSQC NMR, in the present work an increase in the percentage of S units and a decrease in the percentage of G units were observed for lignins extracted with hydroxylated PILs, regardless of the anion used. Temperature strongly influenced these changes. S units are naturally degraded around 160 °C and G units around 120 °C using the IL 1-Ethyl-3-methylimidazolium acetate¹⁸³. In addition, the G unit shows more reactivity due to its free position (5-5'), whereas S units are more stable. G units with the free position can be recondensed as a C5-substituted unit^{65,172}.

Tricin (T) cross-peaks are common in grass lignin structures²⁹ and in the present work they appeared at lower intensities with [2He][Lac] - δ_C/δ_H 103.9/7.3 e (Figura 5.3) corresponding to the C_{2,6}/H_{2,6} of T units. The end-group cinnamaldehyde (J) was identified for lignin extracted with [2He][For] at δ_C/δ_H 106.8/6.91 ppm (Figura 5.2) and was attributed to C_{2,6}/H_{2,6}. The J signal is evident in the spectrum with the largest extent of g-acylation, as suggested by Del Rio et al. (2015)²⁹. T and J are found in smaller quantities when compared to the units S, G and H, *p*CA, and FA, which are the main structures in the aromatic region (Tabela 5.2). Some caution is required when analysing this data since this region of the spectrum has the potential for condensation reactions that replace aromatic C-H bonds with C-C bonds, and these C-C bonded aromatic positions have no cross-correlations¹¹⁵. Thus, the calculated subunit composition can be misinterpreted when examining condensed lignins.

Tabela 5.2 - Structural characteristics (lignin inter-unit linkages, end-groups, aromatic units, and S/G ratio and cinnamate content) from the integration of ^{13}C - ^1H correlation peaks in the HSQC spectra of the lignins.

Lignin	Lignin interunit linkages		Lignin aromatic units				<i>p</i> -Hydroxycinnamates	
	β -O-4' aryl ethers (A)	Phenylcoumarans (B)	H (%)	S (%)	G (%)	S/G ratio	<i>p</i> -Coumarates (%)	Ferulates (%)
[2He][Ac]	38.9	-	2.4	71.1	26.5	2.7	39.8	3.2
[Etid][Ac]	-	-	-	69.6	30.4	2.3	-	-
[2He][For]	-	-	-	100	-	-	58.0	-
[2He][Lac]	19.3	7.02	7.3	70.7	22.0	3.2	18.5	3.2
[Etid][Lac]	48.2	-	5.5	49.1	45.5	1.1	-	-
[2He][Mal]	33.0	-	-	100	-	-	61.0	-
[Etid][Mal]	38.4	-	8.3	79.2	12.6	6.3	7.1	-

Data expressed as per 100 aromatic units (H+G+S=100).

*p*CA and FA are *p*-hydroxycinnamic acids with an ability to chemically crosslink lignin and hemicelluloses^{115,154}. Lower concentrations of *p*CA were found in comparison with the literature for solubilization in the pretreatment reaction^{29,184}. Correlations of *p*CA with different intensities were identified for lignins at δ_C/δ_H 115.7/6.77 ppm (*p*CA_{3,5}) and 130.10/7.47 (*p*CA_{2,6}), except for the lignin extracted by [Etid][Ac] (Figura 5.2) that showed just *p*CA_{3,5} at a noise level and [Etid][Lac] (Figura 5.3) with *p*CA_{2,6}. The FA signal at C₂/H₂ showed lower intensity than *p*CA in lignin samples, and it was only possible to determine the percentage of ferulates for [2He][Lac] (Figura 5.3) at δ_C/δ_H 110.38/7.31 because the other lignins did not accumulate enough signal. Although the raw bagasse contains large amounts of *p*CA and FA²⁹, these signals are observed after extraction in low quantities in the present work. This result is due to the fact that *p*CA and FA can be hydrolyzed during pretreatment, it is confirmed by the absence of signals as C α /H α (144.4/7.40 ppm) and C β /H β (143.5/7.50 ppm).

Structures derived from *p*CA and FA were observed in the [2He][Ac] (Figura 5.2) and [2He][Lac] (Figura 5.3) extracted lignins at δ_C/δ_H 138.5/ 7.29 (FA α' /*p*CA α'). These signals suggest the presence of *p*-coumaryl amide (*p*CA') and feruloyl amide (FA'), which were also observed by Qin et al. (2015)¹⁵⁸, besides the presence of the amine groups also seen in the corresponding FTIR spectrum (Figura 5.1). Wen et al. (2014)¹⁷² reported the relative degradation of lignin side chains and aromatic units using PILs formed from primary amine cations. The H units in our study are of lower intensity and were represented by two different positions, C_{2,6}/H_{2,6} and C_{3,5}/H_{3,5} at δ_C/δ_H 126.5-127.2/7.05-7.13 and 114.4-115.13/6.55-6.70-6.9 ppm. Del Rio et al. (2015)²⁹ reported 2% H units in raw bagasse lignin, however in the present work the H unit content had a minor increase, which is consistent with the studies by Brandt et al. (2015)¹¹⁵ and Zeng et al. (2014)¹⁸⁵, which showed that H unit could increase with time¹¹⁵ and temperature¹⁷² of the extraction.

The content of β -O-4' was higher in lignins extracted with [Etid] cation than [2He]. The β -O-4' binding signal becomes almost undetectable in lignins extracted with [Etid][Ac] and [2He][For], indicating that β -O-4' cleavage was the predominant reaction during extraction. The β -O-4' linkages of the lignins obtained in the present work decreased compared to the lignin obtained by Del Rio et al. (2015)²⁹. These authors reported approximately 80% of β -O-ether linkages in the lignin from raw bagasse. This cleavage process is known to yield reactive intermediates, which may lead to the formation of more C-C bonds during repolymerization reactions¹⁸⁶.

Lignin extraction can be influenced by several factors, such as time, temperature, and the solvent used. Besides, techniques of characterization can also influence in the quantifications, *e.g.*, 2D HSQC NMR. Wen et al. (2014)¹⁷² extracted lignin of poplar with the IL 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate (130 °C at 3 h) and obtained 52.9% of β -O-4', similar to the lignin extracted with [Etid] [Lac] (130 °C at 2 h). However, in the present work S/G was twice lower than the value reported by Wen et al.¹⁷² This is due to different interactions between biomass and IL, as well as the fact that the content of S and G units for hardwood and grass is different.

The mechanism of pretreatment with ionic liquids is not well elucidated in the literature, and additional studies are needed to describe the mechanism in this work, such as presented by Ji et al. (2012)¹⁸⁷ and Binder et al. (2009)¹⁸⁸, however, according to the 2D HSQC results it is possible to infer that cations exhibited relatively more influence than anions in lignin variability characteristics after pretreatment with protic ionic liquids. The PILs with the cation [2He] resulted in lignins with higher ether linkages breakage than observed from lignins from cation [Etid]. Consequently, higher S units concentration and extend β -O-4' breakage were noticed. Lignins from PILs with cation [Etid] showed more preserved ether linkages, and lower pCA and FA linkages content, which could be attributed to lignin chain solubilization during pretreatment. These results suggest that lignin characteristics can be tailored during extraction, with ether linkages cleavage that leads to a weight molecular fraction around 5000 g mol⁻¹ or maintaining a structure with most of its native units and linkages.

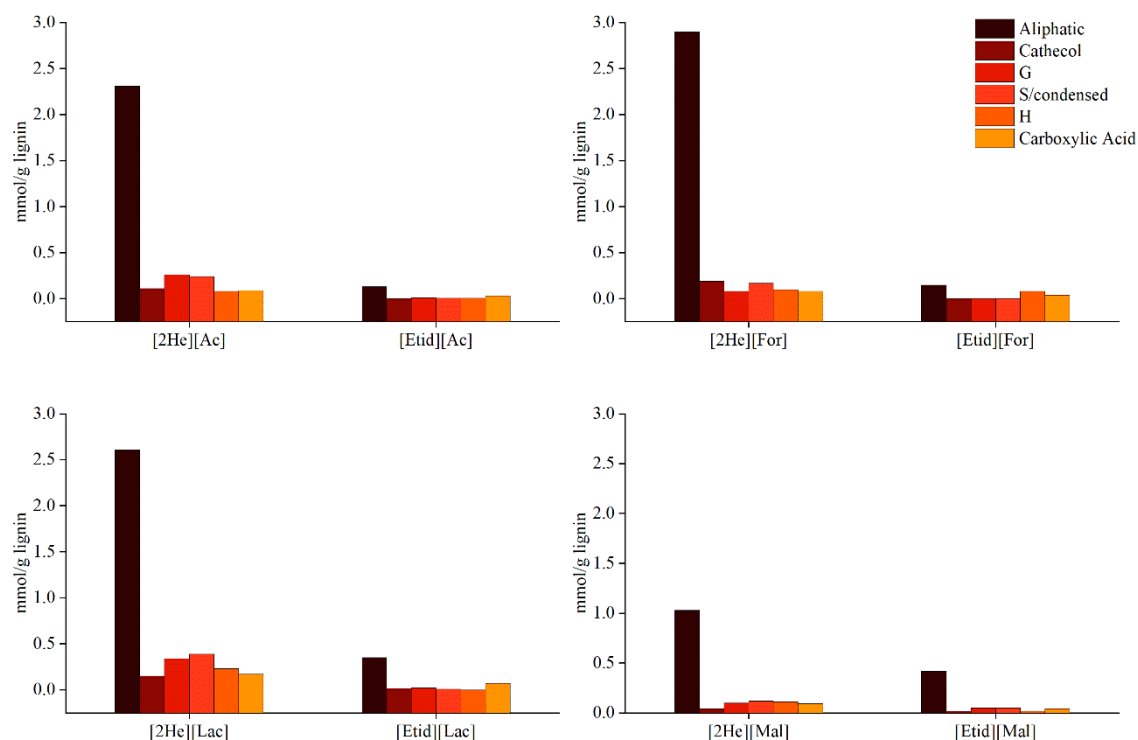
5.1.2.4. ³¹P NMR analysis

³¹P NMR analysis of lignin was applied to the study of hydroxyl groups in lignins obtained from the PILs. Concentrations of lignin hydroxyl groups were quantified for aliphatic syringyl/condensated (β -5, 4-O-5, 5-5), guaiacyl, p-hydroxyphenyl, catechol, and carboxylic acid OH groups (Figura 5.6).

The S/condensed, G, and H units showed similar trends to the HSQC data (Tabela 5.2). Concentrations of S and G units increased because of bond-breaking reactions of macromolecule into phenolic units during pretreatment, as observed, *e.g.*, for lignins extracted by PILs with anion [Ac]. The hydroxylated PILs cations showed high concentrations of aliphatic OH for all lignins (1.03 - 2.90 mmol g lignin⁻¹). On the other hand, non-hydroxylated

PILs cations led to lower concentrations of the aliphatic OH group (0.15 - 1.75 mmol g lignin⁻¹).

Figure 5.6 - Hydroxyl group contents of lignin isolated from sugarcane bagasse as determined by ³¹P NMR analysis according to PILs used for extracting.



The presence of low concentrations of hydroxyl groups for S and/condensed G and H groups could be associated with less lignin condensation reactions^{21,115}. The higher concentration of hydroxyl groups for lignin extracted with [2He] cation could be related to the highest breakdown of ether linkages during extraction, due to a possible cleavage of ether linkages.

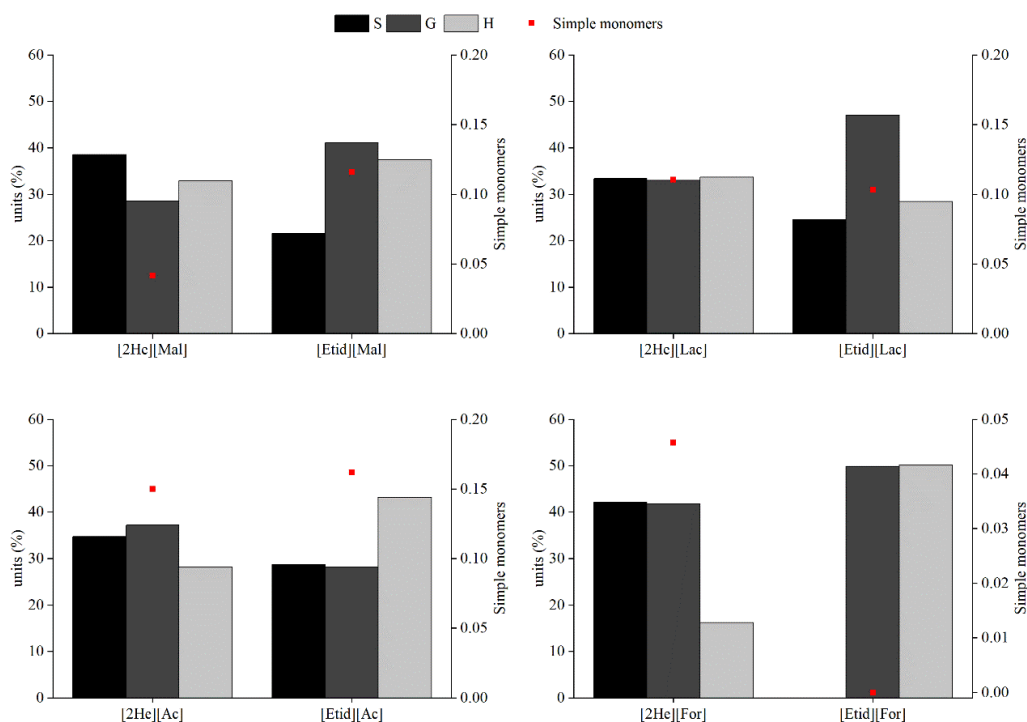
The concentration of the carboxylic acid groups decreased in the pretreatments with all PILs ([2He] < [Etid]). Brandt et al. (2015)¹¹⁵ reported that carboxylic acid content changes slower than *pCA* during ionic liquid pretreatment, suggesting that the *pCA* group is esterified and then repolymerized without COOH groups in its structure, resulting in COOH decrease, as observed for cation [2He].

Moghaddam et al. (2014)¹⁸⁹ extracted lignin of bagasse with ethylene glycol and [bmim]Cl - HCl (130 °C and 30 min) and obtained 3.53 for OH groups total. Similar values were obtained for lignins extracted with [2He][Ac], [2He][Lac] and [2He][For] (~3.50). Low concentrations of hydroxyl groups and little variation in the concentration values of these groups are observed for some isolated lignins, *e.g.*, with the [Mal] anion. Brandt et al. (2015)¹¹⁵ suggested that in this case, the phenolic oxygen belongs to the ether bonds and cannot be quantified, which results in low OH group concentration measurements.

5.1.2.5. Py-GC/MS analysis

Py-GC/MS analysis can provide information about the composition of the lignin and point out its application for specific uses. In this work, 34 compounds were identified according to Brandt et al. (2015)¹¹⁵, Del Rio et al. (2015)²⁹ and El Khaldi-Hansen et al. (2016)¹⁹⁰. The identified phenolic compounds, as well as their relative molar abundances, are observed in Figura 5.7.

Figura 5.7 - Relative abundances of derived units from S, G, and H and simple monomers in Py-CG-MS.



All lignin samples showed residues of PILs. The presence of PIL in the lignin may trigger reactions during pyrolysis due to temperature increase and the amphoteric property of the PILs, which can interact with ethers and alcohols¹⁸¹ present in the lignin structure.

4-vinyl phenol (peak 14) may originate from FA or the H unit, and 4-vinyl guaiacol (peak 18) may be derived from *p*CA or G unit. As *p*CA and G, and FA and H cannot be distinguished, they were not considered in subunits quantification (Figura 5.7.)¹¹⁵.

H units increased compared to the result obtained from HSQC, possibly due to the high temperature of the analysis, which favoured demethoxylation in units S and G, increasing H abundance^{172,191–193}. Lignins extracted with PILs with the anion [For] showed more unidentified compounds than those observed for lignins by PILs with other anions. By comparing individual pyrolytic products, substantial differences in the lignin composition were observed, as reported Appendix A. The highest concentrations of simple monomers (phenol (1) and syringol (19)) were found for lignins extracted with PILs with the anion [Ac], which is directly related to the presence of connectivities (β -O-4) that favour the release of monomers from aromatic rings of depolymerized and/or condensed lignins¹¹⁵.

5.1.2.6. Weight-average molecular weight (Mw)

Lignin Mw results (Tabela 5.3) provide information on the fragmentation pattern during PIL extraction, which can be used to a better understanding of the mechanisms that promote lignin dissolution¹⁶⁹. Data obtained by this analysis are summarized Appendix A.

Tabela 5.3 - The molecular weight of lignins after PILs pretreatment.

Lignin	Mn ^a (g/mol)	Mw ^b (g/mol)	PDI ^c
[2He][Ac]	1691	5250	3.1
[Etid][Ac]	4464	31447	7.0
[2He][For]	1873	9406	5.0
[Etid][For]	1673	18195	10.9
[2He][Lac]	1754	6010	3.4
[Etid][Lac]	4770	50010	10.5
[2He][Mal]	2097	10619	5.1
[Etid][Mal]	2076	15349	7.4

a) Number average molecular weight. b) Weight average molecular weight. c) Polydispersity index (Mw/Mn)

The increase in Mw is observed with increasing cation basicity ($[2\text{He}] < [\text{Etid}]$), which can be due to condensation reactions induced by the basic conditions. Other explanation could be that lignin is being extracted with a preserved structure (β -linkages), which could also result in high molecular weight. The highest results for Mw were observed for $[\text{Etid}][\text{Ac}]$ and $[\text{Etid}][\text{Lac}]$, being 31,000 and 50,000, respectively. High molecular weight values indicate that condensation reactions (C-C bond formation) were favoured when compared to depolymerization reactions (ether cleavage)¹¹⁵. On the other hand, the lower Mw values of lignin isolated from PILs corroborate with the higher cleavage of ether linkages using cation $[2\text{He}]$ for pretreatment. These reactions are consistent with the ^{31}P NMR analysis.

Saha et al. (2018)¹⁹⁴ extracted the lignin of bagasse with IL 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate (140 °C and 2 h) and obtained Mw of 1769 g/mol, while in the present work the lowest Mw obtained was of 5250 g/mol (175 °C and 2 h using $[2\text{He}][\text{Ac}]$). The PILs used in the present work could have caused more reactions of condensation, resulting in higher Mw or the PILs have the capacity to extract the lignin in a more preserved form. On the other hand, Moghaddam et al. (2014)¹⁸⁹ extracted lignins with acidified ethylene glycol and ionic liquids (130 °C and 30 min) and obtained Mw from 6518 to 7597 g/mol, which are more similar to the values found in the present work.

A high Mw consequently produced a high PDI, *e.g.*, above 7. Authors such as Brandt et al. (2015)¹¹⁵ using $[\text{HC}_4\text{im}][\text{HSO}_4]$ and Diop et al. (2015)¹⁹⁵ using $[\text{DBUC}_4^+][\text{Cl}]$ also observed that the process of lignin extraction with PIL depolymerized lignin, producing smaller fragments with higher PDI values. High PDI values (>5) may be evidence of repolymerization and consequently, indicate increased heterogeneity of the obtained lignins¹⁹⁶. Lignins with low PDI values (using cation $[2\text{He}]$) indicate a more ordered fragmentation and lignin with high uniformity¹⁶⁹.

According to the literature¹⁵, lignins obtained from organosolv pretreatment show a higher polydispersity index when compared to the lignin obtained from IL pretreatment. It can probably be attributed to the fact that the organosolv process is less selective to the removal of lignin than the IL process. However, this variation depends on the type of IL used in the lignin extraction, since some ILs can prompt the condensations reactions, generating high molecular weight lignins.

5.1.2.7. TGA analysis

Thermogravimetric analysis is used to evaluate how lignins break down under helium, nitrogen, or oxygen atmosphere^{197–199}. TG curves show the mass loss of substances at the thermal degradation temperature and were used to characterize the thermochemical properties of the extracted lignins. The results are presented in Tabela 5.4 illustrates the mass loss for the lignin samples as a function of temperature, which ranges from 150 °C to 450 °C, corresponding to the temperature of maximum decomposition rate reported by the literature^{189,200}.

Tabela 5.4 - Weight loss percentage at different temperature regions under nitrogen atmosphere for the lignin samples obtained after PIL pretreatment.

Lignin	Weight loss lignin (%)				
	0-100°C	100-200°C	200-300°C	300-450°C	450-900°C
[2He][Ac]	4.0	9.7	22.1	46.0	62.6
[Etid][Ac]	6.2	13.0	27.8	52.8	62.5
[2He][For]	4.6	5.8	13.6	43.2	56.4
[Etid][For]	5.1	11.7	28.2	54.5	63.0
[2He][Lac]	4.7	6.8	19.5	49.2	60.0
[Etid][Lac]	5.3	8.3	22.2	48.0	61.5
[2He][Mal]	5.2	6.8	16.6	44.8	54.4
[Etid][Mal]	6.5	8.5	21.1	50.9	61.0

The first thermal decomposition process was observed around 100 °C and is associated with loss of water and small organic molecules¹⁹¹. The stages of weight loss after 100 °C may be attributed to the presence of PIL in the lignin sample, as suggested by Cao et al. (2014)¹⁴⁹.

Lignin decomposition begins at around 200 °C with the formation of aromatic hydrocarbons, phenolics, hydroxy phenolics, and G/S-type compounds. The majority of the products have phenolic -OH groups in their constitution²⁰¹.

The lignins obtained by [2He][For] and [2He][Mal] pretreatments were less degraded between 200 °C and 300 °C than that obtained with other PILs, showing that the different PILs may influence the structure of the extracted lignins. However, the degradation ranges were similar for all lignins. Moghaddam et al. (2014)¹⁸⁹ also observed similar mass loss trends for lignins in their study. They compare the lignins obtained by soda and ILs ([bmin][Cl]

and [bmin][CH₃SO₃] pretreatment and concluded that the lignins extracted with IL are thermically more stable. The thermal stability of lignins is influenced by their inherent structures, different functional groups, and degree of branching, as well as lignin condensation and conditions of extraction.

After 400 °C, a decomposition of the aromatic rings was observed, and at the end of the analysis, the remaining residue was 30 - 40% of the initial mass. This high remaining mass can be explained by the use of nitrogen during the analysis instead of oxygen (an oxidant atmosphere), as observed by Brebu et al. (2010)²⁰¹

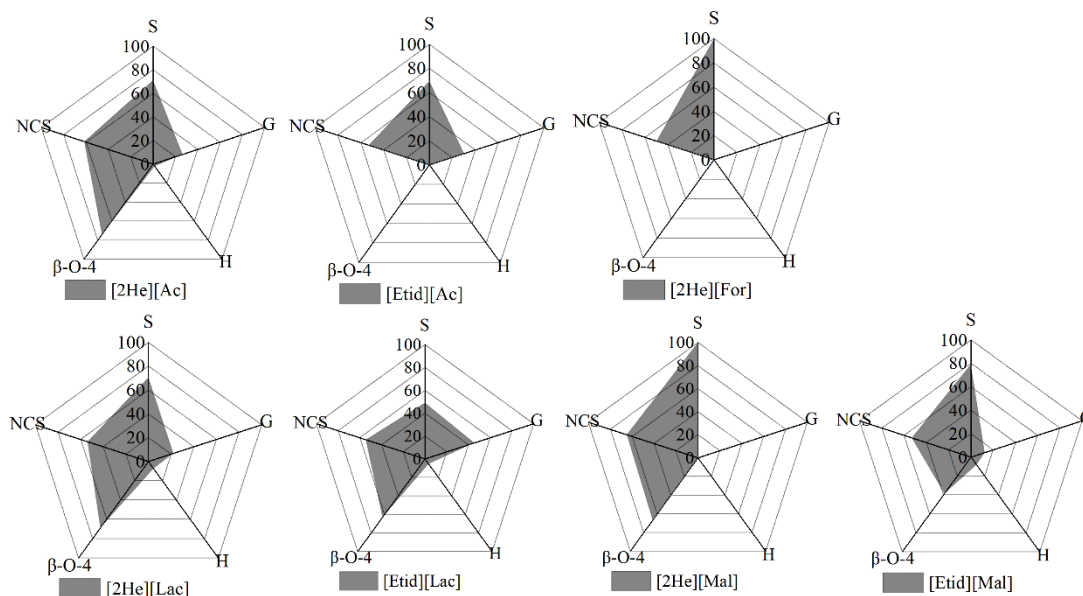
5.1.2.8. Potential uses of lignin

The radar classification method can be considered a predictive tool for the design of products and processes based on lignin²⁰². This classification is based on previous information on the relevant structural parameters such as S, G and H units, β -O-4 and β - β linkages and phenolic groups. This analysis has proved to be an important step in demystifying the complexity of lignin application, as it focuses on its base units to find the best use of the material, thus consolidating its valorization routes²⁰². Using the radar methodology for the lignins extracted with PILs is innovative since little information on the structure of this material has been reported in the literature. Radar classification was performed based on the data presented in Tabela 5.2 and the calculation of noncondensed structures (NCS) (Appendix A). For the analysis, the main structural characteristics of the extracted lignins (S, G, H, β -O-4, and NCS) were considered, using their normalized values (Tabela 5.8).

β -O-4 linkages represent approximately 80% of lignin structure²⁹. In the lignins extracted with the PILs [Etid][Ac] and [2He][For], these linkages were not observed, indicating significant breaking of these linkages. However, other extracted lignins maintained β -O-4 linkages.

The cleavage of β -O-4 linkages in the alkaline medium may result in free phenolic groups carrying a hydroxyl group in the aromatic ring, and this structure can be the precursor of phenolic aldehydes²⁰³ and condensations reactions^{204,205}. The cleavage of etherified β -O-4 linkages can produce vicinal diol, thus generating new phenolic groups with a reactive conjugated structure²⁰². In all cases, the cleavage results in new phenolic groups even if the aromatic ring is not involved in a condensed structure.

Figura 5.8 - Radar classification based in S, G and H units, NCS and β -O-4 linkage for lignin samples obtained of different PILs.



The low presence of phenolic groups may be justified by the high presence of condensed aromatic rings, as can be seen in Tabela 5.8 (which shows the NCS). Another classification used on the radar is the NCS concentration^{202,206}, this is an essential structural feature of lignins resulting from the processing of lignocellulosic materials²⁰². However, the NCS concentrations for the different lignin samples were similar, suggesting a similar influence of the different PILs on the condensed structures.

The area defined by the triangle formed by the β -O-4 and NCS parameters provides the first information on the preservation of the lignin structure. The lignins extracted with the PILs [2He][Ac] and [Etid][Ac] presented the smallest areas of this triangle, thus demonstrating a high modification in the chemical structure of the material.

The data from Tabela 5.8 show that the lignin extracted with the PIL [2He][For] had the greatest modification in its structure, as a large irregular area can be observed in the graph. On the other hand, the lignin extracted with the PIL [Etid][Lac] was less modified, favouring its use for application as an additive in materials aiming at properties improvements⁸⁸.

The triangle areas formed by the S and G units showed no significant differences when comparing the lignins extracted with the PILs synthesized from the anion [Ac], and the representation of these units as radar axes is particularly relevant. S units are present at high

concentrations in all extracted lignin samples, while G unit concentrations vary from sample to sample, probably because G units are more prone to condensation. Considering these aspects, lignins with higher concentrations of S units could be employed, for example, for the production of aldehyde compounds²⁰², whereas depolymerization reactions in S and G units would favour the production of phenol, cresols, and catechols²⁰⁷.

PIL-extracted lignins present interesting structural characteristics, *e.g.*, high molecular weight and preserved structure. They can be used in polymers production or be subjected to other steps of reactions for the production of high value-added chemicals⁸⁸. Studies indicate that one of the efficient ways to modify these lignins would be hydrogenation, with fragmentation resulting in the modification of functional groups. However, the use of primary amine-based PIL can trigger alkylations at lignin active sites, allowing for two very interesting applications: cationic surfactants and composites with PVC/wood floor properties⁸⁸. Another possible lignin modification is nitration²⁰⁸. This modification may favour the use of lignin in the synthesis of graft interpenetrating polymer networks of polyurethane⁸.

When comparing lignins obtained with IL and organosolv, IL have been shown to have less impurities (carbohydrate and ash content) than organosolv lignin. The problem with the impurities is that there is a necessary extra step to remove them completely, which implies greater cost¹⁵. Lignin extracted with IL implies a lower industrial cost, as it avoids separation and purification processes. High-purity lignin can be used in the production of vanillin and as antimicrobial agent, whose activity allows its use in cosmetic formulations.

In general, lignins have great possibilities for industrial applications, but the great advantage of extraction with some PILs is that they have some desirable characteristics. Especially the ones synthesized with amine cations, which can cause the nitrogenation of the structure and enable the application in the production of cationic surfactants, slow-release fertilizers, flocculants, heavy metal adsorbents, cationic asphalt emulsifiers, curing agents of epoxy resin, anion-exchange resins and retention aids²⁰⁹. Besides that, extraction with PILs, especially the ones synthesized based on amines, cause fewer changes in the macromolecule structure, besides favouring the amination reaction, which is desirable. High purity lignins are known to reach market values of 750 USD/MT⁸⁸.

5.1.3. Conclusion

Comprehensive knowledge of the structure of lignin is fundamental to increase its added value, and this is only possible through the use of various analytical techniques. Lignins extracted with PILs, especially based on amines, are a source of aromatic compounds with high potential for industrial use. The amination process, which in this case occurs naturally during extraction, is usually performed in extra processing steps on lignins from other sources. The structures of the extracted lignins varied according to the cation and anion of the PILs and the analytical results were strongly dependent on the degradation processes (e.g., temperature). Data collected for lignins extracted with anion [Lac] PILs show that they are promising because their original structure is preserved. On the other hand, lignins extracted by [2He][For] and [Etid][Ac] showed a high modification in the original structure. Also, lignin extracted with [Etid][Ac] showed a strong tendency towards recondensation reactions, which is shown by its high molecular weight (Mw). The production of lignin-based value-added chemicals requires that the structure of lignin is known. In the present work various methods were used to characterize the structures of lignins obtained by PILs pretreatment. The structures of these lignins have not yet been studied in the literature so far and open new opportunities of product applications.

5.2. Influence of of chain length in protic ionic liquids on physicochemical and structural features of lignins from sugarcane bagasse

Thaynara C. Pin ^{a,b}, Livia B. Brenelli ^c, Viviane M. Nascimento ^{a,d}, Aline C. Costa ^a, Yunqiao Pu ^e, Arthur J. Ragauskas ^{b,e,f}, Sarita C. Rabelo ^{g*}

^a School of Chemical Engineering, University of Campinas (UNICAMP), Av. Albert Einstein, Campinas, São Paulo, 13083-852, Brazil.

^b Department of Chemical and Biomolecular Engineering, University of Tennessee, Middle Dr, Knoxville, TN, 37916, USA

^c Interdisciplinary Center of Energy Planning (NIPE), University of Campinas (UNICAMP), R. Cora Coralina, Campinas, São Paulo, 13083-896, Brazil.

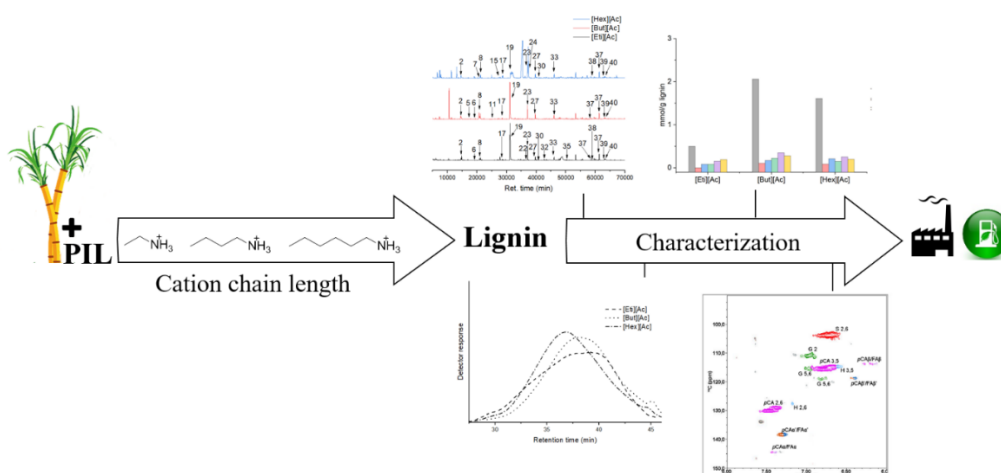
^d Brazilian Biorenewables National Laboratory (LNBR), Brazilian Center for Research in Energy and Materials (CNPEM), R. Giuseppe Maximo Scolfaro, Campinas, São Paulo, 13083-970, Brazil

^e Biosciences Division, Joint Institute for Biological Sciences, Oak Ridge National Laboratory (ORNL), Bethel Valley Rd. Oak Ridge, TN, 37831, USA.

^f Center for Renewable Carbon, Department of Forestry, Wildlife, and Fisheries, University of Tennessee, Institute of Agriculture, Morgan Cir Dr, Knoxville, TN 37996, USA

^g Department of Bioprocess and Biotechnology, College of Agricultural Sciences, São Paulo State University (UNESP), Av. Universitária, Botucatu, São Paulo, 18610-034 Brazil.

*E-mail: sarita.rabelo@unesp.br, phone: +55 14 3880 7330.



5.2.1. Abstract

The mechanisms behind lignin dissolution with protic ionic liquids (PILs) and their influence over lignin properties remain not fully explored. In this work, physicochemical and structural features of lignins extracted from sugarcane bagasse after pretreatment with a series of PILs (length of the cation chain combined with different anions) were assessed using analytical techniques. It was found that the lignin extracted with shorter chain length cations PILs showed the highest β -O-4 content. Opposite, the increase of the PILs cation chain length resulted in enhanced depolymerization. All lignins presented high polydispersity (>3.7), while the weight average molecular ranged from 1921 to 13,539 g/mol. The recovered [Eti][Mal] lignin presented the higher β -O-4 content and was possibly the most preserved lignin obtained. Opposite, lignin isolated from [Hex][Ac] and [Hex][For] treatments had less β -O-4 linkages attributed to the depolymerization of lignin via rupture of ether linkages generating intermediates that further repolymerized and/or depolymerized. These results suggest that the ionicity of the PIL is a crucial factor for lignin dissolution. Furthermore, these results illustrate that the proposed pretreatment using different PILs is useful to obtain high-quality lignins with distinct features and opens a new perspective for materials to match various applications.

5.2.2. Results and discussion

5.2.2.1. PIL-recovered lignins structural units and inter-unit linkages elucidation by 2D HSQC NMR analysis

In this study, PILs obtained by combining three cations and four anions were used to promote selective sugarcane bagasse delignification, generating twelve recovered lignin fractions. According to the chemical composition data, the PIL [But][Lac] promoted the highest lignin solubilization (73 %), followed by the PIL [Hex][Lac] (65 %) and the PIL [Eti][Lac] (55 %), which demonstrates that [Lac] was the most efficient anion to combine with the selected cations under the conditions tested (Tabela 5.5).

Tabela 5.5 - Sugarcane bagasse lignin solubilization (%) in the pretreatment with different PILs.

PIL	Nomenclature	Lignin solubilization (% w/w)
Ethylammonium acetate	[Eti][Ac]	12.0
Ethylammonium formate	[Eti][For]	21.0
Ethylammonium lactate	[Eti][Lac]	55.0
Ethylammonium malonate	[Eti][Mal]	20.5
Butylammonium acetate	[But][Ac]	40.7
Butylammonium formate	[But][For]	34.9
Butylammonium lactate	[But][Lac]	73.0
Butylammonium malonate	[But][Mal]	28.6
Hexylammonium acetate	[Hex][Ac]	37.4
Hexylammonium formate	[Hex][For]	42.5
Hexylammonium lactate	[Hex][Lac]	65.2
Hexylammonium malonate	[Hex][Mal]	53.1

2D HSQC NMR assessed the inter-unit linkages, end-groups, aromatic units, S/G ratio, and cinnamate content of the PIL-recovered lignins based on acquisition conditions and assignments described in the literature^{29,115}. In the range, $\delta\text{C}/\delta\text{H}$ 50–110/3.0–5.5 ppm (*i.e.*, aliphatic region), and $\delta\text{C}/\delta\text{H}$ 90–150/6.0–8.0 ppm (*i.e.*, aromatic region) lignin signals were apparent and are shown in Figura 5.9, Figura 5.10, Figura 5.11, Figura 5.12, which structures can be identified in Figura 5.13. Assignments of $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ correlation signals in the 2D HSQC spectra are also listed in the supplementary material.

Figure 5.9 - Quantitative 2D HSQC NMR analyses for PIL-recovered lignins from sugarcane bagasse. Aliphatic ($\delta\text{C}/\delta\text{H}$ 50-110/3.0-5.5 ppm, left) and aromatic ($\delta\text{C}/\delta\text{H}$ 90-150/6.0-8.0 ppm, right) regions from (A) [Eti][Ac], (B) [But][Ac] and (C) [Hex][Ac]. See Figure 5 for the lignins structures identified.

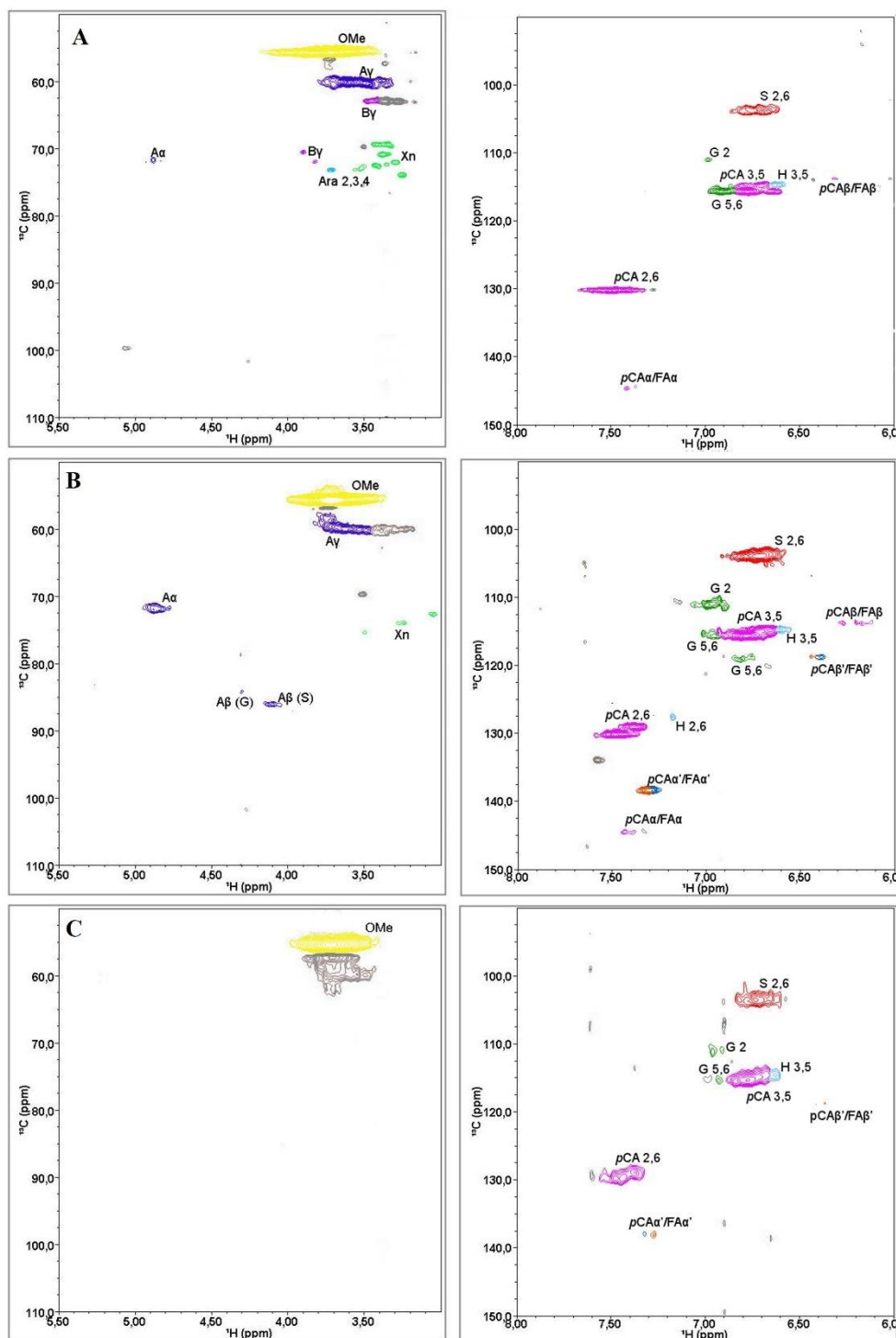


Figura 5.10 - Quantitative 2D HSQC NMR analyses for PIL-recovered lignins from sugarcane bagasse. Aliphatic ($\delta C/\delta H$ 50-110/3.0-5.5 ppm, left) and aromatic ($\delta C/\delta H$ 90-150/6.0-8.0 ppm, right) regions from (A) [Eti][For], (B) [But][For] and (C) [Hex][For]. See Figure 5 for the lignins structures identified.

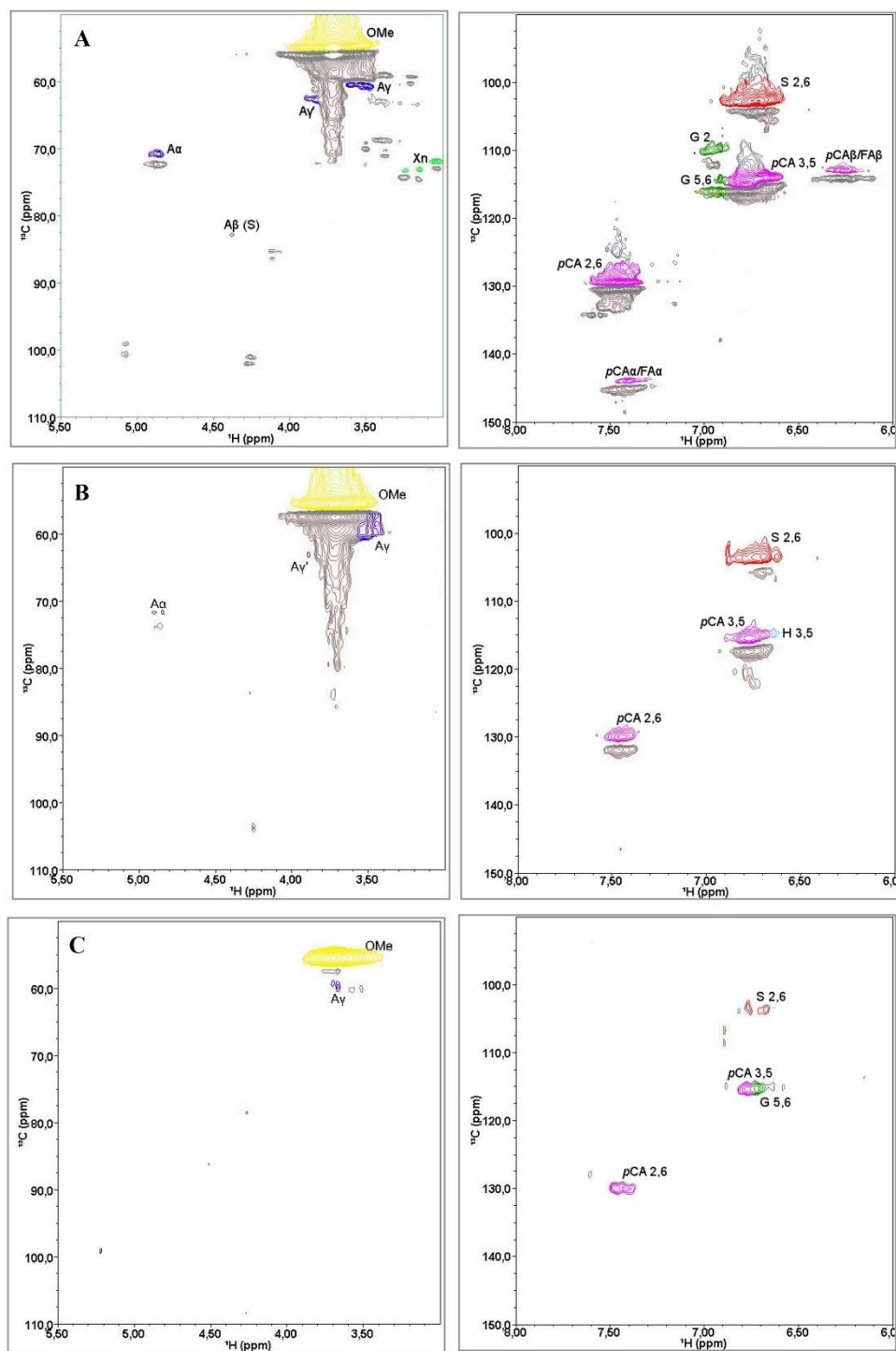


Figura 5.11 - Quantitative 2D HSQC NMR analyses for PIL-recovered lignins from sugarcane bagasse. Aliphatic ($\delta\text{C}/\delta\text{H}$ 50-110/3.0-5.5 ppm, left) and aromatic ($\delta\text{C}/\delta\text{H}$ 90-150/6.0-8.0 ppm, right) regions from (A) [Eti][Lac], (B) [But][Lac] and (C) [Hex][Lac]. See Figure 5 for the lignins structures identified.

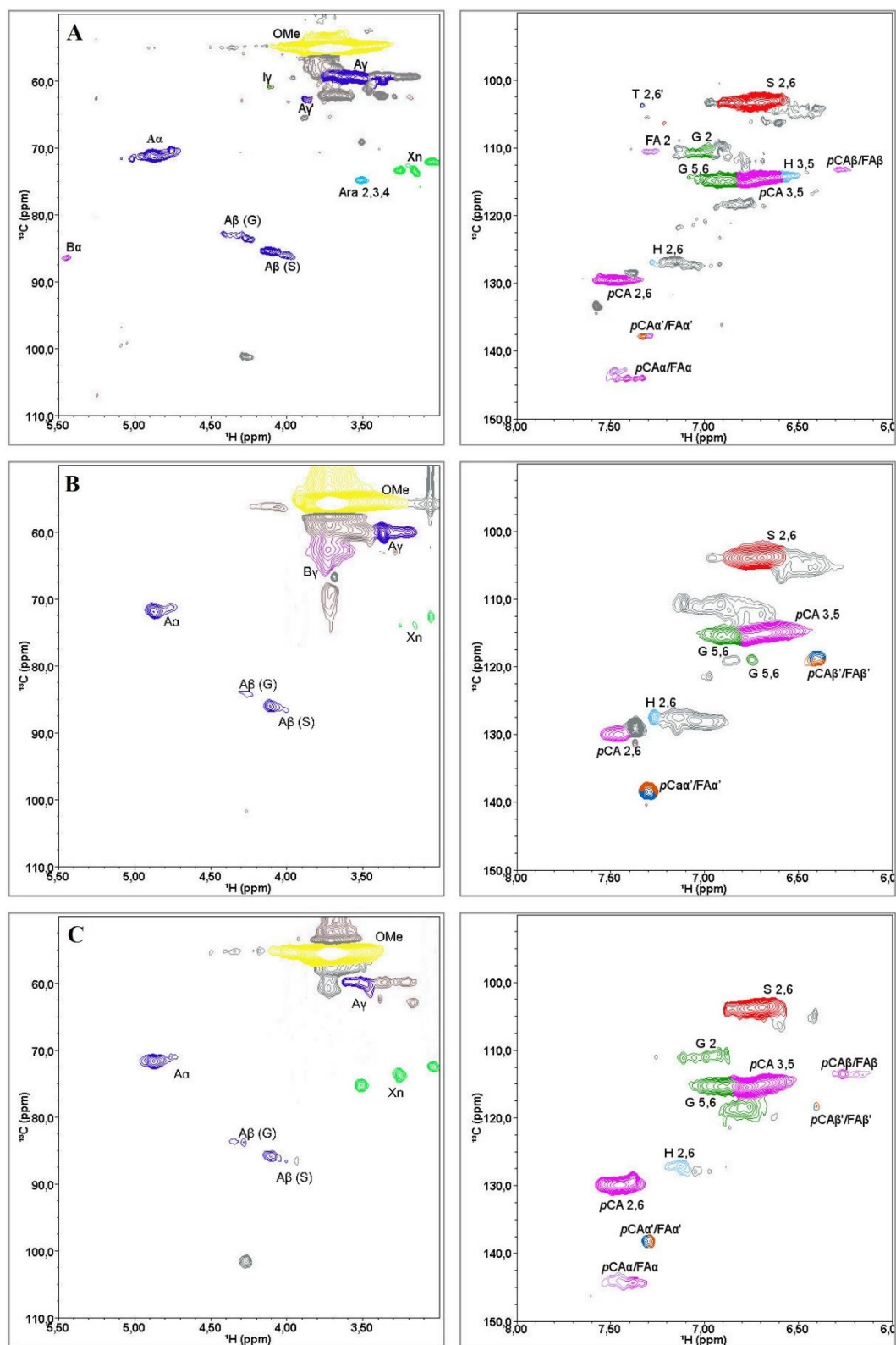


Figura 5.12 - Quantitative 2D HSQC NMR analyses for PIL-recovered lignins from sugarcane bagasse. Aliphatic ($\delta\text{C}/\delta\text{H}$ 50-110/3.0-5.5 ppm, left) and aromatic ($\delta\text{C}/\delta\text{H}$ 90-150/6.0-8.0 ppm, right) regions from (A) [Eti][Mal], (B) [But][Mal] and (C) [Hex][Mal]. See Figure 5 for the lignins structures identified.

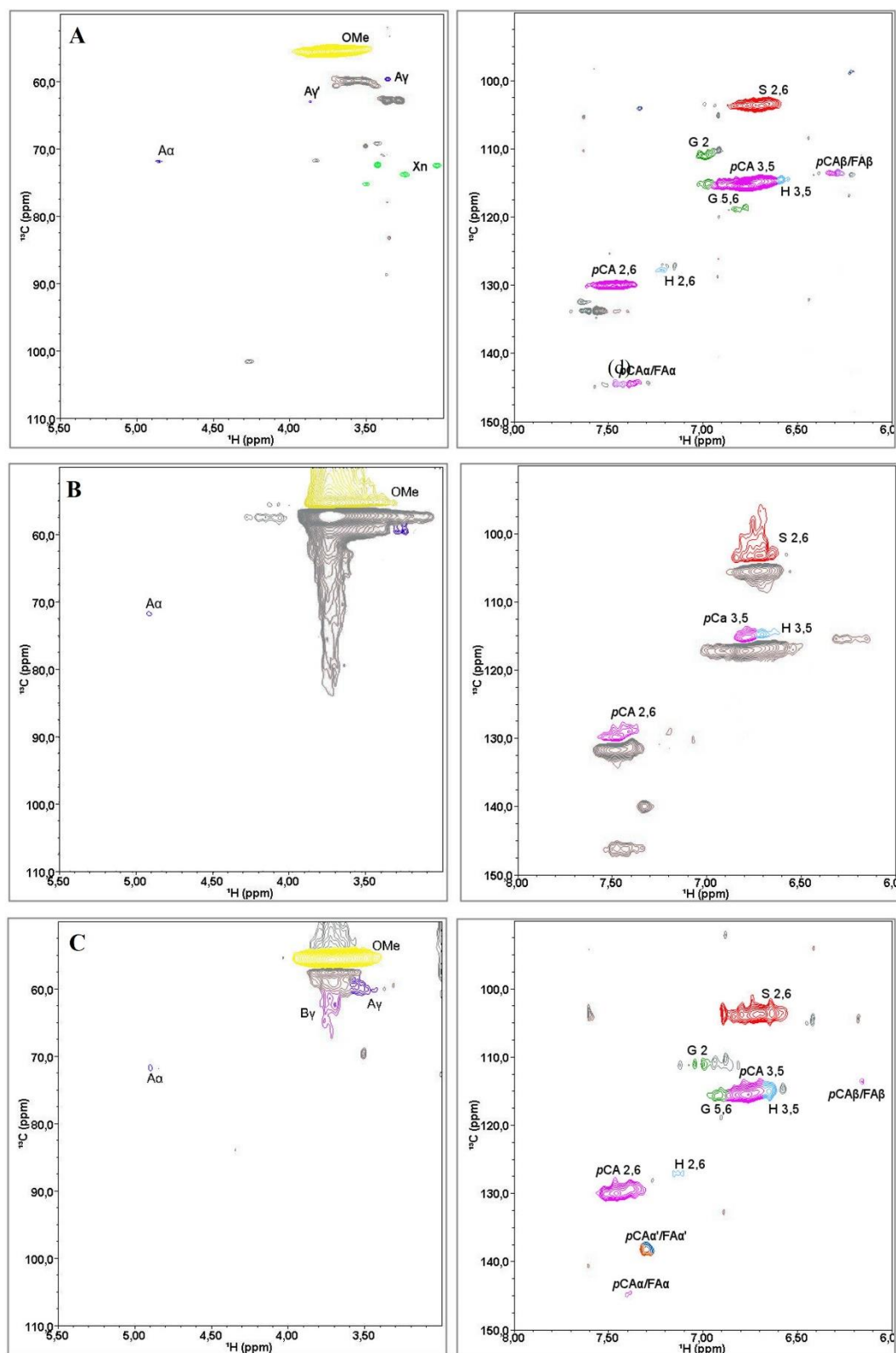
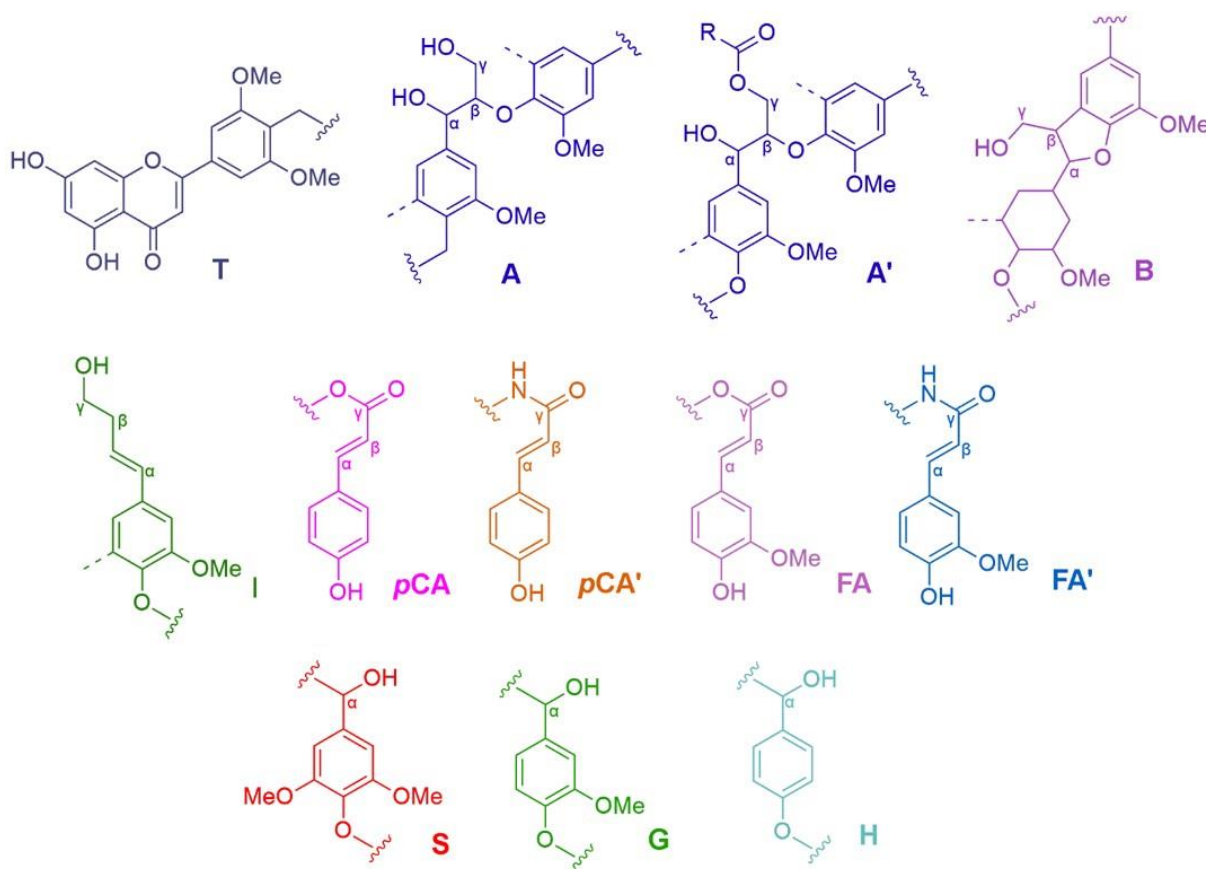


Figure 5.13 - Representation of the main structures present in the PIL-recovered lignins as identified in the 2D HSQC NMR spectra. A: β -O-4-structures; A': β -O-4-structures with acylated (by acetate or *p*CA) γ -OH; B: phenylcoumaran structures formed by β -5-coupling; *p*CA: *p*-coumarate moieties; FA: ferulate moieties; (esterified with hemicelluloses); *p*CA': *p*-coumarate amide; FA': ferulate amide; H: *p*-hydroxyphenyl units; G: guaiacyl units; S: syringyl units; T: Tricin end-groups; I: ρ -hydroxycinnamyl alcohol end-groups. The structures are colored to match the assigned contours in the 2D HSQC NMR spectra in Figure 5.1-5.4.



Carbohydrate signals in the aliphatic side-chain region of the spectra partially overlapped with lignin signals belonging to α -L-(1 $\rightarrow$ 4) arabinose units (Ara) and β -D-(1 $\rightarrow$ 4) xylosyl units (Xn) (Figure 5.9, Figure 5.10, Figure 5.11, Figure 5.12) that are presumably covalently attached to lignin to form xylan-enriched lignin carbohydrate complexes²⁹. The signals in the range δ C/ δ H 62.9–63.0/3.45– 3.9 ppm, assigned to γ -acylated units ($A\gamma'$), were observed in the spectra of recovered lignins isolated with the short chain-length cation, [Eti], combined with anions [For], [Lac] and [Mal] (Figure 5.9, Figure 5.10, Figure 5.11, Figure 5.12). Since it is known that lignins from sugarcane bagasse are highly acetylated at the γ position of

the macromolecule side chain²⁹, this suggests that acyl linkages were chemically altered in the lignin structure during bagasse delignification with increased cation chain length.

The etheric β -O-4 linkage is the dominant type of linkage in grass, softwood and hardwood lignins³⁴ and comprises about 80 % in lignins from sugarcane²⁹. The assignment δ_C/δ_H 71.6/4.88 ppm in the HSQC spectra, corresponding to A α structures was employed for an estimate of the percentage of β -O-4 linkages in all recovered lignins. Regions in the HSQC spectra correlated with β -O-4 linkages also includes δ_C/δ_H 85.4/4.10 ppm for A β in S units and δ_C/δ_H 83.4/4.27 for A β in G units. According to the semi-quantitative analysis, lignins extracted with PILs containing the cation [Eti] exhibited the highest β -O-4' (A α) contents as follows [Eti][Mal] > [Eti][For] > [Eti][Lac] > [Eti][Ac], indicating that shorter chain-length cations tend to preserve the β -O-4 linkage during delignification (Tabela 5.6.). These PILs probably act as weak nucleophiles and remove OH groups (Figura 5.14) from guaiacyl- β -guaiacyl ether-like linkages, which resulted in vinyl ether linkages¹⁵⁵. The relatively lower amount of β -O-4 linkages in lignins isolated with PILs containing the cation [But] in combination with any anion, [Hex][Lac] and [Hex][Mal] indicates moderate depolymerization. On the other hand, the absence of the assignment δ_C/δ_H 71.6/4.88 ppm in the HSQC spectra of [Hex][Ac] and [Hex][For]-recovered lignins can be attributed to the harsh depolymerization conditions (Figura 5.9 and Figura 5.10).

Preserved alkyl-aryl ether linkages are desirable to obtain lignins which allows different types of modifications or applications²¹⁰. In literature was already reported 40 % of β -O-4' linkages was preserved in lignin from wheat grass extracted with alkaline ILs under microwave conditions and 77.4 % of β -O-4' bonds preserved in lignins extracted from eucalyptus with [Bmim][Ace]^{211,212}. The PILs used in our work showed slight alkaline characteristics (pH (5:1 PIL: H₂O) around 6–7.5), which can contribute to preserve the β -O-4' linkages.

Strong signals for phenylcoumaran (B) structures at δ_C/δ_H 62.9/ 3.4–3.7 ppm (B γ) and δ_C/δ_H 86.3/5.44 ppm (B α) were observed only for [But][Lac] and [Hex][Mal]-recovered lignins spectra and a discreet signal for p-hydroxycinnamic alcohol end groups (I) at δ_C/δ_H 60.8/4.11 ppm can be observed in [Eti][Lac]-recovered lignin (Figura 5.11 and Figura 5.12).

In the aromatic region all HSQC spectra are the main correlation signals for the three lignin units (S, G, and H) and the unsaturated side chains of the p-hydroxycinnamates (pCA and FA). Signals representing the S units are at δ_C/δ_H 103.9/6.69–6.78 ppm, and G units

are at δ_C/δ_H 110.5/6.99–7.03 ppm for C_2 correlations and at δ_C/δ_H 114.9–115.4–118.6/6.75–6.90 ppm for $C_{5,6}$ correlations. The H units were analyzed with two assignments for $C_{3,5}$ correlations (δ_C/δ_H 114.4–115.1/6.55–6.70–6.90 ppm) and $C_{2,6}$ correlations (δ_C/δ_H 126.5–127.2/7.05–7.13 ppm). Generally, strong signals for S units were observed for all lignins (Figura 5.9, Figura 5.10, Figura 5.11, Figura 5.12). Signals for G units were absent in lignins extracted with [But][For] and [But][Mal] indicating that G-units were more affected by depolymerization/condensation reactions than S units. Linkages breaks involved in lignin degradation was elucidated by Sakakibara and Yoshihiro (2001)²¹³, which observed that alkaline extraction preferentially breaks the G-type lignins, while Sun et al. (2014)²¹⁴s showed that S-type lignin is preferentially broken down under acidic conditions. In this case, depolymerization reaction can be considered, because the G unit shows more reactivity due to its free ring position (5–5'), whereas S units are more stable^{65,172}. The H signals appeared in lower intensities for all lignins. Additionally, tricin structures (T) at δ_C/δ_H 103.9/7.3 ppm (T'_{2,6}) and δ_C/δ_H 98.8/6.22 ppm (T₆) exclusively for [Eti][Mal]-recovered lignin can be observed (Figura 5.12).

FA units are represented at δ_C/δ_H 110.4/7.31 ppm whereas *p*CA are represented at δ_C/δ_H 115.7/6.90–6.77 ppm for $C_{3,5}$ correlations and δ_C/δ_H 129.5–130.1/7.47 ppm for $C_{2,6}$ correlations. FA assignments were rarely observed in recovered lignins, while *p*CA was prominent. Signals to *p*CA/FA for $C\beta$ and $C\alpha$ are observed in δ_C/δ_H 113.2/6.2 ppm and δ_C/δ_H 144.4/7.5, respectively, indicating *p*-hydroxycinnamates have been esterified in the lignin extraction²¹⁵. Likely, FA are esterified to hemicelluloses and are linked to the lignin by ether and C–C bonds, on the other hand, *p*CA are esterified to the lignin sidechain^{29,216,217}. As hypothesis, *p*-hydroxycinnamates esterified to lignin would remain attached within the lignin structure during extraction. The estimation of subunit composition using the HSQC aromatic region is reported in Tabela 5.6.

Additionally, structures were observed for hydroxycinnamic amides in the correlation signal δ_C/δ_H 138.3/7.30 ppm for $C\alpha'$ and 118.9/6.40 ppm for $C\beta'$ for recovered lignins with [But][Ac], [Hex][Ac], [Eti][Lac], [But][Lac], [Hex][Lac] and [Hex][Mal] indicating amination in FA and *p*CA, both structures of side-chain and easier to attach. Signals of *p*CA and FA amides also were observed by Qin et al. (2015)¹⁵⁸ and elemental analysis can suggest their presence.

As previously determined by Del Río et al. (2015)²⁹, ball-milled bagasse lignin is generally viewed as structurally similar to native lignin, and they observed 60%, 38% and 2% of S, G, H units respectively, giving an S/G ratio of 1.6, 48% of *p*CA and 4% of FA. Comparing these contents with the results obtained in this work, long-chain length cations produced S-enriched lignins. Moreover, the elevated H unit content can be the result of the detachment of *p*-coumaric acid from the hemicellulose-lignin network and possible re-attachment into bulk lignin as H-unit structures¹¹⁵, however, this hypothesis needs to be further investigated. Only lignin extracted with [But][Lac] exhibited lower S content and higher G content compared to the ball-milled bagasse lignin previously characterized²⁹, suggesting that this combination of anion and cation induced condensation reactions. Based on experimental conditions and the methods for subunits quantification applied, it has been suggested that the β -O-4 bond of G-type lignin is chemically cleaved more readily than that of S-type lignin²¹⁸. Changes in S/G ratio after the PILs pretreatment also indicated decrease in the proportion of G-type lignin and an increase in the proportion of S-type, due to depolymerization reactions and resulting in an increase in the S/G ratio, *e.g.*, [Hex][Mal], which has more hydroxyls, hence inducing a positive effect on the subsequent modification and functionalization of lignin²¹¹. Regarding the *p*-hydroxycinnamates, lignin extracted with [But] [Lac] showed the lowest *p*CA content (6.2 %). Except for [Eti][Lac], which efficiently retained *p*CA and FA into the precipitated lignin (75.2% and 10.9% respectively), overall PILs mildly removed *p*CA and completely removed FA units.

Tabela 5.6 - Structural characteristics (lignin inter-unit linkages, end-groups, aromatic units, and G/S ratio and cinnamate content) from the integration of ^{13}C - ^1H correlation peaks in the HSQC spectra of the PIL-recovered lignins.

PIL-recovered lignins	Lignin Interunit Linkages		Lignin aromatic units				<i>p</i> -Hydroxycinnamates	
	β -O-4' aryl ether (A) (%)	Cinnamyl alcohol end-groups (I) (%)	H (%)	S (%)	G (%)	S/G ratio	<i>p</i> CA (%)	FA (%)
[Eti][Ac]	38.3	-	-	67.0	32.9	2.0	67.0	-
[But][Ac]	16.0	-	2.6	66.8	30.6	2.2	19.4	-
[Hex][Ac]	-	-	-	86.8	13.2	6.6	44.2	-
[Eti][For]	39.6	-	0.3	65.8	34.0	1.9	37.8	-
[But][For]	22.4	-	-	100.0	-	-	44.3	-
[Hex][For]	-	-	-	100.0	-	-	57.2	-
[Eti][Lac]	39.5	3.4	12.5	61.1	26.4	2.3	21.0	2.6
[But][Lac]	25.7	-	3.1	52.2	44.7	1.1	6.2	-
[Hex][Lac]	26.6	-	6.6	78.4	15.0	5.2	44.8	-
[Eti][Mal]	52.4	-	2.7	65.2	32.1	2.0	37.3	-
[But][Mal]	11.3	-	-	100.0	-	-	32.5	-
[Hex][Mal]	25.1	-	2.1	91.5	6.4	14.3	26.4	-

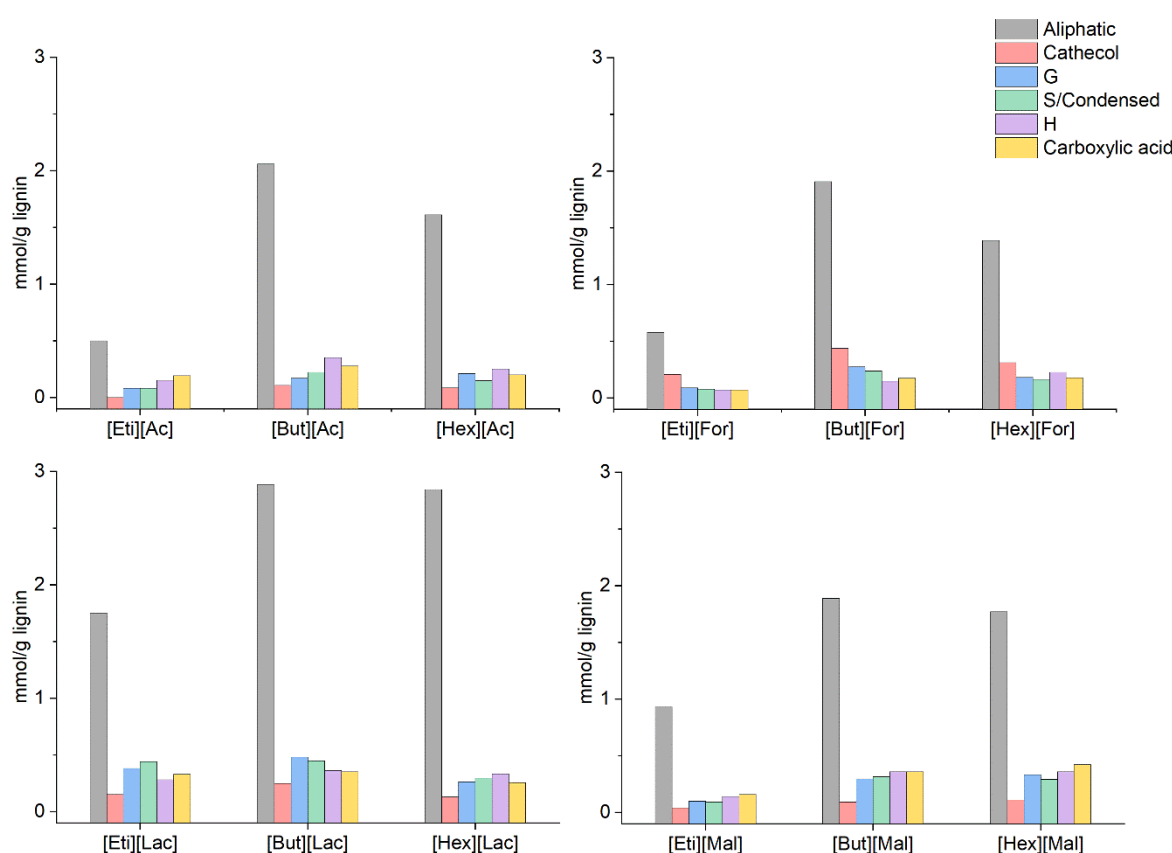
5.2.2.2. Determination of hydroxyl groups in PIL-recovered lignins via quantitative ^{31}P NMR spectroscopy

^{31}P NMR spectroscopy was applied to determine the hydroxyl group content for PIL-recovered lignins. The samples were firstly phosphitylated with 2-chloro-4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaphospholane before ^{31}P NMR analyses. Figura 5.14 displays the data acquired for the distribution of various hydroxyl groups in PIL-recovered lignins. The lignin samples extracted with the cation [But] in combination with any anion exhibited the highest contents of aliphatic, catechol, G, H, S/condensed, and carboxylic acid hydroxyl groups overall, while all other lignins exhibited similar concentrations of G, S/condensed and H hydroxyl groups. Moreover, the carboxylic acid content (~ 2.9 mmol/g of lignin, which report ~ 9.5 %) was low compared to the content of *p*CA (~ 37.2 %). Brandt et al. (2015)¹¹⁵ also observed the same discrepancy with lignins isolated using a PIL since there are no carboxylic groups in the repolymerized *p*CA products during the condensation. Furthermore, the content of carboxylic groups in lignins extracted with [For] and [Mal] cations increased as the length of the anion increased. Independently of anion combination, the aliphatic OH content exhibited the following tendency: [Eti] < [Hex] < [But] and was tentatively attributed to the loss of the C α hydroxyl groups during the high β -O-4 ether breakage induced by [But], thereby corroborating with HSQC data as shown. Moghaddam et al. (2014)¹⁸⁹ attributed the lower content of aliphatic OH groups in IL lignins possibly due to the dehydration reactions that occurs during the extraction, which can be correlated with lignin degradation and subsequently formation of low molecular weight lignin-fragments (Mw). Notably, low aliphatic OH groups content and Mw was observed for lignins extracted by cations [Eti]. Additionally, experiments with lignin models and ionic liquids would be necessary for mechanism elucidation.

^{31}P NMR data suggests that lignins isolated with the cations [But] and [Hex] combined with [Lac] showed higher aliphatic (2.9 and 2.8 mmol/g of lignin, respectively) and total OH (4.8 and 4.1 mmol/g of lignin, respectively) groups content. These lignins can be suitable raw materials for producing resins, due to the convenient formation of network structures^{219,220}. On the other hand, cations [Eti] with any anion would be able to performed polymerization and synthetic reactions, because they have less condensed phenolic groups (0.7 mmol/g of lignin) compared to the other IL-lignins. Moghaddam et al. (2014)¹⁸⁹ also observed the same pattern for comparison between soda lignin - high aliphatic OH (2.34 mmol/g of lignin) and total OH (4.27 mmol/g of lignin) groups - and lignins extracted with IL.

Finally, hydroxyl group analysis confirms that delignification using the synthesized PILs employed in this work occurs by depolymerization followed by condensation. However, it is important highlight that only the non-aqueous insoluble lignin was recovered (small lignin fragments highly hydroxylated remained into solution) and subjected to ^{31}P NMR spectroscopy analysis.

Figure 5.14 - Quantitative ^{31}P NMR analyses to determine the hydroxyl groups content in PIL-recovered lignins from sugarcane bagasse.



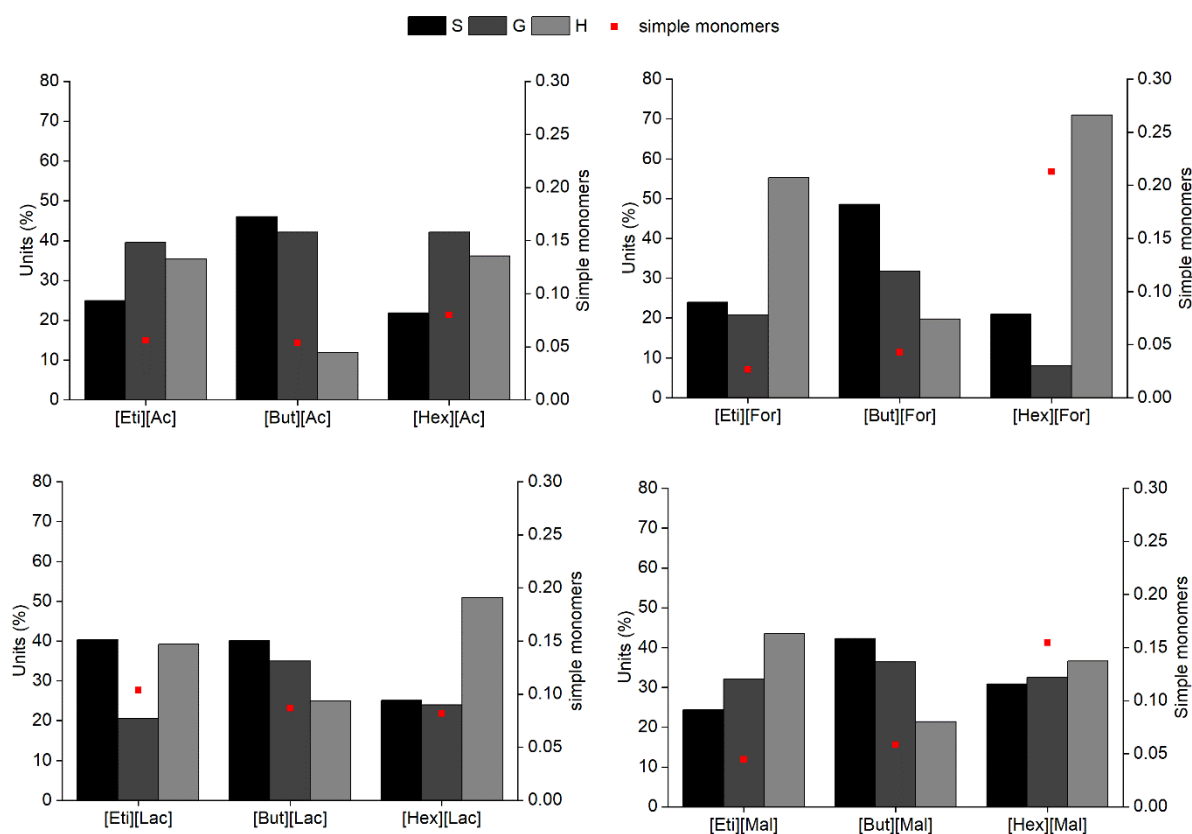
5.2.2.3. PIL-recovered lignins composition by Py-GC/MS analysis

The chemical structure of the pyrolysis products of PIL-recovered lignins was evaluated by Py-GC/MS analysis. More than 40 compounds derived from the different lignin subunits were identified (Appendix A) and subunits quantifications were calculated in Figure 5.15. In particular, the formation of subunits containing free phenolic groups via β -aryl etheric bonds cleavage was evidenced. Elevated content of 4-vinyl phenol (label 18) and 4-vinyl

guaiacol (label 22) were produced during the pyrolysis stages. These pyrolytic products may be derived from *p*CA/H and FA/G, respectively. Interestingly, the product 5-ethyl-2-methyl piperidine was found in higher content for the lignin extracted with [Hex][Ac] and was attributed to the incorporation of the nitrogen from the PILs cation during delignification or traces of the PIL in the precipitated material.

The compositions of lignin recovered with cations [But] showed to be S-enriched, whereas [Eti] and [Hex] were H-enriched. Those alterations can be explained for the favorable demethoxylation reaction occurred as temperature increase analytical pyrolysis. Del Rio et al. (2015)²⁹ observed S-rich for raw bagasse lignin, indicating that lignin extracted with cations [But] preserved the structure for S-derived units. In addition, monomers such as phenol, guaiacol and syringol were observed for all PIL-recovered lignins, suggesting the valorization of lignin in pyrolytic paths.

Figure 5.15 - Units S, G and H and simple monomers (phenol and syringol) by Py-GC/MS analysis of PIL-recovered lignins.



5.2.2.4. PILs lignin molecular weight characterization

GPC was used to investigate the number average molecular weight (M_n), weight average molecular weight (M_w) and polydispersity (PDI) of the PIL-recovered lignins, and the results were reported in Tabela 2.1Tabela 5.7. There were marked variations among the molecular weight distribution of the lignins extracted with the same anion combined with the three cations. No relationship was found between the influence of the chain length of the cation and the M_w , except for the anion [For], for which the M_w increased as the chain length of the cation increased. Moreover, M_w for lignins extracted with [For] were 7-fold higher comparing [Eti] and [Hex]. [Hex][Lac]-recovered lignins exhibited PDI ~ 3.7 while for [Eti][Ac]-isolated lignins it was ~ 7.1 , *i.e.*, the first one, ([Hex][Lac]), is composed by a narrower molecular-weight distribution while the second, ([Eti][Ac]), is more heterogeneous with a wide range of molecular weight lignin fragments. Most of the lignins presented higher PDI values and molecular weight compared to results reported previously^{70,221,222} for lignins from sugarcane bagasse obtained by alkaline pretreatments where the values were around ~ 4000 g/mol.

Low molecular weight lignin (~ 1769 g/mol) was obtained from sugarcane bagasse with [EMIM][OAc] (120 min and 140 °C) as reported by Saha et al. (2018)¹⁹⁴ due to high lignin fragmentation. On the other hand, the M_w values obtained in our work are closely compared to Moghaddam et al. (2014)¹⁸⁹, which determined $M_w \sim 7597$ and ~ 6884 g/mol for lignin extracted from bagasse, respectively with [bmim] Cl– HCl and [bmim][CH₃SO₃] (130 °C and 30 min). It was expected that the lignins with higher M_w were characterized by higher β -O-4 ether linkages content because the bulk structure would dissolve into the PIL in an almost intact way, thus conserving its native linkages. Oppositely, lignins extracted with [Hex][For] showed M_w 13,700 g/mol– and apparently no quantifiable β -O-4 ether linkage (Tabela 5.6). Ovejero-Pérez et al. (2020)²²³ obtained high molecular weight ($\sim 120,988$ g/mol) lignin from eucalyptus using [Mim][Cl] (150 °C and 6 h) and apparently 0.4 % of β -O-4 was quantified. In this case, it was observed the formation of free radicals during the β -O-4' cleavage that might be promoted extensively lignin that explains the high M_w values. Whereas lignin extracted with [Eti][Ac] also showed M_w 13,500 g/mol and 57.2 % of β -O-4 ether linkage content. As such, it would seem reasonable to expect that the mechanism behind the lignin dissolution process occurred by depolymerization. The cleavage of ether linkages could generate unstable charged intermediates, which can further repolymerize and/or depolymerize into new fragments. Additionally, it has previously been demonstrated that hydrogen bonding in PIL significantly

influences anion–cation interactions and consequently alters the solvation of the protonated lignin and reaction pathways²²⁴.

Tabela 5.7 - Weight-average (Mw) and number-average (Mn) molecular weights and polydispersity (Mw/Mn) of the PIL-recovered lignins.

Lignin	Mn (g/mol)	Mw (g/mol)	PDI
[Eti][Ac]	1896	13539	7.1
[But][Ac]	1196	6682	5.5
[Hex][Ac]	1773	10018	5.6
[Eti][For]	2746	1921	5.7
[But][For]	1611	8075	5.0
[Hex][For]	2413	13717	5.6
[Eti][Lac]	912	5502	6.0
[But][Lac]	931	3993	4.2
[Hex][Lac]	2640	9795	3.7
[Eti][Mal]	1689	9707	5.7
[But][Mal]	1172	6135	5.2
[Hex][Mal]	1971	7955	4.0

5.2.2.5. Elemental analysis of the PIL-recovered lignins

The elemental composition of the PIL-recovered lignins (C, H, N, and O), including C₉₀₀ formula and the content of methoxyl groups in lignin (wt %) were determined (Tabela 5.8). Up to 2 % of N content for the PIL-recovered lignins was detected and this indicates amine incorporation from the PILs cation to lignin during delignification, as past studies suggested^{168,169,189} and observed by 2D HSQC NMR. On the basis of these results, the lignin recovered has potential to be addressed for the production of surfactants, chemicals and slow-release fertilizers scaffolds¹⁸⁹, avoid extra step of Mannich reaction. [Eti]-recovered lignins in combination with any anion showed the lowest C, H and N content and the highest oxygen content.

The degree of unsaturation (DOU) showed lignin with values from 173 to 403 indicating that lignin fragmentation may have occurred at different extents. [Eti][Lac] shows DOU of 173, suggesting that lignin extraction under mild conditions (2 h at 105 °C) have less unsaturated bonds in the side-chain of the lignin. This is due to the dehydration reaction¹⁷¹ during extraction in PILs, which is supported by ³¹P NMR. The DOU values are in agreement with lignins extracted with ILs previously described in the literature^{172,211,225}.

Tabela 5.8 - Elemental composition of the PIL-recovered lignins, C₉₀₀ formula and degree of unsaturation (DOU).

PIL-recovered lignins	%C	%H	%N	%O	%OCH ₃	C ₉₀₀ formula	DOU
[Eti][Ac]	39.2	5.5	2.5	53.5	0.3	C ₉₀₀ H ₁₅₀₄ O ₉₁₀ N ₄₉	173
[But][Ac]	58.5	6.8	4.1	30.7	0.7	C ₉₀₀ H ₁₂₄₆ O ₃₅₃ N ₅₄	305
[Hex][Ac]	59.5	7.8	3.9	28.8	0.1	C ₉₀₀ H ₁₄₀₅ O ₃₂₇ N ₅₀	223
[Eti][For]	48.6	5.3	3.2	43.0	1.0	C ₉₀₀ H ₁₁₆₉ O ₅₉₆ N ₅₀	342
[But][For]	56.9	6.9	4.3	31.8	0.8	C ₉₀₀ H ₁₃₀₀ O ₃₇₉ N ₅₈	280
[Hex][For]	57.0	7.5	4.2	32.1	0.6	C ₉₀₀ H ₁₄₁₁ O ₃₇₁ N ₅₆	224
[Eti][Lac]	59.4	5.7	3.0	32.0	1.4	C ₉₀₀ H ₁₀₃₆ O ₃₇₀ N ₃₉	403
[But][Lac]	62.6	7	4.0	26.4	0.1	C ₉₀₀ H ₁₁₉₉ O ₂₈₅ N ₄₉	326
[Hex][Lac]	60.7	6.6	3.3	29.4	0.5	C ₉₀₀ H ₁₁₆₆ O ₃₂₇ N ₄₁	339
[Eti][Mal]	40.7	4.5	2.0	52.8	0.2	C ₉₀₀ H ₁₁₈₅ O ₈₇₇ N ₃₇	327
[But][Mal]	58.9	6.6	3.4	31.1	0.8	C ₉₀₀ H ₁₂₀₁ O ₃₅₆ N ₄₄	322
[Hex][Mal]	60.7	7.7	4.2	27.4	0.5	C ₉₀₀ H ₁₃₆₀ O ₃₀₅ N ₅₃	247

5.2.2.6. Thermal analysis of the PIL-recovered lignins

The thermogravimetric curves (TG) and their derivative curves (DTG) of the PIL-recovered lignins were recorded to investigate the effect of PIL choice on the kinetics of lignin thermal decomposition (Tabela 5.9). The degradation process can be divided into mainly 3 steps: 1) the range from 25 to 200 °C which was attributed to the elimination of water and PIL residues; 2) from 200 to 400 °C, it is related to the degradation of hemicelluloses and cellulose residues and 3) from 400 to 500 °C, it is related to the decomposition of aromatic hydrocarbons, alcohol, aldehydes, hydroxyl phenolic compounds^{201,226}. Similar mass loss trends are observed for all lignins recovered, which was also observed by Moghaddam et al. (2014)¹⁸⁹ and Ovejero-Pérez et al. (2020)²²³.

All PIL-recovered lignins presented similar initial mass losses (25– 100 °C), indicating that the initial water content was quite similar. [But][For]-, [Hex][For]- and [Hex][Mal]-recovered lignins presented mass loss in the second stage (100– 200 °C) up to 15 %, which suggests that PIL traces content and was higher in those samples. These outcomes are supported by the elemental composition results (Tabela 5.8). On the third stage (200– 300 °C), the mass loss variations were not significant, but it has increased as the chain length of PILs

increased. Then, the content of cellulose and hemicellulose was directly affected by this factor. The same pattern mentioned above was observed for the last stages (300– 450 °C and 450– 900 °C), showing that aromatic and functional groups decomposition and unburned inorganic compounds in PIL-recovered lignins suffered loss in thermal stability by 10%. However, it is worth mentioning that all materials are still a promising source of chemicals or hydrocarbon fuel through pyrolysis.

Tabela 5.9 - Weight loss percentage at different temperature regions for PIL-recovered lignins.

PIL-recovered lignins	Weight loss lignin (%)				
	0- 100°C	100- 200°C	200- 300°C	300- 450°C	450- 900°C
[Eti][Ac]	6.0	8.0	20.0	52.0	61.7
[But][Ac]	3.6	9.5	27.2	52.7	71.2
[Hex][Ac]	3.0	10.9	27.5	59.4	70.9
[Eti][For]	7.2	10.8	27.2	53.6	64.4
[But][For]	3.8	25.3	30.5	55.6	66.9
[Hex][For]	3.6	22.0	36.6	59.7	71.1
[Eti][Lac]	5.9	7.9	22.7	50.3	62.0
[But][Lac]	3.0	7.0	27.2	54.0	69.5
[Hex][Lac]	2.6	10.3	29.4	60.2	70.2
[Eti][Mal]	5.3	7.2	19.0	49.1	57.3
[But][Mal]	3.4	7.0	23.4	51.6	64.0
[Hex][Mal]	2.7	15.6	32.4	55.1	73.6

5.2.3. Conclusion

This study investigated the differences in composition and structure of the lignins extracted from sugarcane bagasse with PILs. [Eti][Mal] lignin suggests preserving β -O-4 linkage, thus contributing to their less deconstructed shape. However, an increase in the S unit is observed, which points to depolymerization reactions with ether bond cleavage and monomers formation. On the other hand, condensation reactions have also been observed, which corroborates with the high Mw of cation [Hex], consequently resulting in an increase in phenolic hydroxyl group content.

PILs pretreatment provides the opportunity for tailored lignins production according to cations and anions characteristics. The use of cation [Hex] influence condensation reactions, resulting in lignins with higher Mw, which can be directed for additives and resins applications, whereas the use of [But] potentialize depolymerization reactions, producing

monomers for fine chemicals applications. Lignin utilization as by-products instead of waste creates opportunities to dramatically increase commercial viability of cellulosic ethanol biorefinery

5.3. Considerações

Nestes artigos foram discutidas as influências de cátions com grupos funcionais (-OH e -NH₃) e a influência do aumento da cadeia do cátion nas estruturas das ligninas. A partir das análises foi possível ter um conhecimento abrangente da estrutura da lignina para posteriormente aumentar seu valor agregado dentro da biorrefinaria. Uma grande vantagem da lignina obtida com os LIPs deste trabalho é o processo de aminação que ocorre naturalmente no caso dos LIPs à base de aminas, etapa que normalmente é realizada no *upgrading*.

No presente trabalho vários métodos foram usados para caracterizar as estruturas de ligninas obtidas pelo pré-tratamento, e as estruturas extraídas variaram de acordo com o cátion e ânion dos LIPs, entretanto os resultados analíticos foram fortemente dependentes dos processos de degradação (*e.g.*, temperatura). Portanto, no próximo capítulo, para um conhecimento por completo da estrutura a variação do tempo e da temperatura foram realizadas para avaliar o comportamento da estrutura das ligninas extraídas, e assim obter um estudo mais completo e novas oportunidades de aplicações de produtos.

CAPITULO 6

6. Otimização de pré-tratamento e sua influência na estrutura da lignina

Neste capítulo os LIPs com as melhores performances anteriormente discutidas ([Etid][Ac], [Etid][Lac] e [2He][Lac]) foram submetidos a um estudo levando em consideração a variação das condições de tempo e temperatura do pré-tratamento. As ligninas obtidas dessas cinéticas também foram analisadas visando entender como a estrutura se comporta sob a variação das condições de pré-tratamento e quais reações podem ocorrer no meio.

Os bagaços pré-tratados na melhor condição para cada solvente foram submetidos à hidrólise enzimática e posterior fermentação para avaliar a influência do pré-tratamento na fermentação dos açúcares em etanol. Por fim, neste capítulo é apresentado o balanço de massa do processo considerando etapas de pré-tratamento, hidrólise e fermentação para um mapeamento completo. Os resultados estão apresentados na forma de um artigo publicado à revista ACS Sustainable Chemistry & Engineering²²⁷ e ao final do capítulo são feitas as considerações finais.

6.1. Effect of protic ionic liquids in sugarcane bagasse pretreatment for lignin valorization and ethanol production

Thaynara C. Pin[†]§, Sarita C. Rabelo[‡], Yunqiao Pu^{||}, Arthur J. Ragauskas^{||}£, Aline C. Costa^{*†}

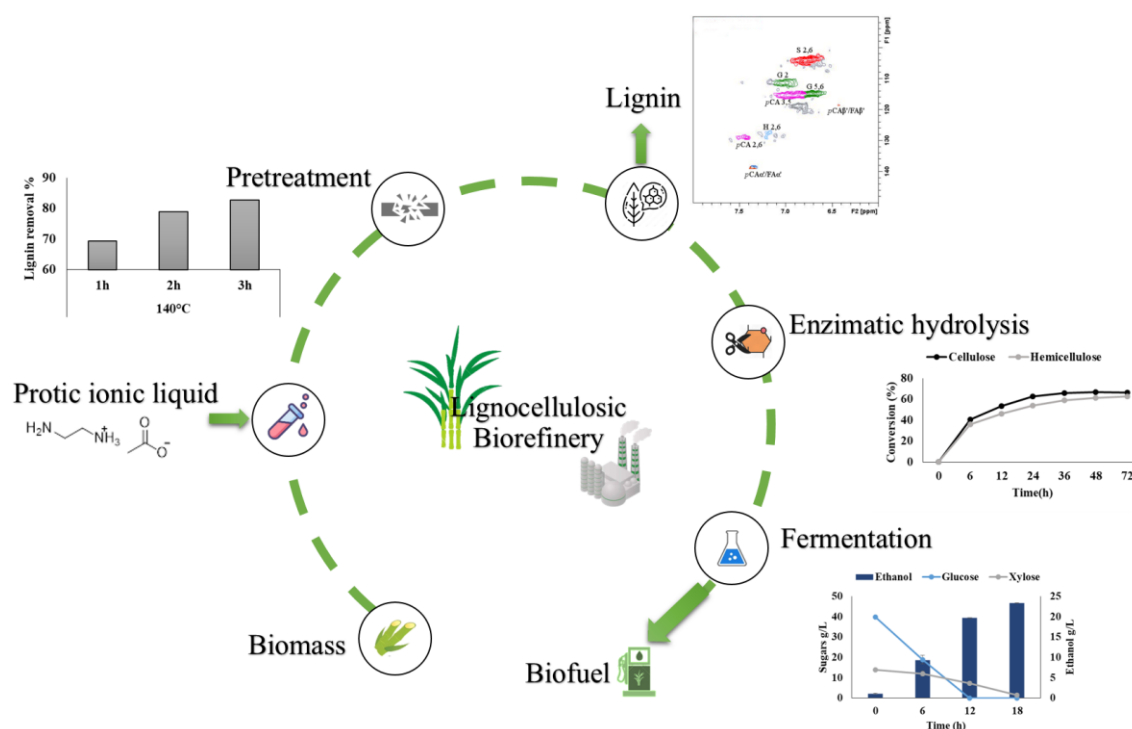
[†]Chemical Engineering School, State University of Campinas (UNICAMP), Av. Albert Einstein, Campinas, Sao Paulo, 13083-852, Brazil.

[§]Department of Chemical and Biomolecular Engineering, University of Tennessee, Middle Dr, Knoxville, TN, 37916, USA.

[‡]Department of Bioprocess and Biotechnology, College of Agricultural Sciences, São Paulo State University (UNESP), Av. Universitaria, Botucatu, Sao Paulo, 18610-034 Brazil.

^{||}Biosciences Division, Joint Institute for Biological Sciences, Oak Ridge National Laboratory (ORNL), Bethel Valley Rd. Oak Ridge, TN, 37831, USA.

[£]Center for Renewable Carbon, Department of Forestry, Wildlife, and Fisheries, University of Tennessee, Institute of Agriculture, Morgan Cir Dr, Knoxville, TN 37996, USA.



6.1.1. Abstract

Ionic liquids have been called designer solvents because it is possible to fine-tune their properties from a huge range of possible combinations of cations and anions. In this work, we evaluate the potential of protic ionic liquids (PILs) in the fractionation of sugarcane bagasse in a biorefinery context. The PILs were designed to selectively solubilize lignin and leave a polysaccharides solid fraction. The carbohydrate fraction was further hydrolyzed to obtain pentose and hexose sugars, which were fermented using a pentose-consuming yeast. The results have shown that, differently from pretreatments that solubilize hemicelluloses, pentoses could be fermented together with hexoses without a prior detoxification step with high yield and productivity. The lignin recovered was characterized by 2D HSQC NMR, ^{31}P NMR, and GPC, showing that the design of the PIL influences lignin characteristics, but pretreatment temperature and time do not. The lignins obtained are sulfur-free, and the richness of their functional groups makes them attractive for conversion into a diversity of value-added products, which can make a biorefinery based on the proposed process viable.

6.1.2. Results e discussion

6.1.2.1. Effects of temperature and time on the pretreatment, enzymatic hydrolysis and lignin structure

The effects of pretreatment temperature and time on the solubilization of sugarcane bagasse lignin and on the enzymatic saccharification of the solid fraction obtained in the pretreatment were investigated with the PILs [Etid][Ac], [Etid][Lac] and [2He][Lac]. Figura 6.1.1 shows the percentage of cellulose and hemicellulose conversion in the enzymatic hydrolysis step and the lignin solubilization in the pretreatment step considering each of the operational conditions described in methodology. The standard deviations were calculated based on triplicates at the central point.

Analyzing the results, it is possible to observe that both the solubilization of lignin and the conversions of cellulose and hemicellulose increase with increasing time and temperature for all the PILs studied. This is probably related to the breaking of the ether and ester bonds (catalyzed hydrolysis) between the lignin and polysaccharides. The stronger the proton dissociation ability of the anion to break this linkages, the better the delignification effect. The highest lignin solubilization, 82.7 %, was observed in the pretreatment using [Etid][Ac] at 140°C in 3 (Figura 6.1.1 a). On the other hand, for [2He][Lac], even employing

higher temperature (140 to 160°C) (Figura 6.1.1c), lower lignin solubilization values, < 51.0 %, were observed in comparison with other PILs. This means that the nature of the PILs have more influence in the solubilization than pretreatment time and temperature. Saha et al. (2017)²²⁸ reported lignin removal of 90.1 % from bagasse using [EMIM]OAc at the optimal pretreatment conditions: 2 h at 140°C and ionic liquid to bagasse ratio equal to 20:1 (w/w). Although the studies use a high amount of IL in the pretreatment step, PILs can be recycled and reused at least three or four times, which shows the process is potentially economically feasible^{16,21,25}.

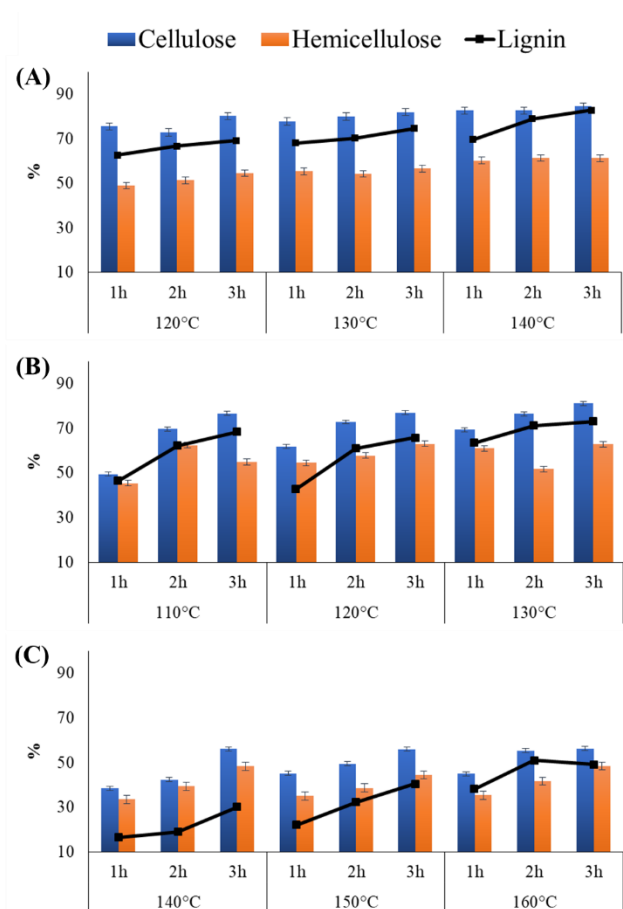
The higher lignin solubilization leads to higher conversion in the enzymatic hydrolysis step (Figura 6.1.1), due to the breaking of the hydrogen linkages present in the biomass. This reduces the crystallinity, degree of polymerization and increases the hydrophilicity and reactivity of cellulose, making the carbohydrates more easily accessible to hydrolysis enzymes^{91,229,230}. An increase in pretreatment temperature and time also contributed to higher enzymatic hydrolysis conversions, from 75.5 % (1 h at 120°C) to 84.4 % (3 h at 140°C) for cellulose and from 48.9 % (1 h at 120°C) to 61.3% (2 and 3 h at 140°C) for hemicellulose, using [Etid][Ac]. For [Etid][Lac], cellulose conversion increased from 49.5% (1 h at 110°C) to 81.2% (3 h at 130°C) and hemicellulose conversion from 45.5 % (1 h at 110°C) to 62.9% (3 h at 130°C). For [2He][Lac], conversions increased from 38.5 % (1 h at 140°C) to 56.3 % (3 h at 160°C) for cellulose and from 33.5 % (1 h at 140°C) to 48.5 % (3 h at 160°C) for hemicellulose. The higher conversion of cellulose was in the pretreatment with [Etid][Ac], 84.4 %, at 140°C and 3 h (Figura 6.1.1 a) and that of hemicellulose was 62.9 %, for [Etid][Lac] pretreatment at 130°C and 3 h (Figura 6.1.1 b).

The conversion values of the hemicellulose fraction in enzymatic hydrolysis ranged from 33.5 to 62.9 %, higher than those commonly reported in the literature for alkaline pretreatments²³¹. The PILs used in the present work keep hemicellulose in the solid fraction and it can be converted into fermentable sugars in hydrolysis. In general, this does not occur in pretreatments with alkaline characteristics, such as diluted NaOH⁶⁸ and [2He][Ocaproic]¹⁶.

In general, considering the conversion and lignin solubilisation effects, the solvents performance follows the order: [Etid][Ac] > [Etid][Lac] > [2He][Lac]. The anion [Ac] led to better results when compared to the anion [Lac], and the cation-functionalized amine, [Etid], was superior to hydroxyl, [2He] (Figura 6.1.1). The anion [Ac] has demonstrated high efficiency for lignin solubilization and cellulose conversion¹⁷. Rocha et al. (2017)¹⁶, using

[2He][Ac], achieved lignin solubilization > 60% and cellulose conversion > 75 % with pretreatment for 3.5 h and 150°C¹⁶. [Ac] contributes to the transformation of cellulose I into II, which combined with temperature-time can lead to cellulose chain rearrangement and improve the structural regularity and chain mobility in hydrolysis¹¹⁶.

Figure 6.1.1 - Cellulose and hemicellulose conversion obtained in the enzymatic hydrolysis and lignin solubilization in the pretreatment step based on time and temperature for PILs pretreatment. (A) [Etid][Ac], (B) [Etid][Lac], (C) [2He][Lac].



The lignin recovered with the ILs pretreatment has purity > 90 % and a higher market value.¹⁵. On this work, the structure of lignin is characterized, as well as the effect of pretreatment temperature and time on its structure after pretreatment. Figure 6.1.2 shows the summarized data obtained and Figure 6.1.3 shows the results of 2D HSQC NMR for the optimized conditions of each PIL used in the pretreatment. The complete results of

characterization of the structures of the lignins precipitated in the HSQC spectra for all compounds are in the Mendeley Data²³².

In general, the temperature and time values used in this work did not influence the structure of the lignin obtained. On the other hand, the solvent used in the pretreatment has stronger influence in some characteristics (Figura 6.1.3). In the aliphatic-oxygenated region (δ_C/δ_H 50-110/3.0-5.5 ppm) the main correlation of the spectra is the interunit linkage of the lignin side-chains, such as β -O-4' substructures. Lower β -O-4' signals were observed in the lignin obtained from pretreatment with [2He][Lac], due to the higher temperature of extraction compared to other solvents. Lower temperatures tend to preserve structures and prevent recondensation reactions. In the aromatic/unsaturated region (δ_C/δ_H 90-150/6.0-8.0 ppm) of the spectra, the main signals relate to the aromatic rings of the S:G:H lignin units. S units were approximately 60 %, while G units were 40 %. These G units are more reactive due to their free ring position (5-5'), while S units are more stable, indicating, if depolymerization reactions occur, they happen more easily in G units.⁶⁵ H units were observed in high amount (~20 %) with the pretreatment using [2He][Lac], which was also detected by Brandt et al. (2015)¹¹⁵ and Wen et al. (2014)¹⁷².

The *p*CA followed the same behavior observed for the H units, probably due to the fact that *p*CA can be hydrolysed and/or repolymerized during pretreatment. In this case, also considering the acylation of the γ -carbon of the lignin side-chains, *p*CA may have been totally hydrolyzed, being present in the free form in the alkaline lignins, such as those extracted by [2He][Lac]. The presence of signals for *p*-coumaryl amide (*p*CA') and feruloyl amide (FA') showed the degradation of side chains and aromatic units of lignin utilizing PILs synthesized by primary amine cations. This effect was observed by Pin et al. (2020)⁸⁵, Qin et al. (2015)¹⁵⁸ and Wen et al. (2014)¹⁷².

FA has the capability to chemically crosslink lignin and hemicelluloses^{115,154}. They are found in high amount in grass biomass, however, they are absent for this pretreatment because it is in the external parts of the side chains²³³, therefore they are more susceptible to solubilization by the PILs, as observed by Pin et al. (2021, 2020)^{85,167}.

Figura 6.1.2 - Radar tool with summarized data from 2D HSQC NMR, ^{31}P NMR and GPC analysis for recovered lignins by [Etid][Ac] (A), [Etid][Lac] (B) and [2He][Lac] (C) in relation to time (h):temperature ($^{\circ}\text{C}$).

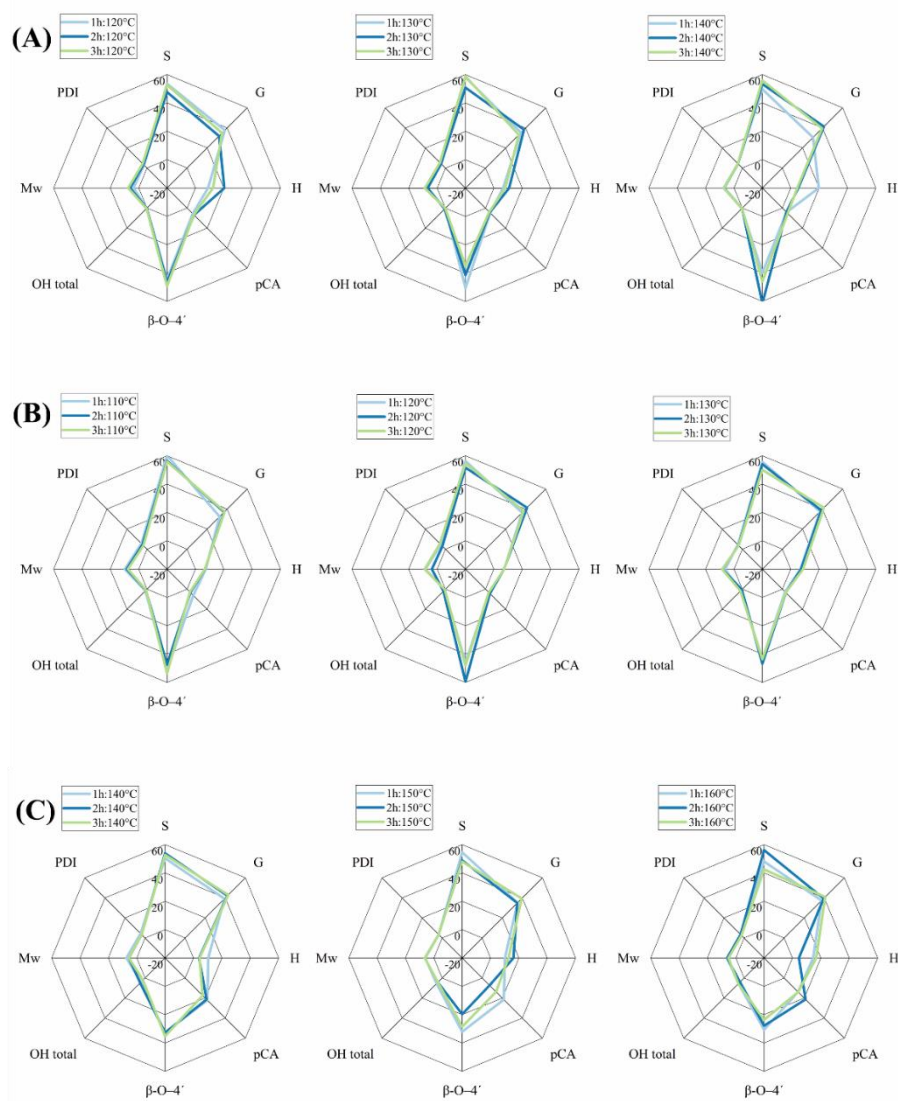
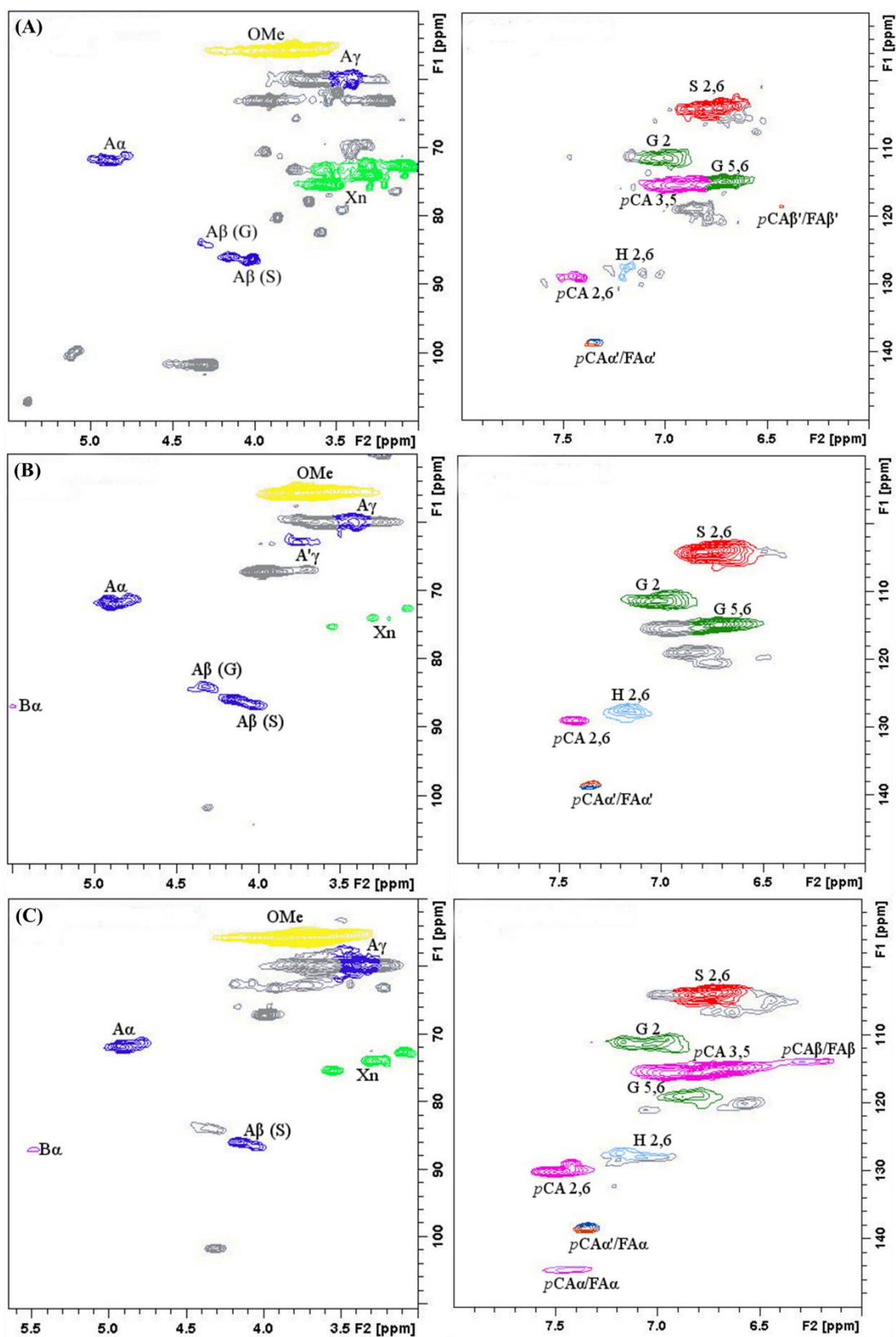


Figure 6.1.3 - 2D HSQC NMR analysis for recovered lignins by [Etid][Ac] (A), [Etid][Lac] (B) and [2He][Lac] (C) in relation to time (h):temperature (°C) optimized.



The average molecular weights (Mw) of the lignin recovered by [2He][Lac] were lower than that of the lignin from [Etid][Ac] and [Etid][Lac]. The Mw values are from 6.0 to 9.8 kDa and, on average, the Mw and Polydispersity Index (PDI) values follow the order: [Etid][Lac] > [Etid][Ac] > [2He][Lac]. It is possible that the higher Mw of the lignin precipitated with [Etid][Lac] is due to a greater degree of branching and condensation. The lower Mw of the lignin obtained with [2He][Lac] may be a consequence of the higher temperature of the reaction and low condensation. Although these are plausible explanations using Mw values, it is more than likely that the lignins recovered with [Etid][Lac] and [Etid][Ac] were less exposed to β -O-4' cleavage, as observed in Figura 6.1.2.

The measurement of total OH was based on ^{31}P NMR, which is routinely used to quantify unlike OH groups in the structure of lignin. The integration data of various OH groups for all the lignins are summarized in the Mendeley Data²³². Total OH values for the recovered lignins follow the order: [2He][Lac] > [Etid][Lac] > [Etid][Ac]. The higher percentage of OH groups for the lignin extracted with [2He][Lac] PIL may be due to the low Mw. It may also be associated to the highest breakdown of ether linkages throughout removal, due to a potential cleavage of this linkages by the PILs. On the other hand, the lignin extracted by [Etid] cation showed low solubilization for OH quantification ($< 1.0 \text{ mmol/g}$)⁸⁵.

The elucidation of the mechanism of lignin extraction with PILs is presented in the literature^{172,223,224}. According to the radar tool proposed by Costa et al. (2015)²⁰², it is possible to suppose that [Etid] extracted lignins with moderately preserved structure, with high β -O-4. On the other hand, condensation reactions were not observed for lignins from [2He][Lac] due to the higher temperature used for lignin solubilisation. Thus, lower Mw was obtained, indicating the presence of monomers, dimers and trimers.

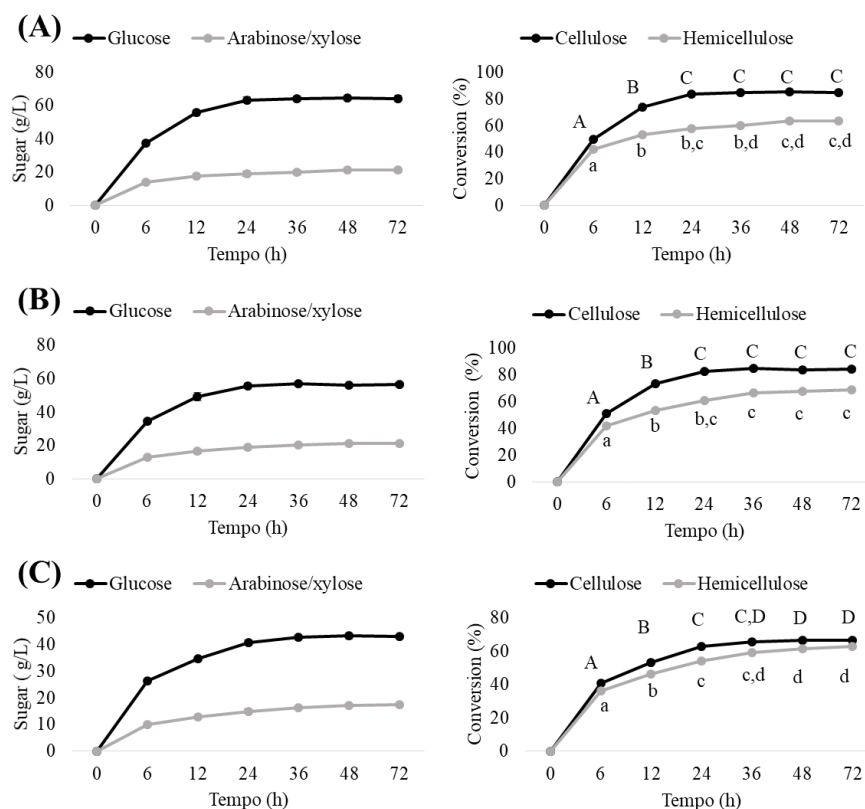
The lignins obtained in the present work are sulfur-free. The richness of their structure and their functional groups makes them attractive for conversion into a diversity of value-added products, such as carbon fiber, vanillin, phenolic resins and so on. Current upstream and downstream valorization enables fine-tuning of lignin as a building block for high-value chemicals⁷, which can be made easier by designing PILs to obtain lignins with the desired characteristics.

6.1.2.2. Enzymatic hydrolysis and fermentation

The bagasse obtained after pretreatment with the PILs [Etid][Ac], [Etid][Lac] and [2He][Lac] for 3 h at 140°C, 130°C and 160°C, respectively (experimental setup)²³², were hydrolyzed by the enzymatic complex Cellic Ctec2 and the kinetic profiles are presented in Figura 6.1.4. The results of the conversion of cellulose and hemicellulose were not significantly different at the 90% confidence level by the Tukey test above 24 h, thus it is not necessary to perform the hydrolysis for 72h, which increases hydrolysis productivity. The range of cellulose conversion from 6 to 72 h of hydrolysis was: 49.6 ± 0.0 % to 84.8 ± 0.6 % ([Etid][Ac]), 51.1 ± 0.5 % to 84.7 ± 0.4 % ([Etid][Lac]) and 40.6 ± 1.1 % to 66.5 ± 0.7 % ([2He][Lac]). For hemicellulose conversion, the ranges were: 42.2 ± 0.0 % to 63.7 ± 1.9 % ([Etid][Ac]), 42.0 ± 1.5 % to 69.0 ± 0.6 % ([Etid][Lac]) and 36.1 ± 0.3 % to 62.6 ± 1.0 % ([2He][Lac]). These values are high compared to the literature^{16,154}. Most pretreatments remove hemicellulose from the solid fraction of the biomass along with various inhibitory substances, requiring a detoxification step before the fermentation of the pentose fraction²³⁴. In the pretreatments evaluated in this work, as hemicellulose remains in the solid fraction, it is hydrolysed in the hydrolysis step without the formation of inhibitors. Thus, the fractions of hexoses and pentoses can be fermented together and without the need for prior detoxification.

After enzymatic hydrolysis, the fermentation was performed for each pretreatment evaluated, also considering a control fermentation. Fermentations were carried out for 24 h, but volumetric productivity (Qp) values were calculated at 18h. The Qp values obtained were from 1.21 to 1.61 g/L.h and the yield (η) was from 82 to 85 %. As can be seen in Figura 6.1.5, a significant increase in ethanol production and substrate consumption (sugars) was achieved along the first 6 h for all samples, but maximum ethanol production was in general attained at 18h. As shown in Tabela 6.1.1, the kinetic parameters of all the fermentations showed no statistical difference by the Tukey test ($p < 0.1$).

Figura 6.1.4 - Kinetic of results of sugar and conversion in the enzymatic hydrolysis for pretreatment in the optimized conditions: (a) [Etid][Ac] (140°C and 3 h), (b) [Etid][Lac] (130°C and 3 h) and (c) [2He][Lac] (160°C and 3 h). Different letters above symbol indicate a significant difference among hydrolysis time ($p < 0.1$) by the Tukey test.



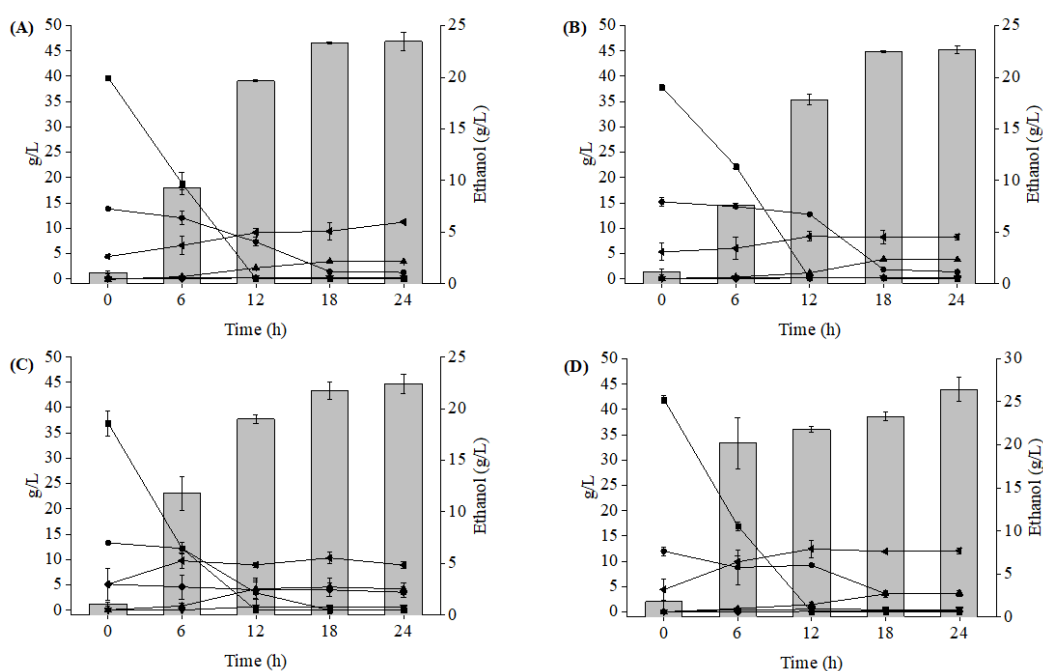
The fermentation times were different in the works, but none of the studies reached high values of $Y_{P/S}$ and Q_P . Biazi et al. (2020)²³⁵ and Bonan et al. (2020)¹³⁸ worked with hemicellulosic hydrolysates obtained from acid pretreatment and *S. passalidarum*. Biazi et al. (2020)²³⁵ worked with a 1.4 L bioreactor and 900 mL of working volume using 30 g/L glucose, 75 g/L xylose and 20 g/L of initial cell concentration at 30°C, 48h, 200 rpm and k_{La} of 8.0 h⁻¹. On the other hand, Bonan et al. (2020)¹³⁸ used 27.7 g/L of glucose and 66.3 g/L of xylose in a 3L bioreactor containing 1.4L of working volume, 17.2 g/L of initial cell concentration, at 30°C, 48h, 200 rpm and k_{La} of 4.9 h⁻¹. Both authors were able to obtain ethanol concentrations of 37.0 ± 0.09 g/L and 28.6 ± 0.4 g/L, respectively. However, Q_P was 0.87 ± 0.002 g/L.h and 1.12 ± 0.01 g/L.h, and η was 67.4 ± 3.2 % and 56.8 ± 0.5 %, respectively. Although these works were carried out in bioreactors and with a high biomass concentration, the values of productivity and yield were lower than those obtained in the present work (carried out in flasks with low biomass

concentration). This is probably due to the incidence of inhibitors in the hydrolysate from acid pretreatment, which are not present in the hydrolysate obtained with the pretreatment with the PILs studied.

Tabela 6.1.1 - Fermentation Fermentation in the optimized conditions [Etid][Ac] (140°C and 3 h), [Etid][Lac] (130°C and 3 h) and [2He][Lac] (160°C and 3 h) using *S. passalidarum* at 30°C, 18h and 150 rpm . Different letters mean that the values are different significantly for Tukey test

	[Etid][Ac]	[Etid][Lac]	[2He][Lac]	Control
Initial dry cell weight (g/L)	4.4±0.3 ^a	5.3±1.7 ^a	5.1±0.2 ^a	5.9±2.1 ^a
Initial sugars (g/L)	53.5±0.7 ^b	53.0±1.3 ^b	50.2±2.2 ^b	54.2±1.8 ^b
Ethanol (g/L)	23.3±0.1 ^c	22.5±0.1 ^c	21.7±0.8 ^c	23.3±1.0 ^c
Y _{P/S} (g _{EtOH} /g _{sugar})	0.44±0.00 ^d	0.42±0.01 ^d	0.43±0.00 ^d	0.43±0.00 ^d
Y _{X/S} (g _{cell} /g _{sugar})	0.18±0.03 ^e	0.15±0.02 ^e	0.21±0.03 ^e	0.19±0.01 ^e
Q _P (g _{EtOH} /L.h)	1.30±0.00 ^f	1.25±0.01 ^f	1.21±0.05 ^f	1.61±0.00 ^f
η (%)	85.3±0.8 ^g	82.9±2.4 ^g	83.7±0.4 ^g	84.0±0.9 ^g

Figura 6.1.5 - Fermentation of glucose and arabinose/xylose for pretreatment in the optimized conditions: (a) [Etid][Ac] (140°C and 3h), (b) [Etid][Lac] (130°C and 3h) and (c) [2He][Lac] (160°C and 3 h), (d) control. (■) Glucose; (●) Arabinose/xylose; (▲) Glycerol; (▼) Xylitol; (◀) DCW; (◆) Acetic acid; (—) Ethanol.



The high ethanol productivity obtained in this work may be related to the absence of inhibitors, the headspace volume of the flask and the stirring rate, which led to good aeration rates. Bonan et al. (2020)¹³⁸ studied the effect of oxygen availability on the fermentation by *S. passalidarum* and concluded that an adequate volumetric oxygen transfer coefficient combined with high cell density resulted in an increase in the Q_p and a decrease in the time for sugar exhaustion.

A comparison with the work of Nakasu (2021)²³⁶ shows the influence of the headspace volume. The author evaluated the fermentation of the hydrolysate of the pretreatment with the PIL [2He][Ac] by *S. passalidarum* (42.9 g/L of glucose and 24.3 g/L of xylose) in 150 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of work volume and using 11 g/L cell at 110 rpm, 72h and 28 °C. The study reported Q_p of 0.56 g/L.h. In the present work it was possible to observe Q_p 2.5 times higher in 18 h using half of the cell concentration (Tabela 6.1.1).

Increasing the initial cell concentration is a strategy to accelerate the fermentation, increasing productivity¹⁴³. All fermentations showed similar fast glucose intakes from 6 to 12 h (Figura 6.1.5). However, xylose consumption, although it started together with glucose consumption, remained at a slow rate until glucose exhaustion and in sequence presented faster intake from 12 to 18 h.

Nakasu (2021)²³⁶ (conditions mentioned above) carried out fermentations with a higher initial concentration, of 11 g/L, and observed xylose exhaustion in 72h, reaching values of 28.6 g/L of ethanol and 89.3 % of yield. Soares et al. (2020)¹⁴³ worked with hemicellulosic hydrolysates - 67 g/L of xylose and 27 g/L of glucose - obtained from acid pretreatment in 500 mL erlenmeyer flasks containing 250 mL of working volume at 200rpm, 72h and 30 °C, using *S. passalidarum* and initial biomass concentrations of 16.4 g/L. The complete consumption of xylose occurred in 72 h of fermentation and the concentration of ethanol and yield values obtained were 30 g/L and 69.0 %, respectively. The slower consumption of xylose in the work of Soares et al. (2020)¹⁴³ may have been influenced by inhibitors produced in acid pretreatment, but Nakasu (2021)²³⁶ also used pretreatment with PILs.

Barcelos et al. (2021)²³⁷ pretreated a mixture of pine, almond and walnut wood (1:2:2) using 10% wt of [Ch][Lys] at 160°C, 50 rpm, and 3h. The author's fermentation of C5/C6 sugars were performed using genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* for 7 days and a yield of 77.4% was reached on pilot-scale fermentation, producing 27.7g/L of ethanol. The authors concluded that pretreatment with PILs does not require washing of biomass, sugar

concentration, solvent removal or detoxification to reach high-efficiency in biomass conversion and ethanol production, indicating that solvents as PILs could be used in the biorefinery in the future.

6.1.2.3. Mass balances for ethanol production using PILs in pretreatment

The mass balances for the second-generation ethanol production process from sugarcane bagasse pretreated with the PILs [Etid][Ac], [Etid][Lac] and [2He][Lac] can be seen in Figura 6.1.6. The volume of ethanol obtained was of 248.5, 246.5 and 208.9 L/ton bagasse for [Etid][Ac], [Etid][Lac] and [2He][Lac], respectively. It is important to notice that the pretreatment with [2He][Lac] occurred at higher temperature (160°C), but removed less lignin, which ultimately resulted in less ethanol.

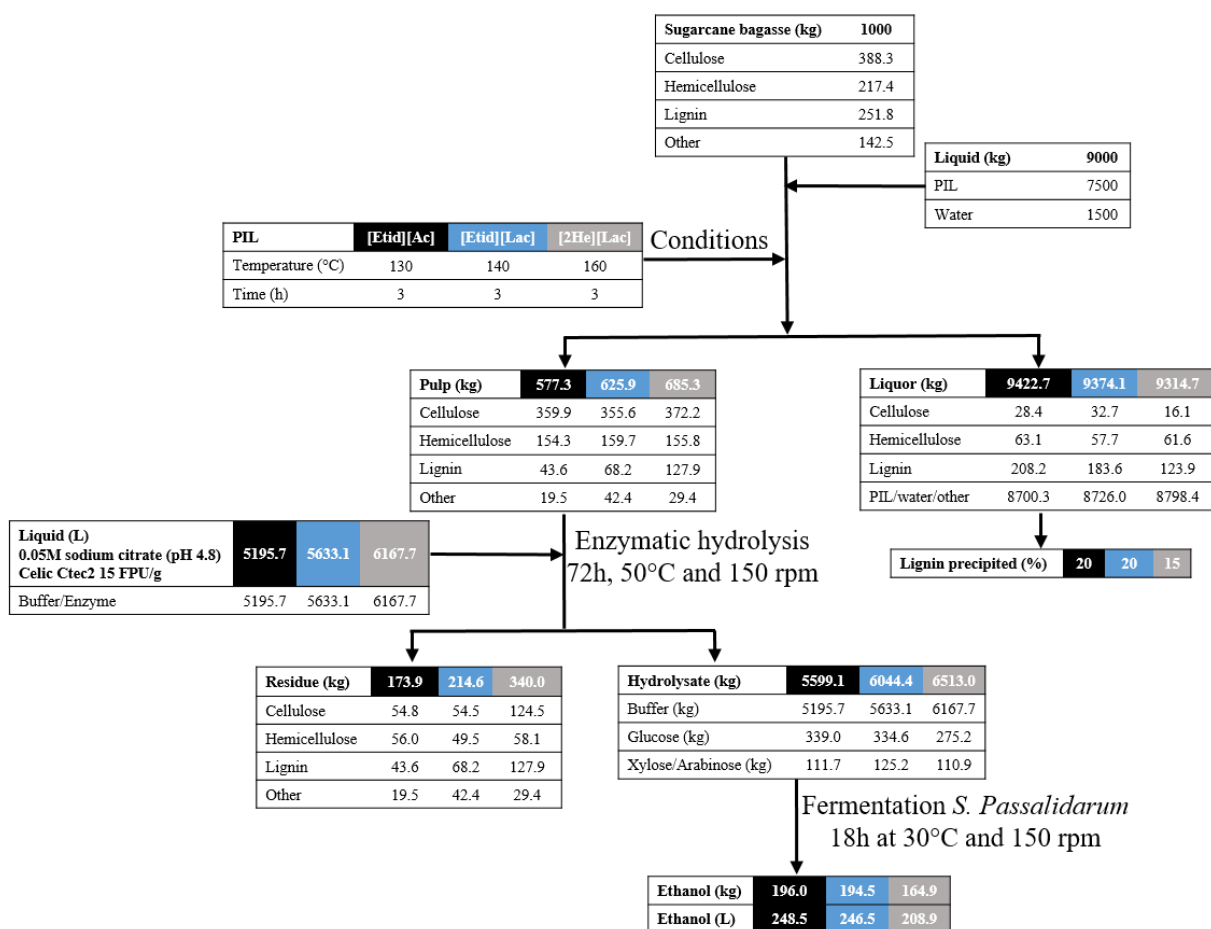
The ethanol yields achieved in this work were high compared to the literature^{103,135,236,238}, but it should be mentioned that not only the pretreatment, but also solids and enzyme loadings in the enzymatic hydrolysis, as well as biomass concentration in fermentation can influence the overall ethanol productivity. Rocha et al. (2017)¹⁶ pretreated sugarcane bagasse with [2He][Ac] at 150°C for 2h and, considering the amount of glucose and xylose obtained after enzymatic hydrolysis, estimated that 218 L ethanol/ton bagasse could be obtained if fermentation yields of 95 % and 60% of the theoretical from glucose and xylose were obtained, respectively.

Nakasu (2021)²³⁶ obtained 375 L ethanol/ ton bagasse in the fermentation by *S. passalidarum* at 110 rpm, 72h and 28 °C. Bagasse was pretreated at 150°C for 2h, using [2He][Ac] produced using an acid: base ration of 0.5:1. Ninomiya et al. (2018)¹⁰³ used another PIL, choline acetate ([Ch][OAc]), for bagasse pretreatment (110°C, 21 h) and obtained 266 L ethanol/ton bagasse. Fermentation was undertaken at 30°C, 120 rpm and 24h using *S. cerevisiae* YPH499XU and 56 g/L and 14 g/L (glucose and xylose concentrations, respectively).

The ethanol production obtained in this work was high even when compared to other conventional pretreatments using sugarcane bagasse as biomass. Nakanishi et al. (2017)¹³⁵ obtained an ethanol production of 224.8 L/ton using pretreatment with sodium hydroxide (1.5 % w/v) and anthraquinone (0.15 % w/w) at 130°C for 30min. After enzymatic hydrolysis, fermentation was executed for 24h in a bioreactor using *S. passalidarum*. When authors used the hydrothermal pretreatment (190°C and 10 min) and replaced the yeast by *S. stipitis*, they obtained 222.7 L ethanol/ton bagasse after 40h of fermentation. Rabelo et al. (2014)²³⁸ used

alkaline hydrogen peroxide (7.4 % v/v) pretreatment (25°C, 1h) and obtained 237.5 L ethanol/ton. In general, the values indicate the high efficiency of the presented process when compared to the values published in the literature.

Figura 6.1.6 - Mass balance in the optimized conditions of pretreatment using [Etid][Ac] (black color), [Etid][Lac] (blue color), and using [2He][Lac] (grey color).



A technical-economic analysis is necessary in order to estimate the parameters that make the biorefinery economically viable, such as the minimum ethanol selling price (MESP). Another aspect that must be considered is the amount of water used to wash the biomass after pretreatment, as it influences the recovery cost of the PIL, which needs to be recycled to make the process viable.⁸³ Studies in the literature have shown that the PIL can be recycled and reused in the pretreatment at least four times (> 98 %) without showing a decrease in lignin removal^{16,21,25,99}. Barcelos et al. (2021)²³⁷ using [Ch][Lys] PIL in pretreatment to produce ethanol reached an optimal design resulting in a predictable ethanol selling price of \$3/gge and

carbon footprint of 16.4 gCO_{2e}/MJ, an 82% reduction compared to gasoline. Also, the lignin fraction obtained by precipitation can be the raw material to value-added products^{7,239}.

6.1.3. Conclusion

Pretreatment with the PILs considered in this work lead to biomass with a high percentage of cellulose/hemicellulose and a low percentage of lignin, thereby facilitating its enzymatic hydrolysis. This was confirmed by the high production of ethanol by fermentation. The lignin extracted has characteristics that allow its use as a raw material for added-value products. Mild conditions of removal using PILs have been shown to be sufficient to obtain a desirable structure, and extreme conditions only influenced the amount of removal. The obtained results proved that PILs used for bagasse pretreatment were more efficient in extreme conditions of the reaction.

6.2. Considerações

Todos os LIPs alcançaram ótimos desempenhos nos pré-tratamentos com a variação das condições estudadas, sendo que condições extremas de tempo e temperatura demonstraram os melhores desempenhos. Em contrapartida a estrutura da lignina não apresentou influência para as condições estudadas e menores tempos e temperaturas já são suficientes para se obter determinada estrutura.

As etapas de hidrólise enzimática e fermentação apresentaram alta eficiência considerando o tempo de finalização, já que a primeira termina em 24h e a outra em 18h, sendo que na fermentação há o consumo total de glicose e xilose presentes. O valor de litros de etanol/ton bagaço foi bem superior aos valores encontrados em literatura e abre caminhos para a continuação de estudos com esse LIPs no pré-tratamento do bagaço.

CAPITULO 7

7. Conclusões

As características obtidas nas análises de pH, acidez, basicidade e net-basicity indicaram alguns bons LIPs para solubilização de lignina e alta obtenção de açúcares fermentescíveis na etapa de hidrólise enzimática. Os dados de degradação LIP indicam alta propensão a reuso e reciclo do solvente dentro do processo, aumentando a oportunidade de se obter um processo economicamente viável dentro da biorrefinaria.

Todos os 20 LIPs estudados na primeira etapa de pré-tratamento apresentaram solubilização de lignina e posterior performance na hidrólise enzimática, indicando que os LIPs estudados nesse trabalho possuem alguma influencia na estrutura do bagaço-de-cana de açúcar sob as condições utilizadas. Os LIPs com cátions funcionalizados ([Etid] e [2He]) quando combinados com ânions [Ac] e [Lac] apresentaram as melhores performances na hidrólise enzimática, sendo os LIPs escolhidos para uma otimização de pré-tratamento para aumentar sua performance. Esses LIPs apresentaram condições alcalinas de pré-tratamento, indicando que solventes com essa característica são promissores.

As ligninas obtidas de LIPs com grupo funcional no cátion revelaram a presença de nitrogênio em suas estruturas, indicando reações de aminação e posteriormente abrindo caminho para aplicações essenciais para produtos farmacêuticos, materiais poliméricos, agroquímicos e síntese orgânica. Estruturas preservadas foram observadas para ligninas extraídas por [2He][Ac] e [2He][Lac], indicando baixas reações de condensação, ao contrário de ligninas extraídas com [Etid][Ac] e [Etid][Lac], que exibiram muitas reações de condensação confirmadas pela alta massa molar obtida.

O aumento da cadeia dos cátions nos LIPs usados na extração das ligninas causou aumento de despolimerização, que também está ligada diretamente à ionicidade do solvente. Cátions de menor cadeia ([Eti]) tendem a manter a estrutura mais preservada, com ligações β -O-4', enquanto o cátion [Hex] apresentou ligninas com maiores pesos moleculares devido à alta taxa de reações de condensação.

No geral, o pré-tratamento com diferentes combinações de cátions/ânions proporciona a oportunidade de obtenção de ligninas sob medida de acordo com as características dos solventes. Ligninas com maior massa molar (*e.g.*, usando cátions [Hex])

podem ser usadas em aplicações de polímeros, resinas e aditivos. Por outro lado, ligninas com estrutura mais preservadas (*e.g.*, usando cátions [Eti] e [2He]) podem ser utilizadas em reações de *upgrading* para obtenção de produtos químicos.

Os resultados obtidos na otimização do pré-tratamento mostraram que todos os LIPs foram mais eficientes nos maiores valores de tempo e temperatura usados, sendo o [Etid][Ac] o LIP de melhor desempenho. O pré-tratamento com este solvente produziu a biomassa ao maior percentual de celulose/hemicelulose e alta solubilização de lignina. Isso foi comprovado pela elevada produção de etanol por tonelada de bagaço com a fermentação dos hidrolisados.

As ligninas obtidas desses pré-tratamentos podem ser extraídas em condições brandas de reação, sendo suficiente para obter a estrutura desejável, e condições extremas apenas influenciaram a quantidade de remoção. As ligninas possuem características que permitem sua utilização como matéria-prima para diversos produtos de alto valor agregado, e que devem ser explorados para novas áreas.

7.1. Sugestões trabalhos futuros

Como sugestões para próximos trabalhos:

- Avaliação do processo de reciclo e reuso do LIP no pré-tratamento do bagaço e aproveitamento de lignina;
- Avaliação da aplicação da lignina obtida dos LIPs para produtos de valores agregados;
- Utilização de modelos de lignina visando a construção de melhorias na biblioteca de identificação de compostos fenólicos;
- Emprego de um tipo de LIP no processo de pré-tratamento, hidrólise enzimática e fermentação visando melhorias na produção de etanol;
- Avaliação da integridade da membrana celular das leveduras durante o processo de fermentação com reciclo e batelada alimentada;

REFERÊNCIAS

1. Doherty, T. V, Mora-Pale, M., Foley, S. E., Linhardt, R. J. & Dordick, J. S. Ionic liquid solvent properties as predictors of lignocellulose pretreatment efficacy. *Green Chem.* **12**, 1967 (2010).
2. Brandt, A. *et al.* Ionic liquid pretreatment of lignocellulosic biomass with ionic liquid–water mixtures. *Green Chem.* **13**, 2489 (2011).
3. Brandt, A., Gräsvik, J., Hallett, J. P. & Welton, T. Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. *Green Chem.* **15**, 550 (2013).
4. Conab. *Boletim da Safra de Cana-de-açúcar 2020/21*. <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar> (2020).
5. Hofsetz, K. & Silva, M. A. Brazilian sugarcane bagasse: Energy and non-energy consumption. *Biomass and Bioenergy* **46**, 564–573 (2012).
6. 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. *Ind. Crops Prod.* **71**, 147–152 (2015).
7. Bajwa, D. S., Pourhashem, G., Ullah, A. H. & Bajwa, S. G. A concise review of current lignin production, applications, products and their environment impact. *Ind. Crops Prod.* (2019) doi:10.1016/j.indcrop.2019.111526.
8. Laurichesse, S. & Avérous, L. Chemical modification of lignins: Towards biobased polymers. *Prog. Polym. Sci.* **39**, 1266–1290 (2014).
9. Mosier, N. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* **96**, 673–686 (2005).
10. Harrison, M. D. *et al.* Effect of pretreatment on saccharification of sugarcane bagasse by complex and simple enzyme mixtures. *Bioresour. Technol.* **148**, 105–113 (2013).
11. Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M. & Negro, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresour. Technol.* **101**, 4851–4861 (2010).
12. Blanch, H. W., Simmons, B. A. & Klein-Marcuschamer, D. Biomass deconstruction to sugars. *Biotechnol. J.* **6**, 1086–1102 (2011).

13. Rabemanolontsoa, H. & Saka, S. Various pretreatments of lignocellulosics. *Bioresource Technology* vol. 199 83–91 (2016).
14. Swatloski, R. P., Spear, S. K., Holbrey, J. D. & Rogers, R. D. Dissolution of cellulose with ionic liquids. *J. Am. Chem. Soc.* (2002) doi:10.1021/ja025790m.
15. Espinoza-Acosta, J. L. *et al.* Ionic liquids and organic solvents for recovering lignin from lignocellulosic biomass. *BioResources* **9**, 3660–3687 (2014).
16. Rocha, E. G. A., Pin, T. C., Rabelo, S. C. & Costa, A. C. Evaluation of the use of protic ionic liquids on biomass fractionation. *Fuel* **206**, 145–154 (2017).
17. Pin, T. C., Nakasu, P. Y. S., Mattedi, S., Rabelo, S. C. & Costa, A. C. Screening of protic ionic liquids for sugarcane bagasse pretreatment. *Fuel* **235**, 1506–1514 (2019).
18. Uju *et al.* Peracetic acid-ionic liquid pretreatment to enhance enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* (2013) doi:10.1016/j.biortech.2013.03.147.
19. Greaves, T. L. & Drummond, C. J. Protic Ionic Liquids: Evolving Structure-Property Relationships and Expanding Applications. *Chemical Reviews* vol. 115 11379–11448 (2015).
20. Sáez, F. *et al.* Enzymatic hydrolysis from carbohydrates of barley straw pretreated by ionic liquids. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **88**, 937–941 (2013).
21. Brandt-Talbot, A. *et al.* An economically viable ionic liquid for the fractionation of lignocellulosic biomass. *Green Chem.* **19**, 3078–3102 (2017).
22. Baral, N. R. & Shah, A. Techno-economic analysis of cellulose dissolving ionic liquid pretreatment of lignocellulosic biomass for fermentable sugars production. *Biofuels, Bioprod. Biorefining* (2016) doi:10.1002/bbb.1622.
23. 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* **81**, 1–8 (2015).
24. Anugwom, I. *et al.* Selective extraction of hemicelluloses from spruce using switchable ionic liquids. *Carbohydr. Polym.* **87**, 2005–2011 (2012).
25. Nakasu, P. Y. S. *et al.* Interplay of Acid–Base Ratio and Recycling on the Pretreatment Performance of the Protic Ionic Liquid Monoethanolammonium Acetate. *ACS Sustain.*

- Chem. Eng.* **8**, 7952–7961 (2020).
26. Nakasu, P. Y. S. Evaluation of sugarcane bagasse pretreatment process with protic ionic liquids for cellulosic ethanol production. (University of Campinas, 2019).
 27. Ponnusamy, V. K. *et al.* A review on lignin structure, pretreatments, fermentation reactions and biorefinery potential. *Bioresour. Technol.* **271**, 462–472 (2019).
 28. Agrawal, A., Kaushik, N. & Biswas, S. Derivatives and Applications of Lignin—An Insight. *SciTech J.* (2014).
 29. Del Rio, J. C. *et al.* Differences in the chemical structure of the lignins from sugarcane bagasse and straw. *Biomass and Bioenergy* **81**, 322–338 (2015).
 30. Sun, R. C. Lignin Source and Structural Characterization. *ChemSusChem* (2020) doi:10.1002/cssc.202001324.
 31. Li, M., Pu, Y. & Ragauskas, A. J. Current Understanding of the Correlation of Lignin Structure with Biomass Recalcitrance. *Front. Chem.* (2016) doi:10.3389/fchem.2016.00045.
 32. Grand Market Analysis Report. *Lignin market size, Share & Trends Analysis Report By Product (Ligno-Sulphonates, Kraft, Organosolv), By Application (Macromolecule, Aromatic), By Region, And Segment Forecasts, 2020 - 2027.* Grand View Research (2020).
 33. Grand view, R. *Lignin Market - By product (ligno-sulphonates, Kraft lignin, Organosolv Lignin); By application (Macromolecules, Aromatics).* Grand View Research <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/lignin-market> (2017) doi:978-1-68038-422-2.
 34. Ragauskas, A. J. *et al.* Lignin valorization: Improving lignin processing in the biorefinery. *Science* vol. 344 (2014).
 35. Cherubini, F. The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Convers. Manag.* **51**, 1412–1421 (2010).
 36. Alvim, J. C. *et al.* Biorrefineries: Concepts, classification, raw materials and products. *J. Bioenergy Food Sci.* **01**, 61–77 (2014).
 37. Chundawat, S. P. S., Beckham, G. T., Himmel, M. E. & Dale, B. E. Deconstruction of Lignocellulosic Biomass to Fuels and Chemicals. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng* **2**, 121–

- 45 (2011).
38. Sauer, M., Steiger, M., Mattanovich, D. & Marx, H. Biorefineries-Concepts for Sustainability. in *Bioprocessing of Renewable Resources to Commodity Bioproducts* 1–27 (2014). doi:10.1002/9781118845394.ch1.
 39. Jong, E. De & Jungmeier, G. *Biorefinery Concepts in Comparison to Petrochemical Refineries. Industrial Biorefineries and White Biotechnology* (2015). doi:10.1016/B978-0-444-63453-5.00001-X.
 40. Haghdan, S., Renneckar, S. & Smith, G. D. Sources of Lignin. in *Lignin in Polymer Composites* 1–11 (Elsevier Inc., 2016). doi:10.1016/B978-0-323-35565-0.00001-1.
 41. 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. *Ind. Crops Prod.* **64**, 52–58 (2015).
 42. Santos, J. R. A. dos & Gouveia, E. R. Produção de bioetanol de bagaço de cana-de-açúcar. *Rev. Bras. Prod. Agroindustriais* **11**, 27–33 (2009).
 43. Silva, R., Haraguchi, S. K., Muniz, E. C. & Rubira, A. F. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. *Quim. Nov.* **32**, 661–671 (2009).
 44. Santos, F. A. *et al.* Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. *Quim. Nova* **35**, 1004–1010 (2012).
 45. de Souza Dias, M. O. *et al.* Sugarcane processing for ethanol and sugar in Brazil. *Environ. Dev.* **15**, 35–51 (2015).
 46. Pandey, A., Soccol, C. R., Nigam, P. & Soccol, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. *Bioresour. Technol.* **74**, 69–80 (2000).
 47. Magalhães, A. I. *et al.* Lignocellulosic biomass from agro-industrial residues in South America: current developments and perspectives. *Biofuels, Bioprod. Biorefining* **13**, 1505–1519 (2019).
 48. Souza, O. & Santos, I. E. Dos. Aproveitamento do bagaço de cana-de-açúcar pelos ruminantes. *Embrapa Tabuleiros Costeiros*. **7**, 3 (2002).
 49. 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. (Universidade Estadual de Campinas, 2012).
50. Simplicio, E. da S. Isolamento de nanofibras de celulose de bagaço de cana-de-açúcar e engaços de dendê obtidas por hidrólise enzimática. (Universidade de Brasília, 2017).
 51. Dhepe, P. L. & Sahu, R. A solid-acid-based process for the conversion of hemicellulose. *Green Chem.* **12**, 2153 (2010).
 52. Ayala, O. L. B. Avaliação de pré-tratamentos para a hidrólise enzimática de palha de cana-de-açúcar considerando a produção de etanol. (Universidade Estadual de Campinas, 2012). doi:10.1007/s13398-014-0173-7.2.
 53. Moraes, 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. *Rev. Árvore* **29**, 461–470 (2005).
 54. Gírio, F. M. *et al.* Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresour. Technol.* **101**, 4775–4800 (2010).
 55. Figueiredo, P., Lintinen, K., Hirvonen, J. T., Kostianen, M. A. & Santos, H. A. Properties and chemical modifications of lignin: Towards lignin-based nanomaterials for biomedical applications. *Progress in Materials Science* (2018) doi:10.1016/j.pmatsci.2017.12.001.
 56. Mohan, D., Pittman, C. U. & Steele, P. H. Pyrolysis of Wood/Biomass for Bio-oil: A Critical Review. *Energy & Fuels* **20**, 848–889 (2006).
 57. Sánchez, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances* vol. 27 185–194 (2009).
 58. Schutyser, W. *et al.* Chemicals from lignin: An interplay of lignocellulose fractionation, depolymerisation, and upgrading. *Chemical Society Reviews* (2018) doi:10.1039/c7cs00566k.
 59. Lan, W. *et al.* Maize Tricin-Oligolignol Metabolites and their Implications for Monocot Lignification. *Plant Physiol.* (2016) doi:10.1104/pp.16.02012.
 60. Del Río, J. C. *et al.* Structural Characterization of the Lignin in the Cortex and Pith of Elephant Grass (*Pennisetum purpureum*) Stems. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 3619–3634 (2012).
 61. Rinaldi, R. *et al.* Paving the Way for Lignin Valorisation: Recent Advances in

- Bioengineering, Biorefining and Catalysis. *Angew. Chemie Int. Ed.* **55**, 8164–8215 (2016).
62. Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J. & Boerjan, W. Lignin Biosynthesis and Structure. *PLANT Physiol.* (2010) doi:10.1104/pp.110.155119.
 63. 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 and Bioenergy* **4**, 9–13 (1993).
 64. Calvo-Flores, F. G. Lignin: A Renewable Raw Material. in *Encyclopedia of Renewable and Sustainable Materials* 102–118 (Elsevier, 2020). doi:10.1016/B978-0-12-803581-8.11517-6.
 65. Kim, K. H. & Kim, C. S. Recent Efforts to Prevent Undesirable Reactions From Fractionation to Depolymerization of Lignin: Toward Maximizing the Value From Lignin. *Front. Energy Res.* **6**, (2018).
 66. Arapova, O. V., Chistyakov, A. V., Tsodikov, M. V. & Moiseev, I. I. Lignin as a Renewable Resource of Hydrocarbon Products and Energy Carriers (A Review). *Pet. Chem.* **60**, 227–243 (2020).
 67. Janusz, G. *et al.* Lignin degradation: microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* **41**, 941–962 (2017).
 68. Gellerstedt, G. Softwood kraft lignin: Raw material for the future. *Industrial Crops and Products* (2015) doi:10.1016/j.indcrop.2015.09.040.
 69. Chen, J., Eraghi Kazzaz, A., AlipoorMazandarani, N., Hosseinpour Feizi, Z. & Fatehi, P. Production of Flocculants, Adsorbents, and Dispersants from Lignin. *Molecules* **23**, 868 (2018).
 70. Bertolo, M. R. V. *et al.* Lignins from sugarcane bagasse: Renewable source of nanoparticles as Pickering emulsions stabilizers for bioactive compounds encapsulation. *Ind. Crops Prod.* (2019) doi:10.1016/j.indcrop.2019.111591.
 71. Rojas, O. J. *et al.* Lignins as Emulsion Stabilizers. in *Materials, Chemicals, and Energy from Forest Biomass* vol. 954 12–182 (American Chemical Society, 2007).
 72. Grossman, A. & Vermerris, W. Lignin-based polymers and nanomaterials. *Curr. Opin. Biotechnol.* **56**, 112–120 (2019).

73. Kun, D. & Pukánszky, B. Polymer/lignin blends: Interactions, properties, applications. *Eur. Polym. J.* **93**, 618–641 (2017).
74. Marulasiddeshwara, M. B. *et al.* Facile-one pot-green synthesis, antibacterial, antifungal, antioxidant and antiplatelet activities of lignin capped silver nanoparticles: A promising therapeutic agent. *Mater. Sci. Eng. C* (2017) doi:10.1016/j.msec.2017.07.054.
75. Qian, Y., Qiu, X. & Zhu, S. Lignin: A nature-inspired sun blocker for broadspectrum Sunscreens. *Green Chem.* (2015) doi:10.1039/c4gc01333f.
76. Martínez, Á. T. *et al.* Biodegradation of lignocellulosics: Microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. in *International Microbiology* (2005).
77. Savitskaya, T., Reznikov, I. & Grinshpan, D. Rheological behavior of lignin based dispersions intended for composite fuel production. *Appl. Rheol.* (2016) doi:10.3933/APPLRHEOL-26-63476.
78. Olsson, A.-M. & Salmén, L. Viscoelasticity of In Situ Lignin as Affected by Structure. in (2009). doi:10.1021/bk-1992-0489.ch009.
79. *Chemical Modification, Properties, and Usage of Lignin.* (2002). doi:10.1007/978-1-4615-0643-0.
80. Liu, W. *et al.* Lignin-derived carbon nanosheets for high-capacitance supercapacitors. *RSC Adv.* (2017) doi:10.1039/c7ra08531a.
81. Li, W. *et al.* Linking lignin source with structural and electrochemical properties of lignin-derived carbon materials. *RSC Adv.* (2018) doi:10.1039/c8ra08539k.
82. Singh, S., Verma, J. P., de Araujo Pereira, A. P. & Sivakumar, N. Production of biofuels and chemicals from lignin. *J. Clean. Prod.* (2018) doi:10.1016/j.jclepro.2018.08.160.
83. He, J. *et al.* Sustainable access to renewable N-containing chemicals from reductive amination of biomass-derived platform compounds. *Green Chem.* **22**, 6714–6747 (2020).
84. Wang, F., Li, H., Bunrit, A. & Li, N. Heteroatom-participated lignin cleavage to functionalized aromatics. *Chemical Society Reviews* (2020) doi:10.1039/d0cs00078g.
85. Pin, T. C. *et al.* Structural characterization of sugarcane lignins extracted from different protic ionic liquid pretreatments. *Renew. Energy* **161**, 579–592 (2020).
86. Ludmila, H., Michal, J., Andrea, Š. & Aleš, H. Lignin, potential products and their

- market value. *Wood Res.* (2015).
87. Demuner, I. F., Colodette, J. L., Demuner, A. J. & Jardim, C. M. Biorefinery review: Wide-reaching products through kraft lignin. *BioResources* (2019) doi:10.15376/biores.14.3.Demuner.
 88. Hodásová, L., Jablonský, J., Skulcová, A. & Ház, A. Lignin , Potential Products and Their Market Value. *Wood Res.* (2015).
 89. Kirchner, B. Ionic Liquids. in vol. 246 (2005).
 90. Dupont, J. On the solid, liquid and solution structural organization of imidazolium ionic liquids. *J. Braz. Chem. Soc.* **15**, 341–350 (2004).
 91. Greaves, T. L. & Drummond, C. J. Protic ionic liquids: Properties and applications. *Chemical Reviews* vol. 108 206–237 (2008).
 92. Tadesse, H. & Luque, R. Advances on biomass pretreatment using ionic liquids: An overview. *Energy Environ. Sci.* **4**, 3913 (2011).
 93. Crosthwaite, J. M., Muldoon, M. J., Dixon, J. K., Anderson, J. L. & Brennecke, J. F. Phase transition and decomposition temperatures, heat capacities and viscosities of pyridinium ionic liquids. *J. Chem. Thermodyn.* **37**, 559–568 (2005).
 94. Bicak, N. A new ionic liquid: 2-hydroxy ethylammonium formate. *J. Mol. Liq.* **116**, 15–18 (2005).
 95. Greaves, T. L., Weerawardena, A., Fong, C., Krodziewska, I. & Drummond, C. J. Protic ionic liquids: Solvents with tunable phase behavior and physicochemical properties. *J. Phys. Chem. B* **110**, 22479–22487 (2006).
 96. Verdía, P., Brandt, A., Hallett, J. P., Ray, M. J. & Welton, T. Fractionation of lignocellulosic biomass with the ionic liquid 1-butylimidazolium hydrogen sulfate. *Green Chem.* **16**, 1617 (2014).
 97. George, A. *et al.* Design of low-cost ionic liquids for lignocellulosic biomass pretreatment. *Green Chem.* **17**, 1728–1734 (2015).
 98. Ghandi, K. A Review of Ionic Liquids, Their Limits and Applications. *Green Sustain. Chem.* **04**, 44–53 (2014).
 99. Abu-Eishah, S. I. Ionic Liquids Recycling for Reuse. in *Ionic Liquids - Classes and Properties* (InTech, 2011). doi:10.5772/23267.

100. Weerachanchai, P. & Lee, J. M. Recyclability of an ionic liquid for biomass pretreatment. *Bioresour. Technol.* **169**, 336–343 (2014).
101. Chen, M., Zhao, J. & Xia, L. Comparison of four different chemical pretreatments of corn stover for enhancing enzymatic digestibility. *Biomass and Bioenergy* **33**, 1381–1385 (2009).
102. Reis, C. L. B. *et al.* Pretreatment of cashew apple bagasse using protic ionic liquids: Enhanced enzymatic hydrolysis. *Bioresour. Technol.* **224**, 694–701 (2017).
103. Ninomiya, K. *et al.* Pretreatment of bagasse with a minimum amount of cholinium ionic liquid for subsequent saccharification at high loading and co-fermentation for ethanol production. *Chem. Eng. J.* (2018) doi:10.1016/j.cej.2017.10.113.
104. Mäki-Arvela, P., Anugwom, I., Virtanen, P., Sjöholm, R. & Mikkola, J. P. Dissolution of lignocellulosic materials and its constituents using ionic liquids—A review. *Ind. Crops Prod.* **32**, 175–201 (2010).
105. Meenatchi, B., Renuga, V. & Manikandan, A. Cellulose dissolution and regeneration using various imidazolium based protic ionic liquids. *J. Mol. Liq.* **238**, 582–588 (2017).
106. Angell, C. A., Byrne, N. & Belieres, J. P. Parallel developments in aprotic and protic ionic liquids: Physical chemistry and applications. *Acc. Chem. Res.* (2007) doi:10.1021/ar7001842.
107. D’Andola, G. ., Szarvas, L. ., Massonne, K. . & Stegmann, V. Ionic liquids for solubilizing polymers. (2010).
108. Olivier-Bourbigou, H., Magna, L. & Morvan, D. *Ionic liquids and catalysis: Recent progress from knowledge to applications. Applied Catalysis A: General* vol. 373 1–56 (2010).
109. Greaves, T. L., Weerawardena, A., Krodziewska, I. & Drummond, C. J. Protic ionic liquids: Physicochemical properties and behavior as amphiphile self-assembly solvents. *J. Phys. Chem. B* **112**, 896–905 (2008).
110. Consorti, C. S., De Souza, R. F., Dupont, J. & Suarez, P. A. Z. Líquidos iônicos contendo o cátion dialquilimidazólio: Estrutura, propriedades físico-químicas e comportamento em solução. *Quim. Nova* **24**, 830–837 (2001).
111. Pu, Y., Jiang, N. & Ragauskas, A. J. Ionic liquid as a green solvent for lignin. *J. Wood*

- Chem. Technol.* (2007) doi:10.1080/02773810701282330.
112. Yan, B. *et al.* Understanding lignin treatment in dialkylimidazolium-based ionic liquid-water mixtures. *Bioresour. Technol.* **196**, 509–517 (2015).
 113. Klein-Marcuschamer, D., Simmons, B. A. & Blanch, H. W. Techno-economic analysis of a lignocellulosic ethanol biorefinery with ionic liquid pre-treatment. *Biofuels, Bioprod. Biorefining* **5**, 562–569 (2011).
 114. Tan, S. S. Y. *et al.* Extraction of lignin from lignocellulose at atmospheric pressure using alkylbenzenesulfonate ionic liquid. *Green Chem.* **11**, 339 (2009).
 115. Brandt, A., Chen, L., Van Dongen, B. E. B. E. B. E., Welton, T. & Hallett, J. P. Structural changes in lignins isolated using an acidic ionic liquid water mixture. *Green Chem.* **17**, 5019–5034 (2015).
 116. Kim, H., Ahn, Y. & Kwak, S. Y. Comparing the influence of acetate and chloride anions on the structure of ionic liquid pretreated lignocellulosic biomass. *Biomass and Bioenergy* **93**, 243–253 (2016).
 117. Rashid, T., Kait, C. F., Regupathi, I. & Murugesan, T. Dissolution of kraft lignin using Protic Ionic Liquids and characterization. *Ind. Crops Prod.* **84**, 284–293 (2016).
 118. Zheng, Y., Pan, Z. & Zhang, R. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. *Int. J. Agric. Biol. Eng.* (2009) doi:10.3965/j.issn.1934-6344.2009.03.051-068.
 119. da Silva, A. S. Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com líquidos iônicos: Efeito na desestruturação da parede celular e na eficiência da hidrólise enzimática. (Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2013).
 120. Sun, Y. & Cheng, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production : a review q. *Bioresour. Technol.* **83**, 1–11 (2002).
 121. Quintero, J. A., Rincón, L. E. & Cardona, C. A. Production of bioethanol from agroindustrial residues as feedstocks. in *Biofuels* 251–285 (2011). doi:10.1016/B978-0-12-385099-7.00011-5.
 122. Banerjee, G., Scott-Craig, J. S. & Walton, J. D. Improving Enzymes for Biomass Conversion: A Basic Research Perspective. *BioEnergy Res.* **3**, 82–92 (2010).
 123. Gourlay, K. *et al.* Swollenin aids in the amorphogenesis step during the enzymatic

- hydrolysis of pretreated biomass. *Bioresour. Technol.* **142**, 498–503 (2013).
124. Olsson, L., Jørgensen, H., Krogh, K. & Roca, C. Bioethanol Production from Lignocellulosic Material. in *Polysaccharides* 957–993 (CRC Press, 2004). doi:10.1201/9781420030822.ch42.
 125. Mesa, L. *et al.* Techno-economic evaluation of strategies based on two steps organosolv pretreatment and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse for ethanol production. *Renew. Energy* **86**, 270–279 (2016).
 126. Linde, M., Galbe, M. & Zacchi, G. Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated barley straw at low enzyme loadings and low yeast concentration. *Enzyme Microb. Technol.* **40**, 1100–1107 (2007).
 127. Kurabi, A. *et al.* Enzymatic hydrolysis of steam-exploded and ethanol organosolv-pretreated Douglas-Firby novel and commercial fungal cellulases. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **121–124**, 219–230 (2005).
 128. 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. *Bioresour. Technol.* **200**, 287–296 (2016).
 129. Martín, C., De Moraes Rocha, G. J., Dos Santos, J. R. A., De Albuquerque Wanderley, M. C. & Gouveia, E. R. Enzyme loading dependence of cellulose hydrolysis of sugarcane bagasse. *Quim. Nova* **35**, 1927–1930 (2012).
 130. BUSSAMRA, B. C. Melhoramento de coquetéis enzimáticos para a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar. (Universidade Estadual de Campinas, 2014).
 131. Bussamra, B. C. *et al.* Enzymatic Hydrolysis of Sugarcane Bagasse in Aqueous Two-Phase Systems (ATPS): Exploration and Conceptual Process Design. *Front. Chem.* **8**, 587 (2020).
 132. Agrawal, R. *et al.* Current Understanding of the Inhibition Factors and their Mechanism of Action for the Lignocellulosic Biomass Hydrolysis. *Bioresour. Technol.* 125042 (2021) doi:10.1016/j.biortech.2021.125042.
 133. Li, H. *et al.* Evaluation of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains as the chassis cell for second-generation bioethanol production. *Microb. Biotechnol.* **8**, 266–274 (2015).
 134. Olsson, L. & Hahn-Hägerdal, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol

- production. *Enzyme Microb. Technol.* **18**, 312–331 (1996).
135. Nakanishi, S. C. *et al.* Fermentation strategy for second generation ethanol production from sugarcane bagasse hydrolyzate by *Spathaspora passalidarum* and *Scheffersomyces stipitis*. *Biotechnol. Bioeng.* **114**, 2211–2221 (2017).
 136. Hou, X. Anaerobic xylose fermentation by *Spathaspora passalidarum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2012) doi:10.1007/s00253-011-3694-4.
 137. Selim, K. A., Easa, S. M. & El-Diwany, A. I. The xylose metabolizing yeast *Spathaspora passalidarum* is a promising genetic treasure for improving bioethanol production. *Fermentation* (2020) doi:10.3390/FERMENTATION6010033.
 138. Bonan, C. I. D. G. *et al.* Redox potential as a key parameter for monitoring and optimization of xylose fermentation with yeast *Spathaspora passalidarum* under limited-oxygen conditions. *Bioprocess Biosyst. Eng.* (2020) doi:10.1007/s00449-020-02344-2.
 139. Hahn-Hägerdal, B., Karhumaa, K., Fonseca, C., Spencer-Martins, I. & Gorwa-Grauslund, M. F. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**, 937–953 (2007).
 140. Galbe, M. & Zacchi, G. Production of ethanol from lignocellulosic materials. in *Sugarcane bioethanol — R&D for Productivity and Sustainability* 697–716 (Editora Edgard Blücher, 2014). doi:10.5151/BlucherOA-Sugarcane-SUGARCANE BIOETHANOL_59.
 141. Wang, L.-Q., Cai, L.-Y. & Ma, Y.-L. Study on inhibitors from acid pretreatment of corn stalk on ethanol fermentation by alcohol yeast. *RSC Adv.* **10**, 38409–38415 (2020).
 142. Chandel, A. K., Kapoor, R. K., Singh, A. & Kuhad, R. C. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. *Bioresour. Technol.* **98**, 1947–1950 (2007).
 143. Soares, L. B. *et al.* Investigation of hemicellulosic hydrolysate inhibitor resistance and fermentation strategies to overcome inhibition in non-saccharomyces species. *Biomass and Bioenergy* (2020) doi:10.1016/j.biombioe.2020.105549.
 144. Taherzadeh, M. J. & Karimi, K. Fermentation Inhibitors in Ethanol Processes and Different Strategies to Reduce Their Effects. in *Biofuels* 287–311 (Elsevier, 2011). doi:10.1016/B978-0-12-385099-7.00012-7.

145. Sluiter, J. B. *et al.* Evaluation of Brazilian Sugarcane Bagasse Characterization: An Interlaboratory Comparison Study. *J. AOAC Int.* **99**, 579–585 (2016).
146. Nakasu, P. Y. S., Pin, T. C., Hallett, J. P., Rabelo, S. C. & Costa, A. C. In-depth process parameter investigation into a protic ionic liquid pretreatment for 2G ethanol production. *Renew. Energy* **172**, 816–828 (2021).
147. Belieres, J.-P. & Angell, C. A. Protic Ionic Liquids: Preparation, Characterization, and Proton Free Energy Level Representation ? *J. Phys. Chem. B* **111**, 4926–4937 (2007).
148. Pin, T. C., Nakasu, P. S. Y., Rabelo, S. C. & Costa, A. C. Structural features of protic ionic liquids and their impact on pretreatment performance for 2G ethanol production. *Energy* **235**, 121279 (2021).
149. Cao, Y. & Mu, T. Comprehensive Investigation on the Thermal Stability of 66 Ionic Liquids by Thermogravimetric Analysis. *Ind. Eng. Chem. Res.* **53**, 8651–8664 (2014).
150. Singh, S. *et al.* Comparison of Different Biomass Pretreatment Techniques and Their Impact on Chemistry and Structure. *Front. Energy Res.* **2**, (2015).
151. Parviainen, A. *et al.* Predicting cellulose solvating capabilities of acid-base conjugate ionic liquids. *ChemSusChem* **6**, 2161–2169 (2013).
152. Sun, J. *et al.* One-pot integrated biofuel production using low-cost biocompatible protic ionic liquids. *Green Chem.* **19**, 3152–3163 (2017).
153. Abraham, M. H. & Zhao, Y. H. Determination of solvation descriptors for ionic species: Hydrogen bond acidity and basicity. *J. Org. Chem.* (2004) doi:10.1021/jo049766y.
154. Menezes, F. F. *et al.* Alkaline Pretreatment Severity Leads to Different Lignin Applications in Sugar Cane Biorefineries. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **5**, 5702–5712 (2017).
155. George, A. *et al.* The effect of ionic liquid cation and anion combinations on the macromolecular structure of lignins. *Green Chem.* **13**, 3375 (2011).
156. Jiang, H. J. *et al.* Liquid nanostructure of choline lysinate with water and a model lignin residue. *Green Chem.* **23**, 856–866 (2021).
157. Raj, T. *et al.* Ionic liquid pretreatment of biomass for sugars production: Driving factors with a plausible mechanism for higher enzymatic digestibility. *Carbohydr. Polym.* **149**, 369–381 (2016).

158. Qin, L. *et al.* Ethylenediamine pretreatment changes cellulose allomorph and lignin structure of lignocellulose at ambient pressure. *Biotechnol. Biofuels* **8**, (2015).
159. Hart, W. E. S., Harper, J. B. & Aldous, L. The effect of changing the components of an ionic liquid upon the solubility of lignin. *Green Chem.* **17**, 214–218 (2015).
160. Achinivu, E. C., Howard, R. M., Li, G., Gracz, H. & Henderson, W. a. Lignin extraction from biomass with protic ionic liquids. *Green Chem.* **16**, 1114–1119 (2014).
161. Pu, Y. *et al.* The effect of changing the components of an ionic liquid upon the solubility of lignin. *J. Wood Chem. Technol.* **17**, 214–218 (2007).
162. Carey, F. A. *Organic Chemistry*. (McGraw-Hill; 18500th edition, 1994).
163. Fu, D., Mazza, G. & Tamaki, Y. Lignin Extraction from Straw by Ionic Liquids and Enzymatic Hydrolysis of the Cellulosic Residues. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 2915–2922 (2010).
164. Hossain, M. M., Rawal, A. & Aldous, L. Aprotic vs Protic Ionic Liquids for Lignocellulosic Biomass Pretreatment: Anion Effects, Enzymatic Hydrolysis, Solid-State NMR, Distillation, and Recycle. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **7**, acssuschemeng.8b05987 (2019).
165. Williams, C. L., Li, C., Hu, H., Allen, J. C. & Thomas, B. J. Three Way Comparison of Hydrophilic Ionic Liquid, Hydrophobic Ionic Liquid, and Dilute Acid for the Pretreatment of Herbaceous and Woody Biomass. *Front. Energy Res.* **6**, (2018).
166. Fukaya, Y. & Ohno, H. Hydrophobic and polar ionic liquids. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **15**, 4066 (2013).
167. Pin, T. C. *et al.* Influence of chain length in protic ionic liquids on physicochemical and structural features of lignins from sugarcane bagasse. *Ind. Crops Prod.* **159**, 113080 (2021).
168. Nikafshar, S. *et al.* Catalyzed Synthesis and Characterization of a Novel Lignin-Based Curing Agent for the Curing of High-Performance Epoxy Resin. *Polymers (Basel)*. **9**, 266 (2017).
169. Achinivu, E. Protic Ionic Liquids for Lignin Extraction—A Lignin Characterization Study. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 428 (2018).
170. Wang, B. *et al.* Amination of biorefinery technical lignins using Mannich reaction

- synergy with subcritical ethanol depolymerization. *Int. J. Biol. Macromol.* **107**, 426–435 (2018).
171. An, Y.-X., Li, N., Wu, H., Lou, W.-Y. & Zong, M.-H. Changes in the Structure and the Thermal Properties of Kraft Lignin during Its Dissolution in Cholinium Ionic Liquids. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **3**, 2951–2958 (2015).
 172. Wen, J.-L., Yuan, T.-Q., Sun, S.-L., Xu, F. & Sun, R.-C. Understanding the chemical transformations of lignin during ionic liquid pretreatment. *Green Chem.* **16**, 181–190 (2014).
 173. Faix, O. Classification of Lignins from Different Botanical Origins by FT-IR Spectroscopy. *Holzforschung* **45**, 21–28 (1991).
 174. Sigma, M. IR Spectrum Table & Chart. <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/ir-spectrum-table.html>.
 175. Tolesa, L. D., Gupta, B. S. & Lee, M.-J. Degradation of lignin with aqueous ammonium-based ionic liquid solutions under milder conditions. *New J. Chem.* **43**, 3357–3365 (2019).
 176. Mansfield, S. D., Kim, H., Lu, F. & Ralph, J. Whole plant cell wall characterization using solution-state 2D NMR. *Nat. Protoc.* **7**, 1579–1589 (2012).
 177. Trajano, H. L. *et al.* The fate of lignin during hydrothermal pretreatment. *Biotechnol. Biofuels* **6**, 110 (2013).
 178. Kline, L. M., Hayes, D. G., Womac, A. R. & Labbé, N. Simplified determination of lignin content in hard and soft woods via UV-spectrophotometric analysis of biomass dissolved in ionic liquids. *BioResources* (2010) doi:10.15376/BIORES.5.3.1366-1383.
 179. You, T. & Xu, F. Applications of Molecular Spectroscopic Methods to the Elucidation of Lignin Structure. in *Applications of Molecular Spectroscopy to Current Research in the Chemical and Biological Sciences* 235–260 (InTech, 2016). doi:10.5772/64581.
 180. Baldwin, J. E. Advances in Physical Organic Chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 123–124 (1964).
 181. Carey, F. A. & Sundberg, R. J. *Advanced Organic Chemistry Part A: Structure and Mechanisms. Advanced Organic Chemistry* (2007). doi:10.1021/ed065pA139.2.
 182. del Río, J. C. *et al.* Highly Acylated (Acetylated and/or p -Coumaroylated) Native

- Lignins from Diverse Herbaceous Plants. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 9525–9534 (2008).
183. Varanasi, P. *et al.* Understanding changes in lignin of *Panicum virgatum* and *Eucalyptus globulus* as a function of ionic liquid pretreatment. *Bioresour. Technol.* **126**, 156–161 (2012).
 184. Tana, T. *et al.* Valorization of native sugarcane bagasse lignin to bio-aromatic esters/monomers via a one pot oxidation–hydrogenation process. *Green Chem.* **21**, 861–873 (2019).
 185. Zeng, J., Tong, Z., Wang, L., Zhu, J. Y. & Ingram, L. Isolation and structural characterization of sugarcane bagasse lignin after dilute phosphoric acid plus steam explosion pretreatment and its effect on cellulose hydrolysis. *Bioresour. Technol.* **154**, 274–281 (2014).
 186. Wang, C., Li, H., Li, M., Bian, J. & Sun, R. Revealing the structure and distribution changes of *Eucalyptus* lignin during the hydrothermal and alkaline pretreatments. *Sci. Rep.* **7**, 593 (2017).
 187. Ji, W. *et al.* Mechanism of lignin dissolution and regeneration in ionic liquid. *Energy and Fuels* (2012) doi:10.1021/ef301231a.
 188. Binder, J. B., Gray, M. J., White, J. F., Zhang, Z. C. & Holladay, J. E. Reactions of lignin model compounds in ionic liquids. *Biomass and Bioenergy* (2009) doi:10.1016/j.biombioe.2009.03.006.
 189. Moghaddam, L. *et al.* Characterisation of lignins isolated from sugarcane bagasse pretreated with acidified ethylene glycol and ionic liquids. *Biomass and Bioenergy* (2014) doi:10.1016/j.biombioe.2014.07.030.
 190. El Khaldi-Hansen, B., Schulze, M. & Kamm, B. Qualitative and Quantitative Analysis of Lignins from Different Sources and Isolation Methods for an Application as a Biobased Chemical Resource and Polymeric Material. in *Analytical Techniques and Methods for Biomass* 15–44 (Springer International Publishing, 2016). doi:10.1007/978-3-319-41414-0_2.
 191. Hong, S., Lian, H., Pan, M. & Chen, L. Structural Changes of Lignin after Ionic Liquid Pretreatment. *BioResources* **12**, (2017).
 192. Sawamura, K., Tobimatsu, Y., Kamitakahara, H. & Takano, T. Lignin Functionalization

- through Chemical Demethylation: Preparation and Tannin-Like Properties of Demethylated Guaiacyl-Type Synthetic Lignins. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **5**, 5424–5431 (2017).
193. Yoo, C. G., Pu, Y., Li, M. & Ragauskas, A. J. Elucidating Structural Characteristics of Biomass using Solution-State 2 D NMR with a Mixture of Deuterated Dimethylsulfoxide and Hexamethylphosphoramide. *ChemSusChem* **9**, 1090–1095 (2016).
 194. Saha, K. *et al.* Extraction of lignin, structural characterization and bioconversion of sugarcane bagasse after ionic liquid assisted pretreatment. *3 Biotech* (2018) doi:10.1007/s13205-018-1399-4.
 195. Diop, A., Jradi, K., Daneault, C. & Montplaisir, D. Kraft Lignin Depolymerization in an Ionic Liquid without a Catalyst. *BioResources* **10**, (2015).
 196. Li, J., Henriksson, G. & Gellerstedt, G. Lignin depolymerization/repolymerization and its critical role for delignification of aspen wood by steam explosion. *Bioresour. Technol.* **98**, 3061–3068 (2007).
 197. Tejado, A., Peña, C., Labidi, J., Echeverria, J. M. & Mondragon, I. Physico-chemical characterization of lignins from different sources for use in phenol–formaldehyde resin synthesis. *Bioresour. Technol.* **98**, 1655–1663 (2007).
 198. Aleš, H., Michal, J., Lenka, D., Alexandra, S. & Igor, Š. Thermal properties and size distribution of lignins precipitated with sulphuric acid. *Wood Res.* (2015).
 199. Meister, J. J. Modification of lignin. *J. Macromol. Sci. Part C Polym. Rev.* **42**, 235–289 (2002).
 200. Wen, J.-L., Sun, S.-L., Xue, B.-L. & Sun, R.-C. Quantitative Structures and Thermal Properties of Birch Lignins after Ionic Liquid Pretreatment. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 635–645 (2013).
 201. Brebu, M. & Vasile, C. Thermal degradation of lignin—a review. *Cellul. Chem. Technol.* (2010).
 202. Costa, C. A. E., Pinto, P. C. R. & Rodrigues, A. E. Radar Tool for Lignin Classification on the Perspective of Its Valorization. *Ind. Eng. Chem. Res.* **54**, 7580–7590 (2015).
 203. Kuitunen, S. *et al.* Lignin oxidation mechanisms under oxygen delignification conditions. Part 3. Reaction pathways and modeling. *Holzforschung* **65**, (2011).

204. Gierer, J. & Pettersson, I. Studies on the condensation of lignins in alkaline media. Part II. The formation of stilbene and arylcoumaran structures through neighbouring group participation reactions. *Can. J. Chem.* **55**, 593–599 (1977).
205. Landucci, L. L. Search for lignin condensation reactions with modern NMR techniques. in *ACS Symposium Series* (1989). doi:10.1021/bk-1989-0385.ch003.
206. Costa, C. A. E., Pinto, P. C. R. & Rodrigues, A. E. Evaluation of chemical processing impact on E. globulus wood lignin and comparison with bark lignin. *Ind. Crops Prod.* **61**, 479–491 (2014).
207. Fernández-Rodríguez, J., Erdocia, X., Sánchez, C., González Alriols, M. & Labidi, J. Lignin depolymerization for phenolic monomers production by sustainable processes. *J. Energy Chem.* **26**, 622–631 (2017).
208. Zhang, L. & Huang, J. Effects of nitrolignin on mechanical properties of polyurethane-nitrolignin films. *J. Appl. Polym. Sci.* **80**, 1213–1219 (2001).
209. Du, X., Li, J. & Lindström, M. E. Modification of industrial softwood kraft lignin using Mannich reaction with and without phenolation pretreatment. *Ind. Crops Prod.* **52**, 729–735 (2014).
210. Zhong, L. *et al.* Pretreatment of willow using the alkaline-catalyzed sulfolane/water solution for high-purity and antioxidative lignin production. *Int. J. Biol. Macromol.* (2020) doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.05.074.
211. Liu, C., Li, Y. & Hou, Y. Behavior of oxygen-containing groups in grass lignin during dissolution in basic ionic liquids. *Cellulose* (2019) doi:10.1007/s10570-018-2097-4.
212. Sun, Y. C., Xu, J. K., Xu, F. & Sun, R. C. Efficient separation and physico-chemical characterization of lignin from eucalyptus using ionic liquid-organic solvent and alkaline ethanol solvent. *Ind. Crops Prod.* (2013) doi:10.1016/j.indcrop.2013.03.025.
213. Sakakibara, A. & Yoshihiro, S. Chemistry of Lignin. in *Wood and cellulosic chemistry* (eds. Hon, D. N. S. & Shiraishi, N.) 109–174 (2001).
214. Sun, N. *et al.* Understanding pretreatment efficacy of four cholinium and imidazolium ionic liquids by chemistry and computation. *Green Chem.* **16**, 2546 (2014).
215. Reinoso, F. A. M. *et al.* Fate of p-hydroxycinnamates and structural characteristics of residual hemicelluloses and lignin during alkaline-sulfite chemithermomechanical

- pretreatment of sugarcane bagasse. *Biotechnol. Biofuels* (2018) doi:10.1186/s13068-018-1155-3.
216. Giummarella, N., Pu, Y., Ragauskas, A. J. & Lawoko, M. A critical review on the analysis of lignin carbohydrate bonds. *Green Chem.* (2019) doi:10.1039/c8gc03606c.
 217. Chen, X., Li, H., Sun, S., Cao, X. & Sun, R. Effect of hydrothermal pretreatment on the structural changes of alkaline ethanol lignin from wheat straw. *Sci. Rep.* **6**, 39354 (2016).
 218. Shimizu, S., Yokoyama, T., Akiyama, T. & Matsumoto, Y. Reactivity of lignin with different composition of aromatic syringyl/guaiacyl structures and Erythro/Threo side chain structures in β -O-4 type during alkaline delignification: As a basis for the different degradability of hardwood and softwood lignin. *J. Agric. Food Chem.* (2012) doi:10.1021/jf301329v.
 219. Liao, J. J., Latif, N. H. A., Trache, D., Brosse, N. & Hussin, M. H. Current advancement on the isolation, characterization and application of lignin. *Int. J. Biol. Macromol.* (2020) doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.06.168.
 220. Stewart, D. Lignin as a base material for materials applications: Chemistry, application and economics. *Ind. Crops Prod.* (2008) doi:10.1016/j.indcrop.2007.07.008.
 221. Brenelli, L. B. *et al.* Acidification treatment of lignin from sugarcane bagasse results in fractions of reduced polydispersity and high free-radical scavenging capacity. *Ind. Crops Prod.* (2016) doi:10.1016/j.indcrop.2015.12.013.
 222. Li, Y. *et al.* Catalytic depolymerization of organosolv sugarcane bagasse lignin in cooperative ionic liquid pairs. *Catalysis Today* (2016) doi:10.1016/j.cattod.2017.04.059.
 223. Ovejero-Pérez, A. *et al.* Acidic depolymerization vs ionic liquid solubilization in lignin extraction from eucalyptus wood using the protic ionic liquid 1-methylimidazolium chloride. *Int. J. Biol. Macromol.* (2020) doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.04.194.
 224. De Gregorio, G. F. *et al.* Mechanistic insights into lignin depolymerisation in acidic ionic liquids. *Green Chem.* (2016) doi:10.1039/c6gc01295g.
 225. An, Y.-X., Zong, M.-H., Wu, H. & Li, N. Pretreatment of lignocellulosic biomass with renewable cholinium ionic liquids: Biomass fractionation, enzymatic digestion and ionic liquid reuse. *Bioresour. Technol.* **192**, 165–171 (2015).
 226. Rahman, O. U. *et al.* Lignin nanoparticles: Synthesis, characterization and corrosion

- protection performance. *New J. Chem.* (2018) doi:10.1039/c7nj04103a.
227. Pin, T. C., Rabelo, S. C., Pu, Y., Ragauskas, A. J. & Costa, A. C. Effect of Protic Ionic Liquids in Sugar Cane Bagasse Pretreatment for Lignin Valorization and Ethanol Production. *ACS Sustain. Chem. Eng.* acssuschemeng.1c05353 (2021) doi:10.1021/acssuschemeng.1c05353.
 228. Saha, K. *et al.* Optimization of lignin recovery from sugarcane bagasse using ionic liquid aided pretreatment. *Cellulose* **24**, 3191–3207 (2017).
 229. Djafari Petroudy, S. R. Physical and mechanical properties of natural fibers. in *Advanced High Strength Natural Fibre Composites in Construction* (2017). doi:10.1016/B978-0-08-100411-1.00003-0.
 230. Walker, L. P. & Wilson, D. B. Enzymatic hydrolysis of cellulose: An overview. *Bioresour. Technol.* (1991) doi:10.1016/0960-8524(91)90095-2.
 231. Nascimento, V. M. *et al.* Effect of Anthraquinone on Alkaline Pretreatment and Enzymatic Kinetics of Sugarcane Bagasse Saccharification: Laboratory and Pilot Scale Approach. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **4**, 3609–3617 (2016).
 232. Pin, T. ‘*SI - Effect of protic ionic liquids in sugarcane bagasse pretreatment for lignin valorization and ethanol production*’, *Mendeley Data*, *VI*,. <https://data.mendeley.com/drafts/j2h2d3y2k3> (2021) doi:10.17632/j2h2d3y2k3.1.
 233. Jiang, B., Zhang, Y., Guo, T., Zhao, H. & Jin, Y. Structural characterization of Lignin and Lignin-Carbohydrate Complex (LCC) from Ginkgo Shells (*Ginkgo biloba* L.) by comprehensive NMR spectroscopy. *Polymers (Basel)*. (2018) doi:10.3390/polym10070736.
 234. Jönsson, L. J. & Martín, C. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresour. Technol.* **199**, 103–112 (2016).
 235. Biazi, L. E. *et al.* A differential evolution approach to estimate parameters in a temperature-dependent kinetic model for second generation ethanol production under high cell density with *Spathaspora passalidarum*. *Biochem. Eng. J.* (2020) doi:10.1016/j.bej.2020.107586.
 236. Nakasu, P. Y. S., Ienczak, J. L., Rabelo, S. C. & Costa, A. C. The water consumption of

- sugarcane bagasse post-washing after protic ionic liquid pretreatment and its impact on 2G ethanol production. *Ind. Crops Prod.* **169**, 113642 (2021).
237. Barcelos, C. A. *et al.* High-Efficiency Conversion of Ionic Liquid-Pretreated Woody Biomass to Ethanol at the Pilot Scale. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **9**, 4042–4053 (2021).
 238. Rabelo, S. C., Andrade, R. R., Maciel Filho, R. & Costa, A. C. Alkaline hydrogen peroxide pretreatment, enzymatic hydrolysis and fermentation of sugarcane bagasse to ethanol. *Fuel* **136**, 349–357 (2014).
 239. Chatel, G. & Rogers, R. D. Review: Oxidation of lignin using ionic liquids-an innovative strategy to produce renewable chemicals. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2**, 322–339 (2014).
 240. Sluiter, A. *et al.* Determination of Extractives in Biomass. *Biomass Anal. Technol. Team Lab. Anal. Proced.* 1–8 (2004) doi:2008.
 241. Hyman, D. *et al.* Determination of Acid Soluble Lignin Concentration Curve by UV-Vis Spectroscopy - Laboratory Analytical Procedure (LAP). *National Renewable Energy Laboratory (NREL)* (2008).
 242. A. Sluiter, B. Hames, R. Ruiz, C. S., Slui, J. & ter, D. Templeton, and D. C. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP); Issue Date: April 2008; Revision Date: July 2011 (Version 07-08-2011) - 42618.pdf. *Tech. Rep. NREL/TP -510 -42618* 1–15 (2008) doi:NREL/TP-510-42618.
 243. Sluiter, a *et al.* Determination of Sugars , Byproducts , and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples Laboratory Analytical Procedure (LAP) Issue Date : 12 / 08 / 2006 Determination of Sugars , Byproducts , and Degradation Products in Liquid Fraction Proce. *Lab. Anal. Proced. NREL/TP-510-42623* 1–14 (2008).
 244. ASTM. Standard Test Method for Determination of Acid-Insoluble Residue in Biomass. *Annu. B. ASTM Stand.* **i**, 5–7 (2009).
 245. Sluiter, a. *et al.* NREL/TP-510-42618 analytical procedure - Determination of structural carbohydrates and lignin in Biomass. *Lab. Anal. Proced.* **17** (2012) doi:NREL/TP-510-42618.
 246. Kaar, W. E. & Brink, D. L. Summative analysis of nine common north American woods. *J. Wood Chem. Technol.* **11**, 479–494 (1991).

247. Kaar, W. E., Cool, L. G., Merriman, M. M. & Brink, D. L. The complete analysis of wood polysaccharides using HPLC. *J. Wood Chem. Technol.* **11**, 447–463 (1991).
248. Rivera, E. C., Rabelo, S. C., dos Reis Garcia, D., Filho, R. M. & da Costa, A. C. Enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse for bioethanol production: determining optimal enzyme loading using neural networks. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **85**, 983–992 (2010).
249. Ghose, T. K. Measurement of cellulase activities. *Pure Appl. Chem.* **59**, 257–268 (1987).
250. Wood, T. M. & Bhat, K. M. Methods for measuring cellulase activities. *Methods Enzymol.* **160**, 87–112 (1988).
251. Adney, B. & Nrel, J. B. Measurement of Cellulase Activities Laboratory Analytical Procedure (LAP) Issue Date : 08 / 12 / 1996 Measurement of Cellulase Activities Laboratory Analytical Procedure (LAP). *Renew. Energy* **8** (2008) doi:10.1016/j.biortech.2006.01.007.
252. Santos, S. C. *et al.* Fermentation of Xylose and Glucose Mixture in Intensified Reactors by *Scheffersomyces stipitis* to Produce Ethanol. *Int. J. Biol. Biomol. Agric. Food Biotechnol. Eng.* **9**, 482–487 (2015).
253. Farias, D. & Maugeri Filho, F. Co-culture strategy for improved 2G bioethanol production using a mixture of sugarcane molasses and bagasse hydrolysate as substrate. *Biochem. Eng. J.* (2019) doi:10.1016/j.bej.2019.03.020.
254. Meng, X. *et al.* Characterization of fractional cuts of co-solvent enhanced lignocellulosic fractionation lignin isolated by sequential precipitation. *Bioresour. Technol.* **272**, 202–208 (2019).
255. Wang, Y. Y., Li, M., Wyman, C. E., Cai, C. M. & Ragauskas, A. J. Fast Fractionation of Technical Lignins by Organic Cosolvents. *ACS Sustain. Chem. Eng.* (2018) doi:10.1021/acssuschemeng.7b04546.
256. Pu, Y., Cao, S. & Ragauskas, A. J. Application of quantitative ³¹P NMR in biomass lignin and biofuel precursors characterization. *Energy Environ. Sci.* **4**, 3154 (2011).
257. Meng, X. *et al.* Determination of hydroxyl groups in biorefinery resources via quantitative ³¹P NMR spectroscopy. *Nat. Protoc.* **14**, 2627–2647 (2019).
258. Badertscher, M., Bischofberger, K., Munk, M. E. & Pretsch, E. A Novel Formalism To

Characterize the Degree of Unsaturation of Organic Molecules. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **41**, 889–893 (2001).

APÊNDICE A - Material suplementar dos artigos

Artigo “Structural features of protic ionic liquids and their impact on pretreatment performance for 2G ethanol production”¹⁴⁸ publicado na Energy.

Supplementary Information

Structural features of protic ionic liquids and their impact on pretreatment performance for E2G production

Thaynara C. Pin¹, Pedro S. Y Nakasu¹, Sarita C. Rabelo², Aline C. Costa^{*1}

¹Chemical Engineering School, University of Campinas - UNICAMP, Av. Albert Einstein, 500, Campinas, São Paulo, 13083-852, Brazil.

²Department of Bioprocess and Biotechnology, College of Agricultural Sciences, São Paulo State University (UNESP), Av. Universitária, 3780, Botucatu, São Paulo, 18610-034, Brazil.

1. Computational Details for PIL Screening

The geometry optimizations of PILs were performed based Sun et al. (2017). Frequency calculations were carried out to verify that the computed structures corresponded to energy minima. (MM2) using ChemDraw Professional (trial version). In the present study, prediction of the acidity, basicity, and net basicity values were based on global descriptors, such as chemical potential (μ) (Eq. 1) and chemical hardness (η) (Eq. 2), and electrophilicity were calculated from standard equations by Sun et al (2017).

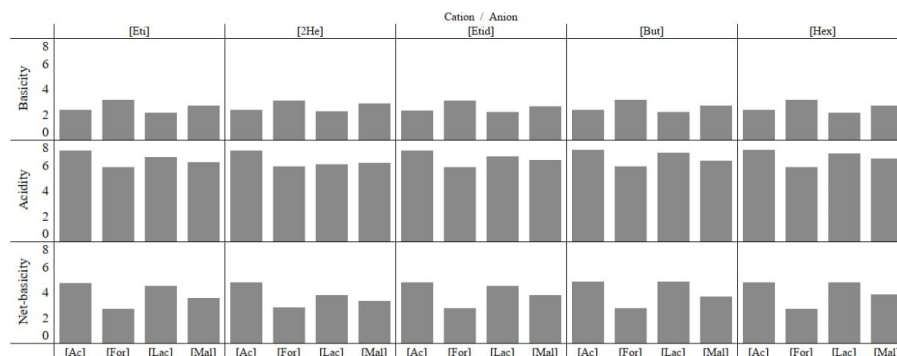
$$\mu = \frac{E_{LUMO} + E_{HOMO}}{2} \quad (1)$$

$$\eta = \frac{E_{LUMO} - E_{HOMO}}{2} \quad (2)$$

Where E_{LUMO} is the lowest unoccupied molecular orbital's energy and E_{HOMO} is the highest occupied molecular orbital's energy. These descriptors were used to derive the molecular basicity, acidity, and net basicity values for the novel ILs.

*Corresponding author. E-mail: accosta@feq.unicamp.br
Tel: +55 19 3521 3959.

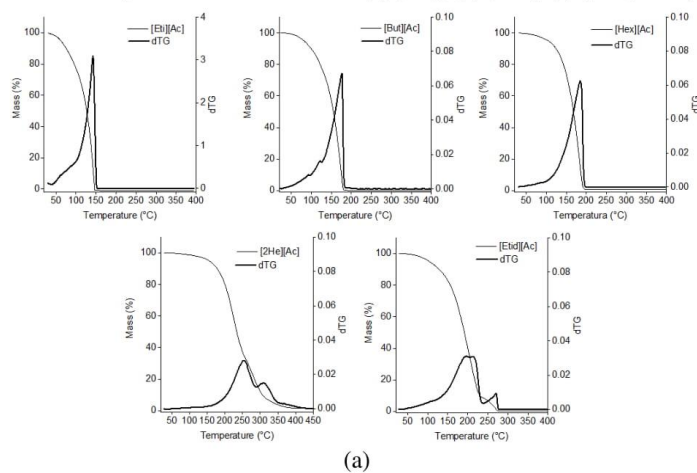
Figure 1. Prediction of values based on optimized geometries of PILs structures.

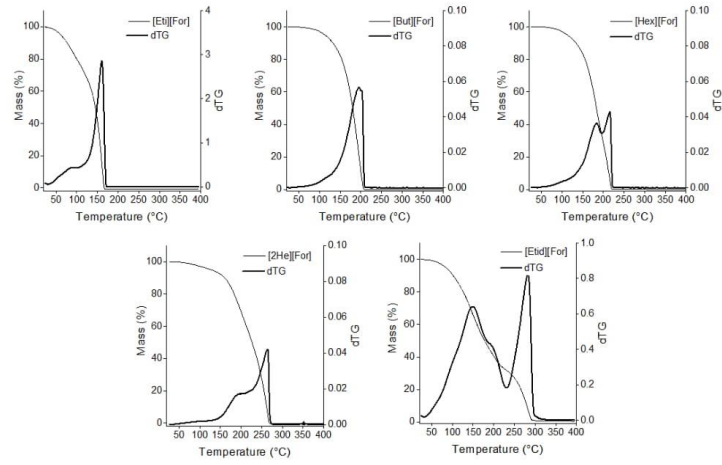


2. TGA

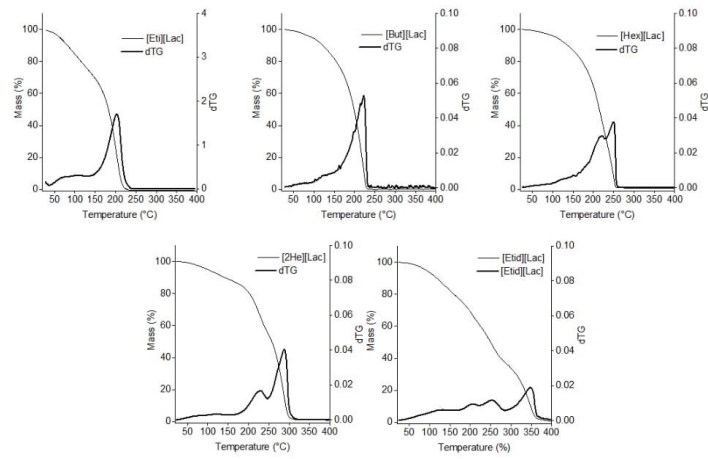
TGA graphs used to determine pretreatment temperature.

Figure 2. TGA analysis of PILs with anions (a) [Ac], (b) [For], (c) [Lac] and (d) [Mal].





(b)



(c)

3. Tukey Analysis

Figure 5. Cellulose (a) and hemicellulose (b) solubilization.

[illegible]

(a)

Turkey HSD test, variable: S02, hemi (End, Lac)		Approximate Probabilities for Post Hoc Test																			
Error Between MS = 73350, df = 20.000																					
Cell No	Var	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)	(16)	(17)	(18)	(19)	(20)
		39.221	19.251	40.251	13.592	23.739	23.717	25.711	28.248	20.204	20.024	26.764	16.251	33.004	4.0371	21.087	10.048	6.0399	10.000	10.760	6.210
1	[End][Lac]	0.00189	0.00189	0.00189	0.00012	0.00195	0.004657	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189
2	[End][Lac]	0.00189	0.99235	0.99235	0.00431	0.00215	0.00991	0.00062	0.99623	0.99991	0.99999	0.00189	0.18409	0.42803	0.00189	0.80751	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189
3	[End][Lac]	0.00189	0.99235	0.99235	0.00431	0.00215	0.00991	0.00062	0.99623	0.99991	0.99999	0.00189	0.18409	0.42803	0.00189	0.80751	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189
4	[Bui][Lac]	0.00189	0.00031	0.00197	0.00189	0.00189	0.00189	0.000201	0.000201	0.00189	0.00189	0.27303	0.87719	0.00189	0.00190	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189
5	[Bui][Lac]	0.00031	0.00031	0.00197	0.00189	0.00189	0.00189	0.000201	0.000201	0.00189	0.00189	0.27303	0.87719	0.00189	0.00190	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189
6	[Bui][Lac]	0.00031	0.00031	0.00197	0.00189	0.00189	0.00189	0.000201	0.000201	0.00189	0.00189	0.27303	0.87719	0.00189	0.00190	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189
7	[Zhe][Lac]	0.00189	0.00021	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189
8	[Zhe][Lac]	0.00021	0.00021	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189
9	[Zhe][Lac]	0.00021	0.00021	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189
10	[Bui][Lac]	0.00189	0.99863	1.00000	0.000201	0.00189	0.00189	0.000201	0.000201	1.00000	1.00000	0.00189	0.16584	0.52659	0.00189	0.99982	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189
11	[Bui][Lac]	0.00189	0.99863	1.00000	0.000201	0.00189	0.00189	0.000201	0.000201	1.00000	1.00000	0.00189	0.16584	0.52659	0.00189	0.99982	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189
12	[Bui][Lac]	0.00189	0.99863	1.00000	0.000201	0.00189	0.00189	0.000201	0.000201	1.00000	1.00000	0.00189	0.16584	0.52659	0.00189	0.99982	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189
13	[Zhe][Lac]	0.00189	0.99991	1.00000	0.000201	0.00189	0.00189	0.000201	0.000201	1.00000	1.00000	0.00189	0.25152	0.77224	0.00189	0.99976	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189
14	[Zhe][Lac]	0.00189	0.99991	1.00000	0.000201	0.00189	0.00189	0.000201	0.000201	1.00000	1.00000	0.00189	0.25152	0.77224	0.00189	0.99976	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189
15	[Zhe][Lac]	0.00189	0.99991	1.00000	0.000201	0.00189	0.00189	0.000201	0.000201	1.00000	1.00000	0.00189	0.25152	0.77224	0.00189	0.99976	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189
16	[End][Lac]	0.00189	0.00189	0.00189	0.00012	0.00195	0.004657	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189
17	[End][Lac]	0.00189	0.18409	0.11450	0.23703	0.00189	0.00194	0.00189	0.16584	0.16283	0.25152	0.00189	1.00000	1.00000	0.00189	0.00083	0.00025	0.00009	0.00189	0.00189	0.00189
18	[End][Lac]	0.00189	0.18409	0.11450	0.23703	0.00189	0.00194	0.00189	0.16584	0.16283	0.25152	0.00189	1.00000	1.00000	0.00189	0.00083	0.00025	0.00009	0.00189	0.00189	0.00189
19	[End][Lac]	0.00189	0.18409	0.11450	0.23703	0.00189	0.00194	0.00189	0.16584	0.16283	0.25152	0.00189	1.00000	1.00000	0.00189	0.00083	0.00025	0.00009	0.00189	0.00189	0.00189
20	[End][Lac]	0.00189	0.18409	0.11450	0.23703	0.00189	0.00194	0.00189	0.16584	0.16283	0.25152	0.00189	1.00000	1.00000	0.00189	0.00083	0.00025	0.00009	0.00189	0.00189	0.00189
21	[Bui][Lac]	0.00189	0.00031	0.00197	0.00189	0.00189	0.00189	0.000201	0.000201	0.00189	0.00189	0.27303	0.87719	0.00189	0.00190	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189
22	[Bui][Lac]	0.00189	0.00031	0.00197	0.00189	0.00189	0.00189	0.000201	0.000201	0.00189	0.00189	0.27303	0.87719	0.00189	0.00190	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189
23	[Bui][Lac]	0.00189	0.00031	0.00197	0.00189	0.00189	0.00189	0.000201	0.000201	0.00189	0.00189	0.27303	0.87719	0.00189	0.00190	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189
24	[Zhe][Lac]	0.00189	0.00021	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189
25	[Zhe][Lac]	0.00189	0.00021	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189
26	[Zhe][Lac]	0.00189	0.00021	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189
27	[Bui][Lac]	0.00189	0.99863	1.00000	0.000201	0.00189	0.00189	0.000201	0.000201	1.00000	1.00000	0.00189	0.16584	0.52659	0.00189	0.99982	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189
28	[Bui][Lac]	0.00189	0.99863	1.00000	0.000201	0.00189	0.00189	0.000201	0.000201	1.00000	1.00000	0.00189	0.16584	0.52659	0.00189	0.99982	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189
29	[Bui][Lac]	0.00189	0.99863	1.00000	0.000201	0.00189	0.00189	0.000201	0.000201	1.00000	1.00000	0.00189	0.16584	0.52659	0.00189	0.99982	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189
30	[Zhe][Lac]	0.00189	0.00021	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189
31	[Zhe][Lac]	0.00189	0.00021	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189
32	[Zhe][Lac]	0.00189	0.00021	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189
33	[Bui][Lac]	0.00189	0.99863	1.00000	0.000201	0.00189	0.00189	0.000201	0.000201	1.00000	1.00000	0.00189	0.16584	0.52659	0.00189	0.99982	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189
34	[Bui][Lac]	0.00189	0.99863	1.00000	0.000201	0.00189	0.00189	0.000201	0.000201	1.00000	1.00000	0.00189	0.16584	0.52659	0.00189	0.99982	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189
35	[Bui][Lac]	0.00189	0.99863	1.00000	0.000201	0.00189	0.00189	0.000201	0.000201	1.00000	1.00000	0.00189	0.16584	0.52659	0.00189	0.99982	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189
36	[Zhe][Lac]	0.00189	0.00021	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189
37	[Zhe][Lac]	0.00189	0.00021	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189
38	[Zhe][Lac]	0.00189	0.00021	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189
39	[Bui][Lac]	0.00189	0.99863	1.00000	0.000201	0.00189	0.00189	0.000201	0.000201	1.00000	1.00000	0.00189	0.16584	0.52659	0.00189	0.99982	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189
40	[Bui][Lac]	0.00189	0.99863	1.00000	0.000201	0.00189	0.00189	0.000201	0.000201	1.00000	1.00000	0.00189	0.16584	0.52659	0.00189	0.99982	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189
41	[Bui][Lac]	0.00189	0.99863	1.00000	0.000201	0.00189	0.00189	0.000201	0.000201	1.00000	1.00000	0.00189	0.16584	0.52659	0.00189	0.99982	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189
42	[Zhe][Lac]	0.00189	0.00021	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189
43	[Zhe][Lac]	0.00189	0.00021	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189
44	[Zhe][Lac]	0.00189	0.00021	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189
45	[Bui][Lac]	0.00189	0.99863	1.00000	0.000201	0.00189	0.00189	0.000201	0.000201	1.00000	1.00000	0.00189	0.16584	0.52659	0.00189	0.99982	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189	0.00189
46	[Bui][Lac]	0.00189	0.99863	1.00000	0.000201	0.00189	0.00189	0.000201	0.000201	1.00000											

(b)

Artigo “Structural characterization of sugarcane lignins extracted from different protic ionic liquid pretreatments”⁸⁵ publicado na Renewable Energy.

SUPPORTING INFORMATION

Structural characterization of sugarcane lignins extracted from different protic ionic liquid pretreatments

Thaynara C. Pin ^{a,c}, Viviane M. Nascimento ^{a,b}, Aline C. Costa ^a, Yunqiao Pu ^d, Arthur J. Ragauskas ^{c,d,e}, Sarita C. Rabelo ^{f*}

^aChemical Engineering Faculty, University of Campinas (UNICAMP), Av. Albert Einstein, Campinas, Sao Paulo, 13083-852, Brazil.

^bBrazilian Biorenewables National Laboratory (LNBR), Brazilian Center for Research in Energy and Materials (CNPEM), Zip Code 13083-970, Campinas, Sao Paulo, Brazil.

^cDepartment of Chemical and Biomolecular Engineering, University of Tennessee, Middle Dr, Knoxville, TN, 37916, USA.

^dBiosciences Division, Joint Institute for Biological Sciences, Oak Ridge National Laboratory (ORNL), Bethel Valley Rd. Oak Ridge, TN, 37831, USA.

^eCenter for Renewable Carbon, Department of Forestry, Wildlife, and Fisheries, University of Tennessee, Institute of Agriculture, Morgan Cir Dr, Knoxville, TN 37996, USA

^fDepartment of Bioprocess and Biotechnology, College of Agricultural Sciences, São Paulo State University (UNESP), Av. Universitária, Botucatu, São Paulo, 18610-034 Brazil

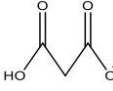
*Department of Bioprocess and Biotechnology, College of Agricultural Sciences, Sao Paulo State University (UNESP), Av. Universitaria, Botucatu, Sao Paulo, 18610-034 Brazil. E-mail address: sarita.rabelo@unesp.br.

S1. Lignin extraction.....	3
S2. 2D-Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (2D NMR)	3
S3. Pyrolysis-Gas Chromatography-Mass Spectrometry (Py-GC/MS).....	5
S4. Gel Permeation Chromatography (GPC)	8
S5. TGA	9
S6. Elemental analysis and C9-formula	9

S1. Lignin extraction

The chemical composition of raw sugarcane bagasse (collected in Santa Maria Mill-Manduri- SP-Brazil) was 38.8% of cellulose, 21.7% of hemicelluloses, 25.2% of lignin, 4.4% of ashes and 9% of extractives.

Table S1.1. Structure of protic ionic liquids used for lignin extraction.

Cation	Name	Anion	Name	Anion	Name
	Ethanolammonium		Acetate		Lactate
	ethylenediammonium		Formate		Malonate

S2. 2D-Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (2D NMR)

2D-NMR spectra were acquired on Agilent DD2 and Agilent Inova spectrometers 600 MHz (California, USA), from the Brazilian Biosciences National Laboratory (LNBIO/CNPEM), equipped with triple resonance cold probes. Briefly, around 30 mg of lignin samples were dissolved in 0.65 mL of DMSO-d₆. HSQC experiments were acquired with spectral widths of 8012.8 Hz (from 16 to 0 ppm) and 25133.3 Hz (from 165 to 0 ppm) for the ¹H- and ¹³C-dimensions. Processing used typical matched Gaussian apodization in the ¹H dimension and squared cosine-bell apodization in the ¹³C proportion. Before to Fourier transformation, the data matrixes were zero-filled up to 1202 points in the ¹³C-dimension. A semi-quantitative analysis was performed using Bruker's Topspin 3.6.1 software, and the different inter-unit linkages (as well as the content of the *p*CA and FA) were referred to as per 100 aromatic lignin units (H+G+S=100).

Table S2.1. Assignments of the lignin ^{13}C - ^1H correlation peaks in the 2D HSQC spectra of the lignins extracted from PILs pretreatments.

Label	$\delta\text{C}/\delta\text{H}$ (ppm)	Assignment
Methoxyl	55.6/3.71	C-H in methoxyls
A γ	59.3-60.0/3.6	C γ - H γ in β -O-4' substructures (A)
B γ	62.9/3.4-3.7	C γ - H γ in phenylcoumaran substructures (B)
A γ'	62.9-63.04/3.45-3.9	C γ - H γ in γ -acylated β -O-4' substructures (A')
A α /A α'	70.6-71.63/4.88	C α - H α in β -O-4' substructures (A)
C γ	71.0/4.5	C γ - H γ in β - β' resinol substructures (C)
A β (G)	83.9/4.27	C β - H β in β -O-4 substructures (A) linked to a G unit
A β (S)	85.4-86.0/4.08	C β - H β in β -O-4 substructures (A) linked to an S unit
B α	86.30/5.44	C α - H α in β -5' phenylcoumaran substructures (B)
T $_{2,6}$	103.9-7.3	C $_{2,6}$ -H $_{2,6}$ in tricin units (T')
S $_{2,6}$	103.9/6.69-6.78 104.09/6.68	C $_{2,6}$ -H $_{2,6}$ in syringyl units (S)
J $_{2,6}$ (S)	106.88/6.67-6.9	C $_{2,6}$ -H $_{2,6}$ in cinnamaldehyde end groups in S units (J)
G $_2$	109.7-110.5- 111.2/6.99-7.03	C $_2$ -H $_2$ in guaiacyl units (G)
FA $_2$	110.38-110.8/7.1- 7.31 111.7/7.12	C $_2$ -H $_2$ in ferrulic acid (Fa)
G $_5$	116.0/6.96 114.7/6.69 114.9/6.78	C $_2$ -H $_2$ in guaiacyl units (G)
G $_{5,6}$	114.96-115.4- 118.6/6.75-6.9	C $_{5,6}$ -H $_{5,6}$ in guaiacyl units (G)
pCA $_{3,5}$	115.7/6.9-6.77	C $_{3,5}$ -H $_{3,5}$ in p-coumaric acid (pCA)
H $_{3,5}$	114.4 -115.13/ 6.55-6.70-6.9	C $_{3,5}$ -H $_{3,5}$ in p-hydroxyphenyl units (H)
G $_6$	118.9/6.8	C $_6$ -H $_6$ in guaiacyl units (G)
H $_{2,6}$	126.5-127.2/ 7.05-7.13	C $_{2,6}$ -H $_{2,6}$ in p-hydroxyphenyl units (H)
pC $_{2,6}$	128.9/7.42	C $_{2,6}$ -H $_{2,6}$ in p-coumarate (pCA)
Fa α' /pCA α'	138.5/7.29	Feruloyl amide and pCA amide
Polysaccharide cross-peak signals		
Ara $_{2,3,4}$	73.3/3.71	C $_2$ -H $_2$, C $_3$ -H $_3$, and C $_4$ -H $_4$ of arabinofuranose
	75.4/3.5	
	75.95/3.25	
	82.2/3.57	

X_n	72.8/3.5	C ₂ -H ₂ in β -d-xylopyranoside
	74.1/3.25	C ₃ -H ₃ in β -d-xylopyranoside
	70.7/3.4	C ₅ -H ₅ in β -d-xylopyranoside

S3. Pyrolysis-Gas Chromatography-Mass Spectrometry (Py-GC/MS)

Pyrolysis of lignins (approximately 100 μ g) was performed with an EGA/PY-3030S micro-furnace pyrolyzer (Frontier Laboratories Ltd., Fukushima, Japan) connected to a Shimadzu CG2010 Plus gas chromatograph (Kyoto, Japan) using an Ultra alloy fused-silica capillary column (30 m x 0.25 mm i.d., 0.25 μ m film thickness) and a Shimadzu QP-2010 Ultra mass selective detector (EI at 70 eV). The pyrolysis was performed at 500 °C. The oven temperature was programmed from 45°C (4 min) to 300°C (20 min) at 2°C min⁻¹. Helium was the carrier gas (1 mL min⁻¹). The compounds were identified by comparison with Wiley and NIST libraries (NIST MS Search Program Version 2.3). Peak molar areas were calculated for lignin-degradation products. Obtain S, G and H units the molar areas were summed, normalized and expressed as percentages.

Table S3.1. Identities and relative abundances of derived compounds released after Py-GC/MS of the lignins isolated from PILs pretreatment.

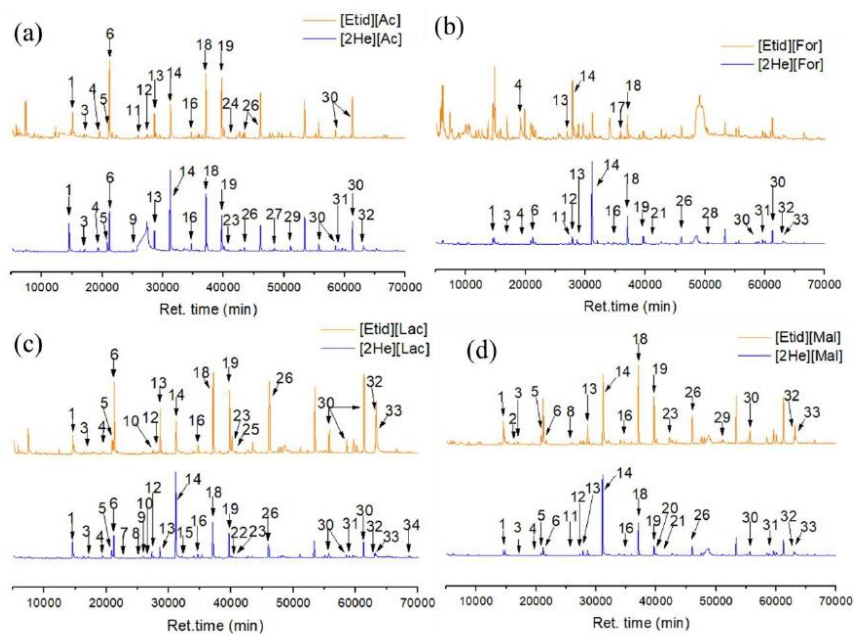
Label	Unit	Compound	[2He] [Ac]	[Etid] [Ac]	[2He] [For]	[Etid] [For]	[2He] [Lac]	[Etid] [Lac]	[2He] [Mal]	[Etid] [Mal]
1	H	Phenol	0.08	0.07	0.02	-	0.06	0.03	0.03	0.04
2	H	Anisole, p-amino-	-	-	-	-	-	-	-	0.002
3	H	Anisole p-methyl-	0.003	0.003	0.002	-	0.00	0.002	0.001	0.005
4	H	Phenol, 2-methyl-	0.01	0.01	0.004	0.08	0.01	0.003	0.003	-
5	H	Phenol, 4 methyl-	0.01	0.01	-	-	0.02	0.02	0.02	0.02
6	G	Phenol, 2-methoxy-	0.09	0.12	0.03	-	0.06	0.09	0.03	0.07
7	H	Anisole, p-vinyl	-	-	-	-	0.001	-	-	-
8	H	Phenol, 2-ethyl-	-	-	-	-	0.001	-	-	0.004
9	H	Anisole, p-ethyl-	0.001	-	-	-	0.002	-	-	-
10	H	Phenol, 2,4-Dimethyl-	-	-	-	-	0.003	0.002	-	-
11	Ukn	Phenol, 2,5-dimethyl-	-	0.005	0.001	-	-	-	0.001	-
12	H	Phenol, 4-ethyl-	-	0.005	0.01	-	0.02	0.002	0.01	-
13	G	Phenol, 2-methoxy-4-methyl-	0.04	0.04	0.02	0.03	0.03	0.06	0.02	0.03
14	H/FA	Phenol, 4 vinyl	0.22	0.08	0.42	0.32	0.31	0.05	0.42	0.21
15	Ukn	2-Ethyl-5-methylphenol	-	-	-	-	0.002	-	-	-
16	G	phenol, 2-methoxy-p-ethyl-	0.01	0.01	0.001	-	0.01	0.01	0.003	0.004
17	H	1H-Indole	-	-	-	0.03	-	-	-	-
18	G/pCA	Phenol, 2-methoxy-4 vinyl-	0.11	0.10	0.10	0.21	0.09	0.10	0.11	0.14
19	S	Syringol	0.06	0.09	0.03	-	0.05	0.08	0.02	0.08
20	H	p-chavicol	-	-	-	-	-	-	0.02	-

S6

21	G	Acetyleneugenol	-	-	0.01	-	-	-	0.004	-
22	G	Phenol, 2-methoxy-4-propyl-	-	-	-	-	0.001	-	-	-
23	G	Guaiacol, 3-Allyl-	0.01	-	-	-	0.004	0.02	-	0.01
24	G	Eugenol	-	0.01	-	-	-	-	-	-
25	G	Phenol, 2-methoxy-4-propyl-	-	-	-	-	-	0.002	-	-
26	G	cis/trans - Isoeugenol	0.005	0.10	0.04	0.08	0.004	0.01	0.003	0.01
27	G	Acetoguaiacone	0.004	-	-	-	-	-	-	-
28	H	Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-	-	-	0.005	-	-	-	-	-
29	G	Guaiacyl acetone	0.002	-	-	-	-	-	-	0.003
30	S	Methoxyeugenol	0.07	0.06	0.05	-	0.05	0.12	0.06	0.07
31	S	Syringaldehyde	0.002	-	0.01	-	0.004	-	0.01	-
32	S	Acetosyringone	0.01	-	0.01	-	0.01	0.005	0.01	0.01
33	G	cis/trans - Coniferyl Alcohol	-	-	0.003	-	0.01	0.07	0.01	0.02
34	pCA/FA	Cinnamic acid	-	-	-	-	0.003	-	-	-

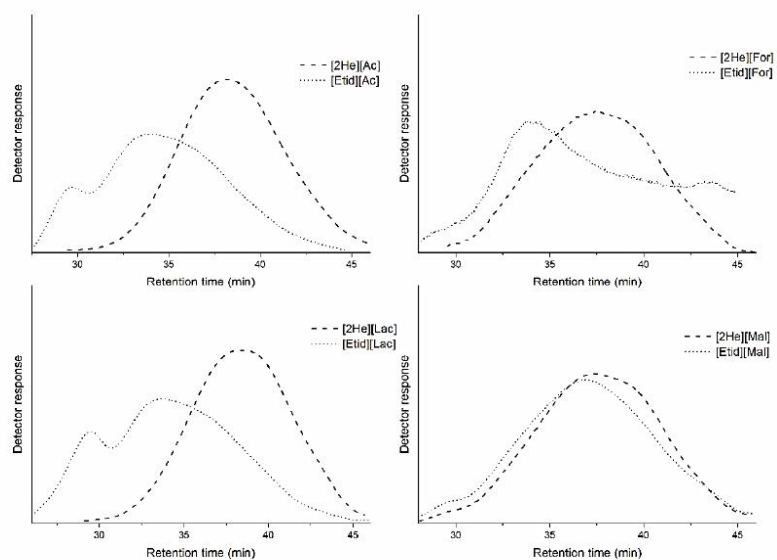
S7

Figure S3.1. Py-GC/MS chromatograms of the phenolics extracts of PILs pretreatments from sugarcane bagasse based on (a) acetate, (b) formate, (c) lactate and (d) malonate anions.



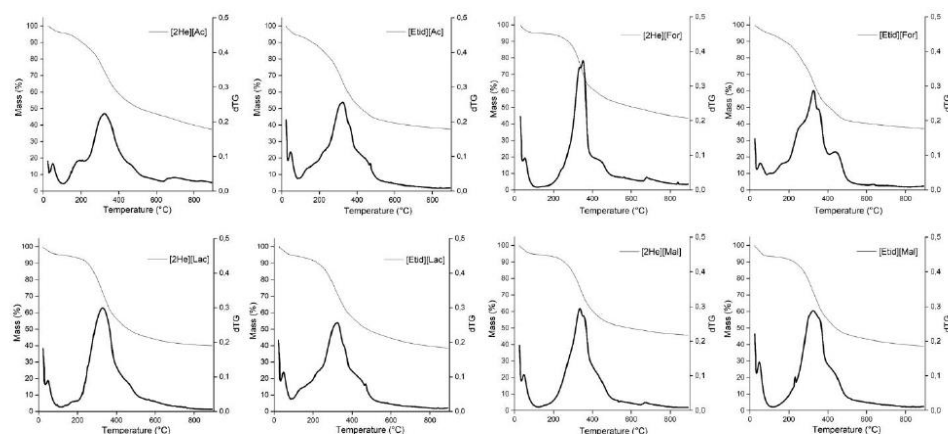
S4. Gel Permeation Chromatography (GPC)

Figure S4.1. GPC curves for all lignins extracted with PILs.



S5. TGA

Figure S5.1. TGA curves for all lignins extracted with PILs.



S6. Elemental analysis and C9-formula

Raw bagasse:

Figure S6.1. Elemental analysis of raw bagasse.

	% C	% H	% N	% O
Raw bagasse	44.3	7.1	0.3	48.2

The C₉₀₀ formula for lignins was calculated based on carbon, hydrogen and oxygen contents provided by elemental analysis and methoxyl group estimated by NMR ¹H frequency of no condensed structures (NCS) based on Costa et. al. (2015) [1] (Eq. 2).

$$\text{NCS} = 100 - \text{DC} \quad (\text{Eq. 2})$$

Where DC is the degree of condensations, calculated based on Costa et. al. (2014) [2], which considered the integration of regions condensations of S, G and H units by NMR ¹³C analysis.

REFERENCES

- [1] C.A.E. Costa, P.C.R. Pinto, A.E. Rodrigues, Radar Tool for Lignin Classification on the Perspective of Its Valorization, Ind. Eng. Chem. Res. (2015). <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.5b01859>.
- [2] C.A.E. Costa, P.C.R. Pinto, A.E. Rodrigues, Evaluation of chemical processing impact on E. globulus wood lignin and comparison with bark lignin, Ind. Crops Prod. (2014). <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.07.045>.

Artigo “Influence of chain length in protic ionic liquids on physicochemical and structural features of lignins from sugarcane bagasse”¹⁶⁷ publicado na Industrial crops and Products

SUPPORTING INFORMATION

Influence of chain length in protic ionic liquids on physicochemical and structural features of lignins from sugarcane bagasse

Thaynara C. Pin ^{a,b}, Livia B. Brenelli ^c, Viviane M. Nascimento ^{a,d}, Aline C. Costa ^a, Yunqiao Pu ^e, Arthur J. Ragauskas ^{b,e,f}, Sarita C. Rabelo ^{g*}

^a School of Chemical Engineering, University of Campinas (UNICAMP), Av. Albert Einstein, Campinas, São Paulo, 13083-852, Brazil.

^b Department of Chemical and Biomolecular Engineering, University of Tennessee, Middle Dr, Knoxville, TN, 37916, USA

^c Interdisciplinary Center of Energy Planning (NIPE), University of Campinas (UNICAMP), R. Cora Coralina, Campinas, São Paulo, 13083-896, Brazil.

^d Brazilian Biorenewables National Laboratory (LNBR), Brazilian Center for Research in Energy and Materials (CNPEM), R. Giuseppe Maximo Scolfaro, Campinas, São Paulo, 13083-970, Brazil

^e Biosciences Division, Joint Institute for Biological Sciences, Oak Ridge National Laboratory (ORNL), Bethel Valley Rd. Oak Ridge, TN, 37831, USA.

^f Center for Renewable Carbon, Department of Forestry, Wildlife, and Fisheries, University of Tennessee, Institute of Agriculture, Morgan Cir Dr, Knoxville, TN 37996, USA

*^g Department of Bioprocess and Biotechnology, College of Agricultural Sciences, São Paulo State University (UNESP), Av. Universitária, Botucatu, São Paulo, 18610-034 Brazil. E-mail: sarita.rabelo@unesp.br, phone: +55 14 3880 7330.

S1. Lignin extraction	3
S2. 2D HSQC NMR	4
S3. Pyrolysis GC/MS.....	6
S4. GPC	9
S5. TGA.....	10

S1. Lignin extraction

Reagents description used to PILs synthesis: Acetic acid (Merck, $\geq 99\%$); Formic acid (Merck, $\geq 99.0\%$); Lactic acid (Sigma Aldrich, $\geq 85.0\%$); Malonic Acid (Merck, $\geq 99.0\%$); Ethylamine (Sigma Aldrich, $\geq 70.0\%$); Butylamine (Sigma Aldrich, $\geq 99.5\%$) and Hexylamine (Merck, $\geq 99.0\%$).

Table S1.1. Structure of protic ionic liquids used for lignin extraction from sugarcane bagasse.

Cation	Name	Anion	Name	Name	Anion
	Ethylamonium		Acetate		Lactate
	Butylamonium		Formate		Malonate
	Hexylamonium				

Table S1.2. Structure of PILs used for lignin extraction from sugarcane bagasse.

PIL used	Pretreatment temperature (°C)	PIL used	Pretreatment temperature (°C)	PIL used	Pretreatment temperature (°C)
[Eti][Ac]	105.0	[But][Ac]	125.0	[Hex][Ac]	135.0
[Eti][For]	120.0	[But][For]	140.0	[Hex][For]	135.0
[Eti][Lac]	155.0	[But][Lac]	165.0	[Hex][Lac]	165.0
[Eti][Mal]	130.0	[But][Mal]	140.0	[Hex][Mal]	145.0

S2. 2D HSQC NMR

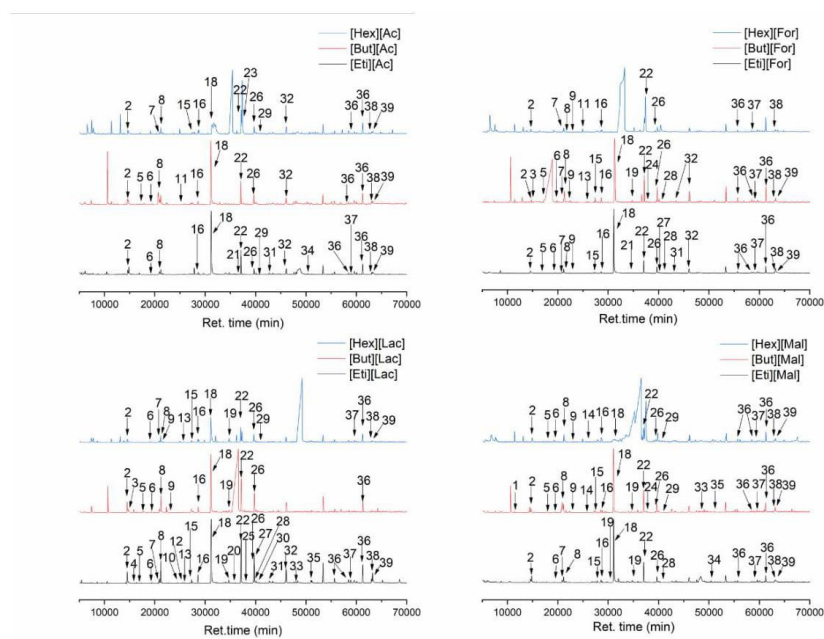
Table S2.1. Assignments of the lignin ^{13}C - ^1H correlation peaks in the 2D HSQC spectra of the PIL-recovered lignins.

Label	$\delta\text{C}/\delta\text{H}$ (ppm)	Assignment
Methoxyl	55.6/3.71	C-H in methoxyls
A γ	59.3-60.0/3.6	C γ -H γ in β -O-4' substructures (A)
I γ	60.8/4.11	C γ -H γ in cinnamyl alcohol end-groups (I)
B γ	62.9/3.4-3.7	C γ -H γ in β -5 phenylcoumaran substructures (B)
A γ'	62.9-63.0/3.45-3.9	C γ -H γ in γ -acylated β -O-4' substructures (A')
A α /A α'	71.6/4.88	C α -H α in β -O-4 substructures (A)
A β (G)	83.4/4.27	C β -H β in β -O-4 substructures (A) linked to a G unit
A β (S)	85.4/4.10	C β -H β in β -O-4 substructures (A) linked to an S unit
B α	86.3/5.44	C α -H α in phenylcoumaran substructures (B)
T ₆	98.8/6.22	C ₆ -H ₆ in tricin units (T)
S _{2,6}	103.9/6.69-6.78	C _{2,6} -H _{2,6} in syringyl units (S)
T _{2,6'}	103.9/7.3	C _{2,6'} /H _{2,6'} in tricin units (T)
G ₂	110.5/6.99-7.03	C ₂ -H ₂ in guaiacyl units (G)
FA ₂	110.4/7.31	C ₂ -H ₂ in ferulic acid units (FA)
pCA β /FA β	113.2/6.2	C β -H β in p-coumarate (pCA) and ferulate (FA)
G _{5,6}	114.9-115.4-118.6/6.75-6.90	C _{5,6} -H _{5,6} in guaiacyl units (G)
pCA _{3,5}	115.7/6.90-6.77	C _{3,5} -H _{3,5} in p-coumaric acid (pCA)
H _{3,5}	114.4 -115.1/ 6.55-6.70-6.90	C _{3,5} -H _{3,5} in p-hydroxyphenyl units (H)

$pCA\beta'/FA\beta'$	118.9/6.40	$C\beta'-H\beta'$ in p-coumarate amide and ferulate amide
$H_{2,6}$	126.5-127.2/ 7.05-7.13	$C_{3,5}-H_{3,5}$ in p-hydroxyphenyl units (H)
$pCA_{2,6}$	129.5-130.1/7.47	$C_{2,6}-H_{2,6}$ in p-coumarate (pCA)
$pCA\alpha'/FA\alpha'$	138.3/7.30	$C\alpha'-H\alpha'$ in p-coumarate amide and ferulate amide
$pCA\alpha/FA\alpha$	144.5/7.5	$C\alpha-H\alpha$ in p-coumarate (pCA) and ferulate (FA)
Polysaccharide cross-peak signals		
Xn	72.8/3.5	C_2-H_2 in β -d-xylopyranoside
	74.1/3.25	C_3-H_3 in β -d-xylopyranoside
	70.7/3.4	C_5-H_5 in β -d-xylopyranoside

S3. Pyrolysis GC/MS

Figure S3.1. Py-GC/MS chromatograms of the phenolics extracts of PIL-recovered lignins.



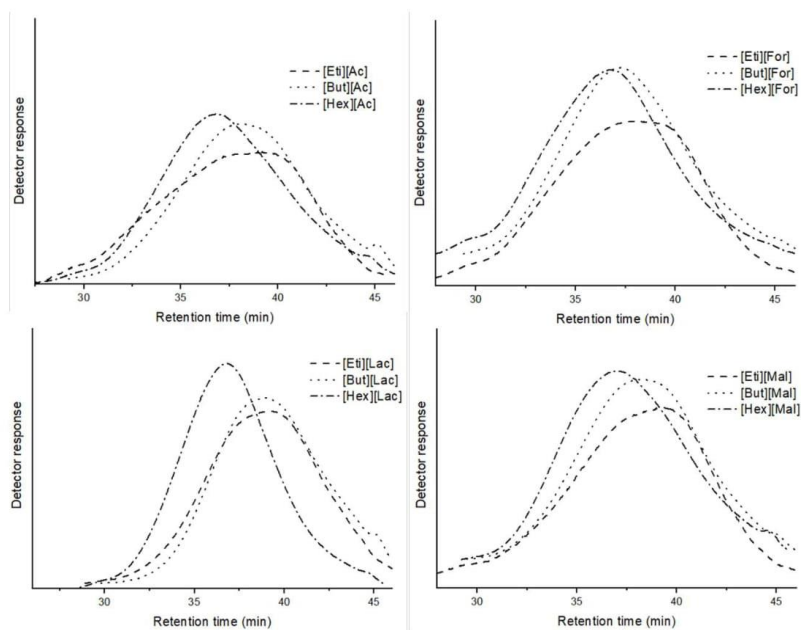
22	Gi/pCA	Phenol, 2-methoxy, 4-vinyl-	0.09	0.11	0.08	0.07	0.08	0.21	0.11	0.13	0.104	0.11	0.09	0.05
23	Unk	Piperidine, 5-ethyl-2-methyl	-	-	0.35	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	Unk	2,5-Pyrrolidinedione, 1-butyl-	-	-	-	-	0.002	-	-	-	-	-	0.004	-
25	H	Phenol, 3-methoxy-5-methyl-	-	-	-	-	-	-	0.001	-	-	-	-	-
26	S	Syringol	0.02	0.04	0.04	0.001	0.03	0.02	0.07	0.07	0.035	0.03	0.03	0.09
27	H	p-chavicol	-	-	-	0.03	-	-	0.001	-	-	-	-	-
28	G	Phenol, 2-methoxy, 3-Allyl-	-	-	-	0.003	0.006	-	0.003	-	-	0.004	-	-
29	G	Eugenol	0.004	-	0.01	-	-	-	-	-	0.005	-	0.005	0.01
30	G	Phenol, 2-methoxy-4-propyl-	-	-	-	-	-	-	0.001	-	-	-	-	-
31	G	Vanillin	0.002	-	-	0.002	-	-	0.005	-	-	-	-	-
32	G	cis/trans - Isoeugenol	0.03	0.04	0.05	0.002	0.042	-	0.003	-	-	-	-	-
33	G	Acetoguaiacone	-	-	-	-	-	-	0.003	-	-	-	0.004	-
34	H	Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-	0.002	-	-	-	-	-	-	-	-	0.005	-	-
35	G	Guaiacyl acetone	-	-	-	-	-	-	0.003	-	-	-	0.001	-
36	S	Methoxyeugenol	0.030	0.05	0.05	0.04	0.05	0.06	0.05	0.03	0.055	0.03	0.04	0.11
37	S	Syringaldehyde	0.003	-	0.002	0.003	0.004	0.02	0.01	-	0.003	0.002	0.005	0.005
38	S	Acetosyringone	0.01	0.01	0.01	0.003	0.004	0.03	0.01	-	0.008	0.004	0.005	0.01
39	G	cis/trans - Coniferyl Alcool	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	-	0.02	-	0.005	0.01	0.02	0.03

S8

Table S3.1. Identities and relative abundances of derived compounds released after Py-GC/MS of the lignins isolated from PILs pretreatment

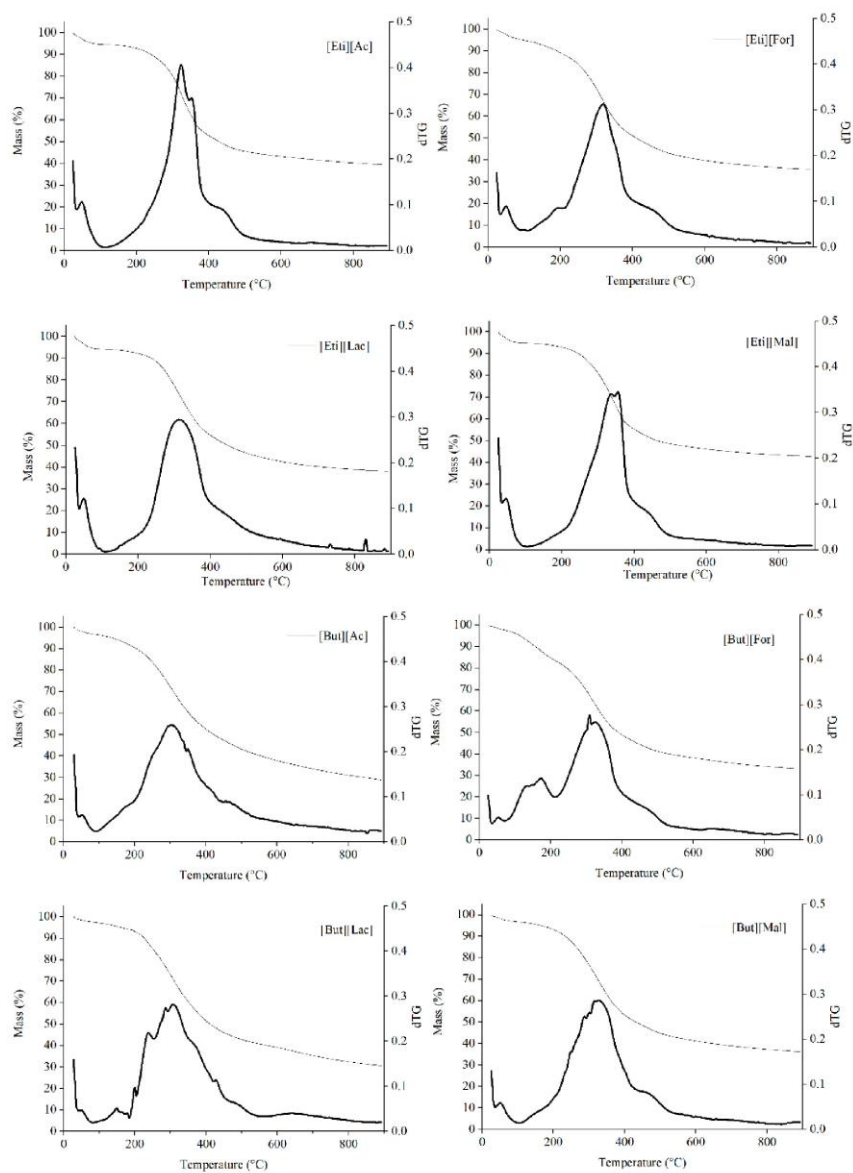
Label	Unit	Compound	[Eti] [Ac]	[But] [Ac]	[Hex] [Ac]	[Eti] [For]	[But] [For]	[Hex] [For]	[Eti] [Lac]	[But] [Lac]	[Hex] [Lac]	[Eti] [Mal]	[But] [Mal]	[Hex] [Mal]
1	Unk	1H-Pyrrole, 1-ethyl-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.002	-
2	H	Phenol	0.033	0.01	0.04	0.03	0.01	0.19	0.04	0.05	0.046	0.02	0.03	0.07
3	Unk	1H-Pyrrole, 1-butyl-	-	-	-	-	0.01	-	-	0.01	-	-	-	-
4	H	Anisole, p-amino-	-	-	-	-	-	-	0.001	-	-	-	-	-
5	H	Anisole p-methyl-	-	0.002	-	0.003	0.002	-	0.001	0.002	-	-	0.001	0.003
6	H	Phenol, 2-methyl-	0.002	0.004	-	0.003	0.004	-	0.003	0.01	0.004	0.003	0.002	0.01
7	H	Phenol, 4 methyl-	-	-	0.01	0.01	0.01	0.03	0.01	-	0.012	0.01	-	-
8	G	Phenol, 2-methoxy-	0.02	0.04	0.04	0.02	0.03	0.14	0.05	0.07	0.054	0.03	0.03	0.07
9	H	Anisole, p-vinyl	-	-	-	0.001	0.002	0.01	-	0.001	0.001	-	0.001	0.003
10	Unk	n-ethylsuccinimide	-	-	-	-	-	-	0.001	-	-	-	-	-
11	H	Phenol, 2-ethyl	-	0.01	-	-	-	0.01	-	-	-	-	-	-
12	H	Anisole, p-ethyl-	-	-	-	-	-	-	0.001	-	-	-	-	-
13	H	Phenol, 2,4-dimethyl-	-	-	-	-	0.001	-	0.001	-	0.001	-	-	-
14	Unk	Phenol, 2,5-dimethyl-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.001	0.01
15	H	Phenol, 4-ethyl-	-	-	0.01	0.01	0.01	-	0.01	-	0.018	0.003	0.01	-
16	G	Phenol, 2-methoxy-4-methyl-	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.014	0.01	0.01	0.01
17	Unk	2,4-Dimethyl benzaldehyde	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.002	-	-
18	H/FA	Phenol, 4 vinyl	0.37	0.42	0.05	0.45	0.44	-	0.28	0.36	0.39	0.45	0.47	0.27
19	G	Phenol, 2-methoxy, p-ethyl-	-	-	-	0.002	0.004	-	0.01	0.01	0.004	0.001	0.004	-
20	H	Phenol, 2-allyl-	-	-	-	-	-	-	0.001	-	-	-	-	-
21	H	1H-Indole	0.003	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

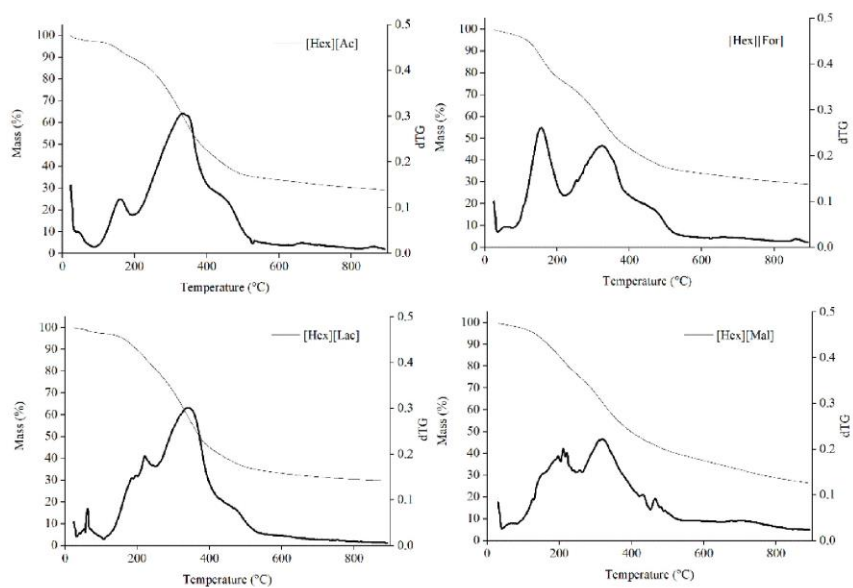
S7

S4. GPC**Figure S4.1.** GPC chromatograms of the phenolics extracts of PIL-recovered lignins.

S5. TGA

Figure S5.1. TGA of the phenolics extracts of PIL-recovered lignins.





Artigo “Effect of protic ionic liquids in sugarcane bagasse pretreatment for lignin valorization and ethanol production”²²⁷ publicado na ACS Sustainable Chemistry & Engineering e o material suplementar abaixo se encontra disponível também no repositório Mendeley Data²³².

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Effect of protic ionic liquids in sugarcane bagasse pretreatment for lignin valorization and ethanol production

Thaynara C. Pin†§, Sarita C. Rabelo⊥, Yunqiao Pu||, Arthur J. Ragauskas||§£, Aline C. Costa†*

†Chemical Engineering Faculty, State University of Campinas (UNICAMP), Av. Albert Einstein, Campinas, Sao Paulo, 13083-852, Brazil.

§Department of Chemical and Biomolecular Engineering, University of Tennessee, Middle Dr, Knoxville, TN, 37916, USA.

⊥Department of Bioprocess and Biotechnology, College of Agricultural Sciences, São Paulo State University (UNESP), Av. Universitaria, Botucatu, Sao Paulo, 18610-034 Brazil.

||Biosciences Division, Joint Institute for Biological Sciences, Oak Ridge National Laboratory (ORNL), Bethel Valley Rd. Oak Ridge, TN, 37831, USA.

£Center for Renewable Carbon, Department of Forestry, Wildlife, and Fisheries, University of Tennessee, Institute of Agriculture, Morgan Cir Dr, Knoxville, TN 37996, USA.

S1. Protic ionic liquid

1.1 Synthesis of PIL

The water contents of the PILs was determined to be less than 15 wt% by Karl Fischer moisture titrator (Metrohm, 787 KF titrino). Thermal decomposition temperature was measured based on thermogravimetric analysis (TGA). TGA data was obtained with a thermal gravimetric analyzer (Shimadzu, TGA-50M) equipped with a micro-analytical balance (Mettler Toledo, MX5). Approximately 2 mg of the samples in an aluminum pan was heated at a rate of 10°C/min with a temperature range of 25–400°C and under the N₂ gas using a flow rate of 50 mL/min.

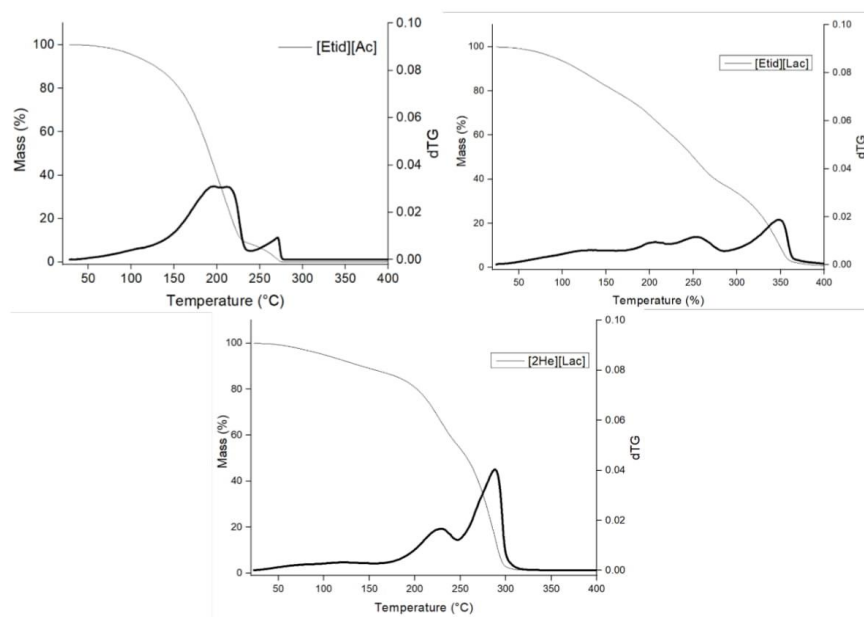
1.2 Structure of PILs

Table S1. Structure of cations and anions of PILs

Cations			
	[Etid]		[2He]
Anions			
	[Lac]		[Ac]

1.3 TGA analysis

Figure S1. TGA analysis of PILs used in the pretreatment



S2. Pretreatment, enzymatic hydrolysis and fermentation step

2.1 Pretreatment

Cellulose, hemicelluloses and lignin solubilization were determined according to Eq. 1

$$\text{Cellulose/hemicelluloses/lignin solubilization (\%)} = 100 \times 1 - \frac{C_1 \times M_1}{C_2 \times M_2} \quad (1)$$

Where: C_1 is the cellulose/hemicellulose/lignin composition after pretreatment (%); C_2 is the cellulose/hemicellulose/lignin composition before pretreatment (%); M_1 is the dry mass of bagasse after pretreatment (g); and M_2 is the dry mass of bagasse before pretreatment (g).

2.2 Enzymatic hydrolysis

Cellulose and hemicellulose conversion were determined according to Eq. 2

$$\text{Cellulose/hemicellulose conversion (\%)} = \frac{C_1 \times V \times 0.9 \times 100}{M_1 \times \frac{C_2}{100}} \quad (2)$$

Where: C_1 is the sugar in enzymatic hydrolysis (g/L); V is the working volume in enzymatic hydrolysis (L); M_1 is the dry mass of pretreated bagasse in enzymatic hydrolysis (g); and C_2 is the cellulose/hemicellulose composition in the pretreated biomass (%).

2.2 Fermentation

The yield (η) of each fermentation is given by Eq. 3. The ethanol volumetric productivity (Q_P) was calculated according to Eq. 4. The conversion factors of reducing sugars into ethanol ($Y_{P/S}$) and into cell biomass ($Y_{X/S}$) were calculated according to Eqs. 5 and 6, respectively.

$$\eta = \frac{Y_{P/S}}{0.511} \times 100 = \frac{P_f - P_0}{S_0 - S_f} \times \frac{100}{0.511} \quad (3)$$

$$Q_P = \frac{P_f - P_0}{t_f} \quad (4)$$

$$Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S_f} \quad (5)$$

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S_f} \quad (6)$$

2.4 HPLC analysis

The concentrations of glucose, xylose, arabinose, acetic acid, formic acid, lactic acid, ethanol, glycerol, xylitol were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) (Agilent Infinity 1260, Santa Clara, CA, USA) equipped with a refractive index (RI) detector and an Aminex HPX 87H (Bio-Rad, 300 × 7.8 mm) chromatography column at 35 °C using 5 mM H₂SO₄ degassed with HPLC-ultrapure water as a mobile phase at a flow rate of 0.6 mL/min. The concentrations of hydroxymethylfurfural (HMF) and furfural were determined by HPLC, but equipped with Diode Array (DAD) detector and C18 column at 30°C using acetonitrile:H₂O (v/v) 1:8 as mobile phase at flow rate of 0.8 mL/min.

S3. ANOVA analysis

Table S2. ANOVA for pretreatment using [Etid][Ac]

	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean square	F value	
Lignin removal					
Regression	303.82	3	101.27	58.67	Significant
Residual	12.08	7	1.72		
Lack of fit	12.01	5	2.40	67.22	Not significant
Pure error	0.07	2	0.03		
Cor total	315.90	10			
R ²	0.9617				
R ² adj	0.9453				
Cellulose conversion					
Regression	92.94	3	30.98	8.47	Significant
Residual	25.61	7	3.66		
Lack of fit	20.58	5	4.11	1.64	Significant
Pure error	5.03	2	2.51		
Cor total	118.55	10			
R ²	0.7839				
R ² adj	0.6913				
Hemicellulose conversion					
Regression	151.77	4	37.94	23.55	Significant
Residual	9.6	6	1.61		
Lack of fit	5.31	4	1.32	0.61	Significant
Pure error	4.35	2	2.17		
Cor total	161.44	10			
R ²	0.9401				
R ² adj	0.9002				

Table S3. ANOVA for pretreatment using [Etid][Lac]

	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean square	F value	
Lignin removal					
Regression	863.46	5	172.69	33.79	Significant
Residual	25.55	5	5.11		
Lack of fit	24.94	3	8.31	27.42	Not significant
Pure error	0.60	2	0.30		
Cor total	889.01	10			
R ²	0.9712				
R ² adj	0.9425				
Cellulose conversion					
Regression	747.07	4	186.76	59.54	Significant
Residual	18.82	6	3.13		
Lack of fit	16.34	4	4.08	3.30	Significant
Pure error	2.48	2	1.23		
Cor total	765.89	10			
R ²	0.9754				
R ² adj	0.9590				
Hemicellulose conversion					
Regression	66.33	1	66.33	3.36	Not significant
Residual	243.54	9	27.06		
Lack of fit	225.31	7	32.18		
Pure error	18.23	2	9.11		
Cor total	309.88	10			
R ²	0.2140				
R ² adj	0.1267				

Table S4. ANOVA for pretreatment using [2He][Lac]

	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean square	F value	
Lignin removal					
Regression	1292.04	3	430.68	23.97	Significant
Residual	125.79	7	17.97		
Lack of fit	118.06	5	23.61	6.11	Significant
Pure error	7.72	2	3.86		
Cor total	1417.83	10			
R ²	0.9112				
R ² adj	0.8732				
Cellulose conversion					
Regression	337.24	3	112.41	17.73	Significant
Residual	44.37	7	6.33		
Lack of fit	40.84	5	8.16	4.64	Significant
Pure error	3.52	2	1.76		
Cor total	381.61	10			
R ²	0.8837				
R ² adj	0.8339				
Hemicellulose conversion					
Regression	245.28	2	122.64	36.82	Significant
Residual	26.64	8	3.33		
Lack of fit	13.68	6	2.28	0.35	Significant
Pure error	12.96	2	6.47		
Cor total	271.92	10			
R ²	0.9020				
R ² adj	0.8775				

Figure S2. 3D surface plot for cellulose and hemicellulose conversion and lignin removal for time and temperature parameters using [Etid][Ac] in the pretreatment.

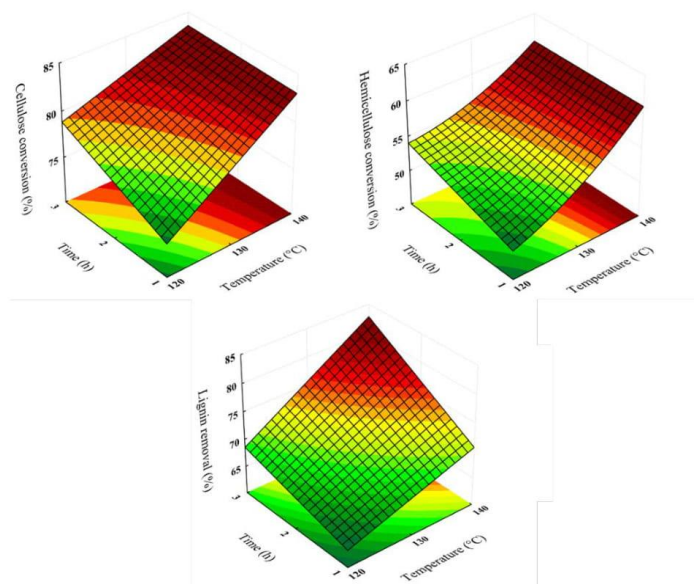


Figure S3. 3D surface plot for cellulose and hemicellulose conversion and lignin removal for time and temperature parameters using [Etid][Lac] in the pretreatment.

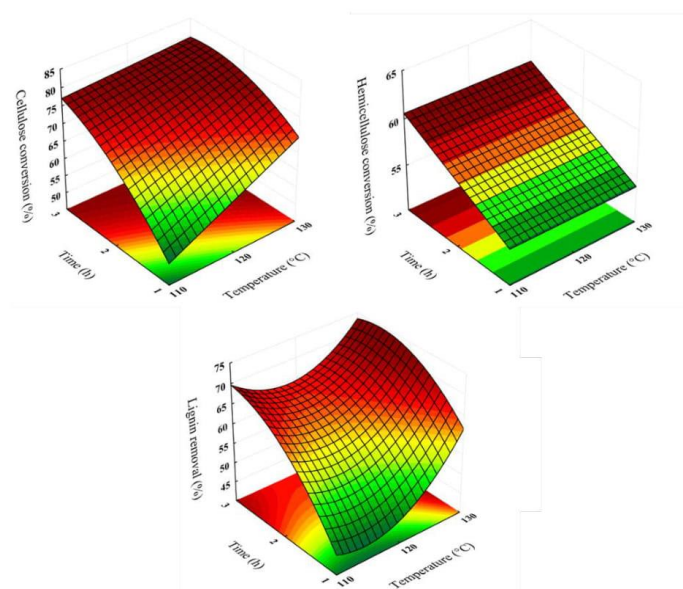
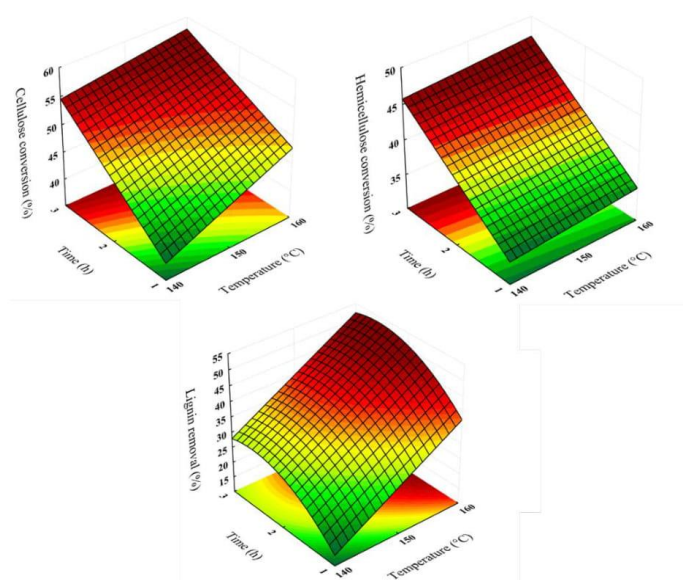


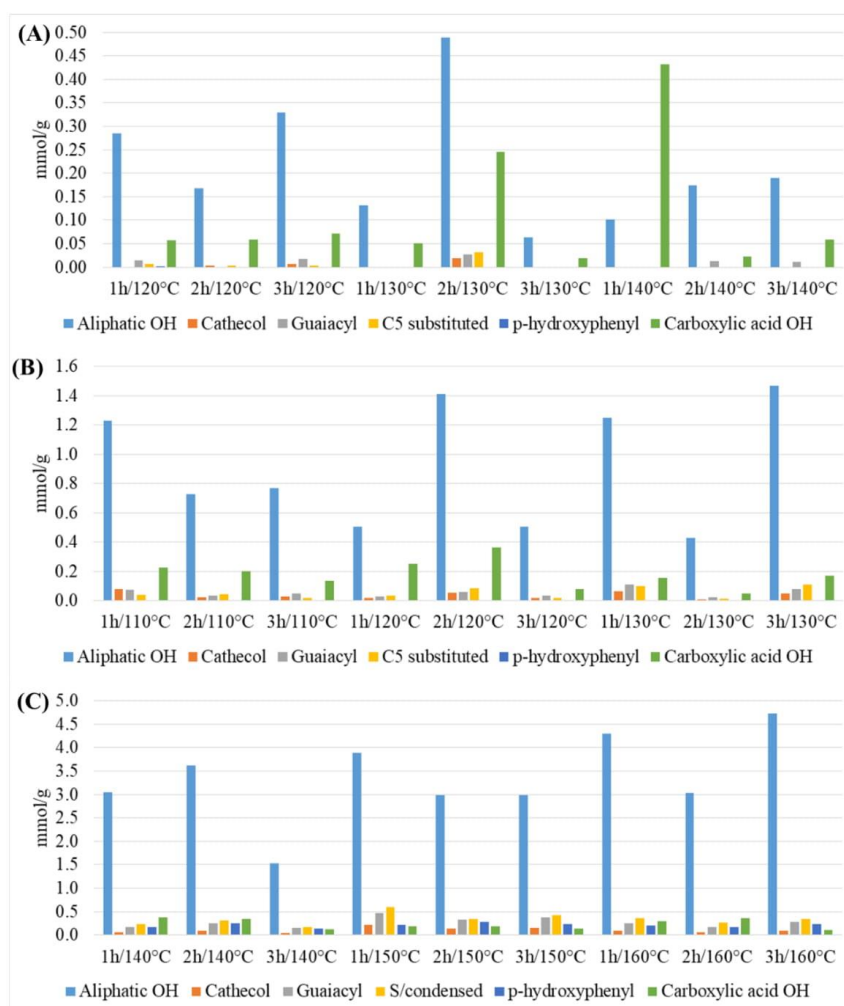
Figure S4. 3D surface plot for cellulose and hemicellulose conversion and lignin removal for time and temperature parameters using [2He][Lac] in the pretreatment.



S4. Lignin characterization

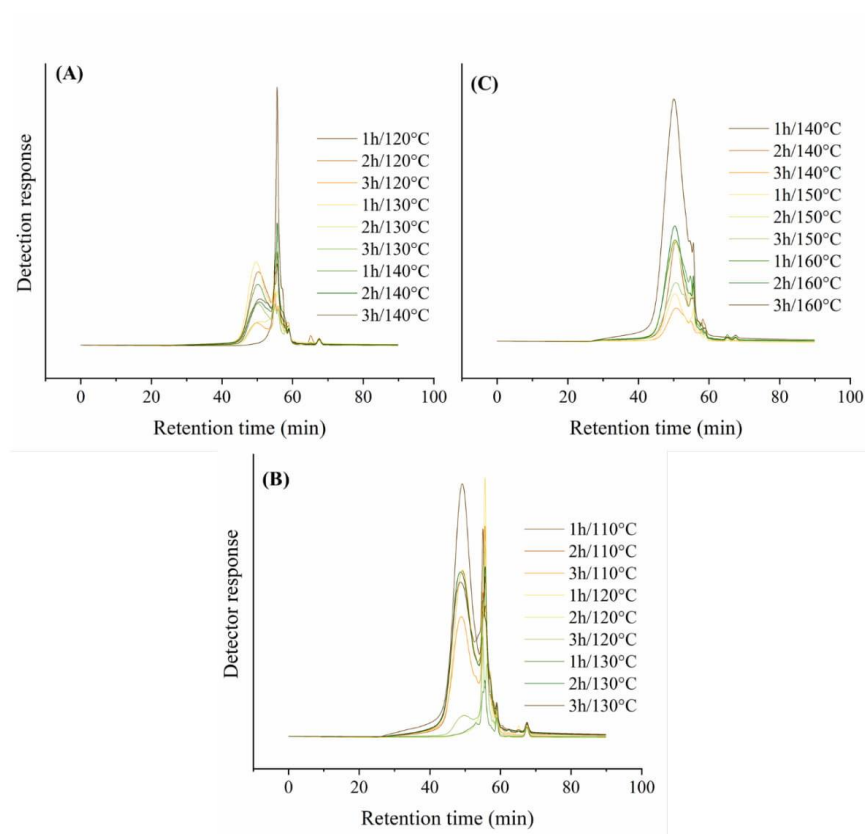
4.1 ^{31}P NMR

Figure S5. ^{31}P NMR analysis of lignin extracted with (a) [Etid][Ac], (b) [Etid][Lac] and (c) [2He][Lac] in the pretreatment



4.2 GPC

Figure S6. GPC analysis of lignin extracted with (a) [Etid][Ac], (b) [Etid][Lac] and (c) [2He][Lac] in the pretreatment



4.3 2D HSQC NMR

Figure S7. Structures obtained from 2D HSQC NMR analysis of lignin extracted with [Etid][Ac]. (a) 1h/120°C, (b) 2h/120°C (c) 3h/120°C (d) 1h/130°C, (e) 2h/130°C, (f) 3h/130°C (g) 1h/140°C and (h) 2h/140°C. Aliphatic (δ_C/δ_H 50-110/3.0-5.5 ppm, left) and aromatic (δ_C/δ_H 90-140/6.0-8.0 ppm, right) regions.

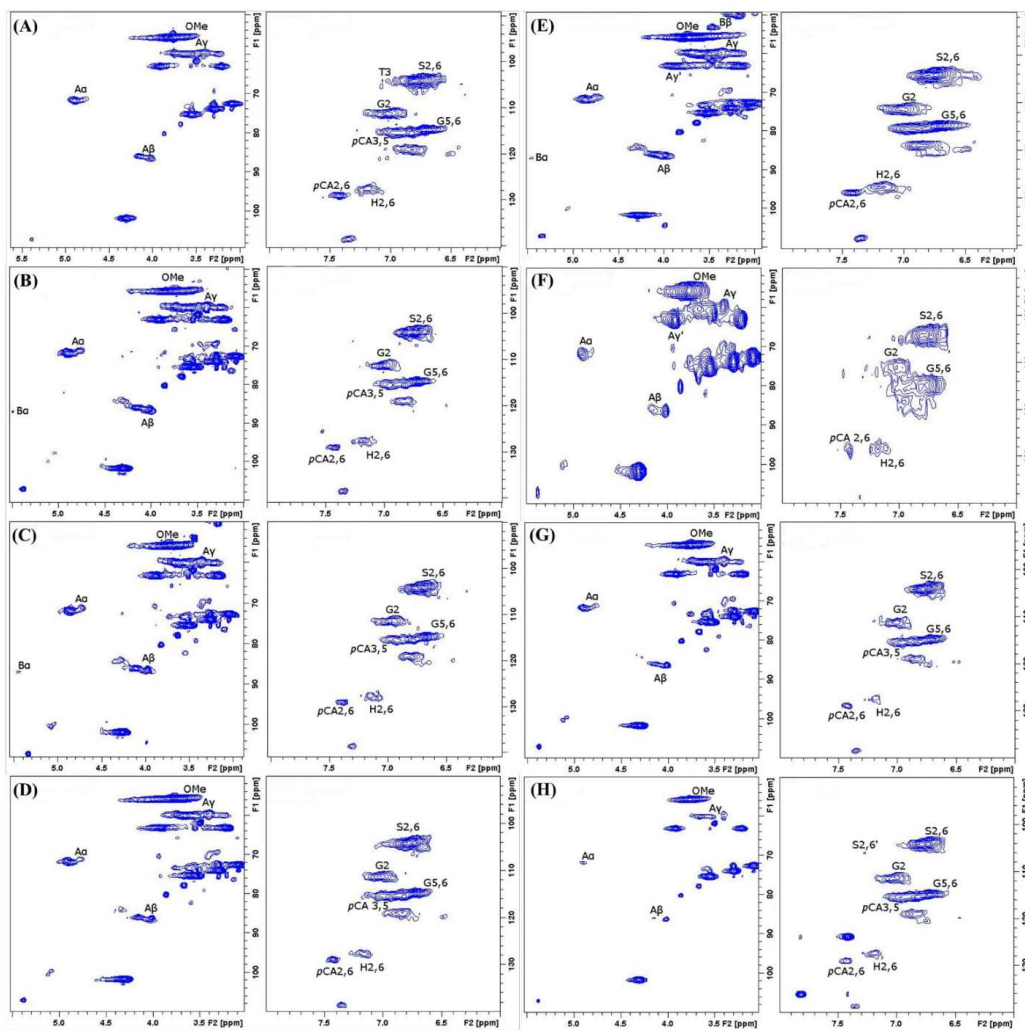


Figure S8. Structures obtained from 2D HSQC NMR analysis of lignin extracted with [Etid][Lac]. (a) 1h/110°C, (b) 2h/110°C (c) 3h/110°C (d) 1h/110°C, (e) 2h/110°C, (f) 3h/110°C (g) 1h/130°C and (h) 2h/130°C. Aliphatic ($\delta\text{C}/\delta\text{H}$ 50-110/3.0-5.5 ppm, left) and aromatic ($\delta\text{C}/\delta\text{H}$ 90-140/6.0-8.0 ppm, right) regions.

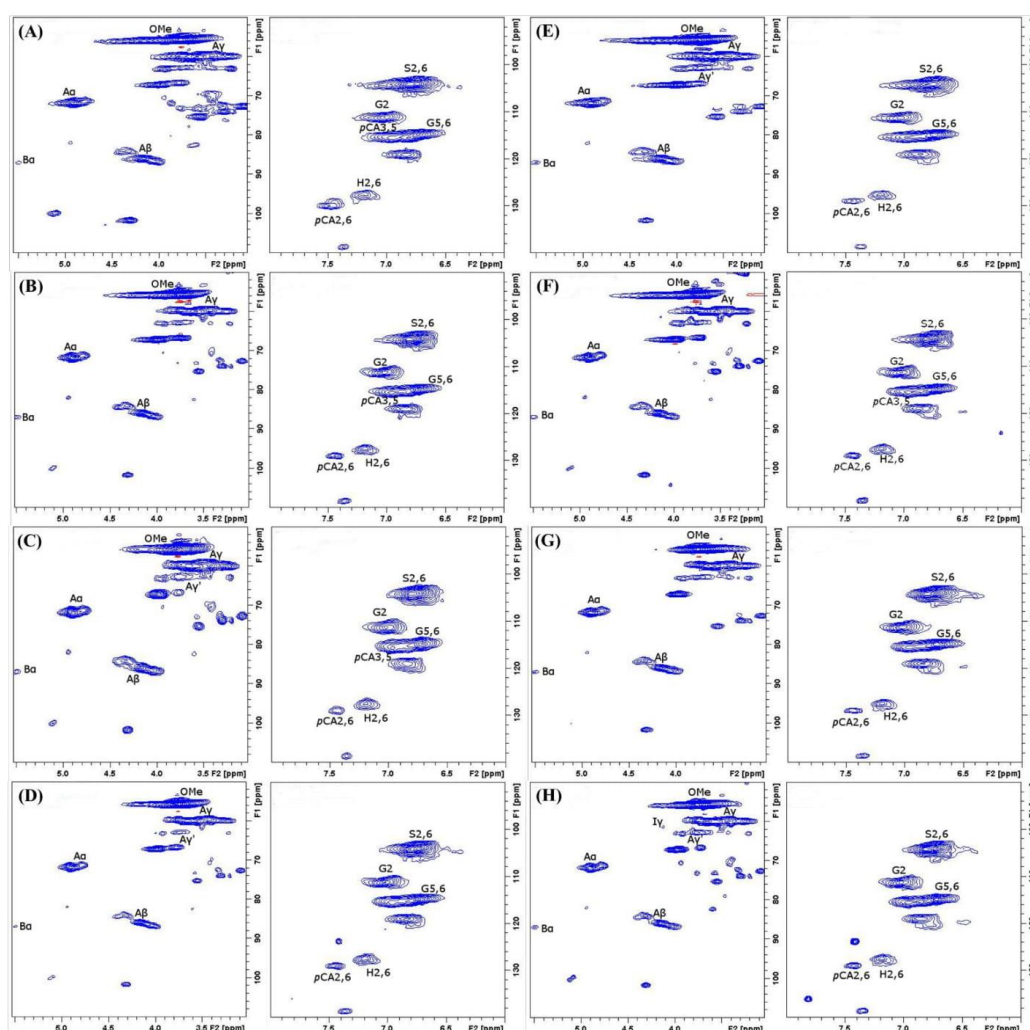


Figure S9. Structures obtained from 2D HSQC NMR analysis of lignin extracted with $[2\text{He}][\text{Lac}]$. (a) 1h/140°C, (b) 2h/140°C (c) 3h/140°C (d) 1h/150°C, (e) 2h/150°C, (f) 3h/150°C (g) 1h/160°C and (h) 2h/160°C. Aliphatic ($\delta\text{C}/\delta\text{H}$ 50-110/3.0-5.5 ppm, left) and aromatic ($\delta\text{C}/\delta\text{H}$ 90-140/6.0-8.0 ppm, right) regions.

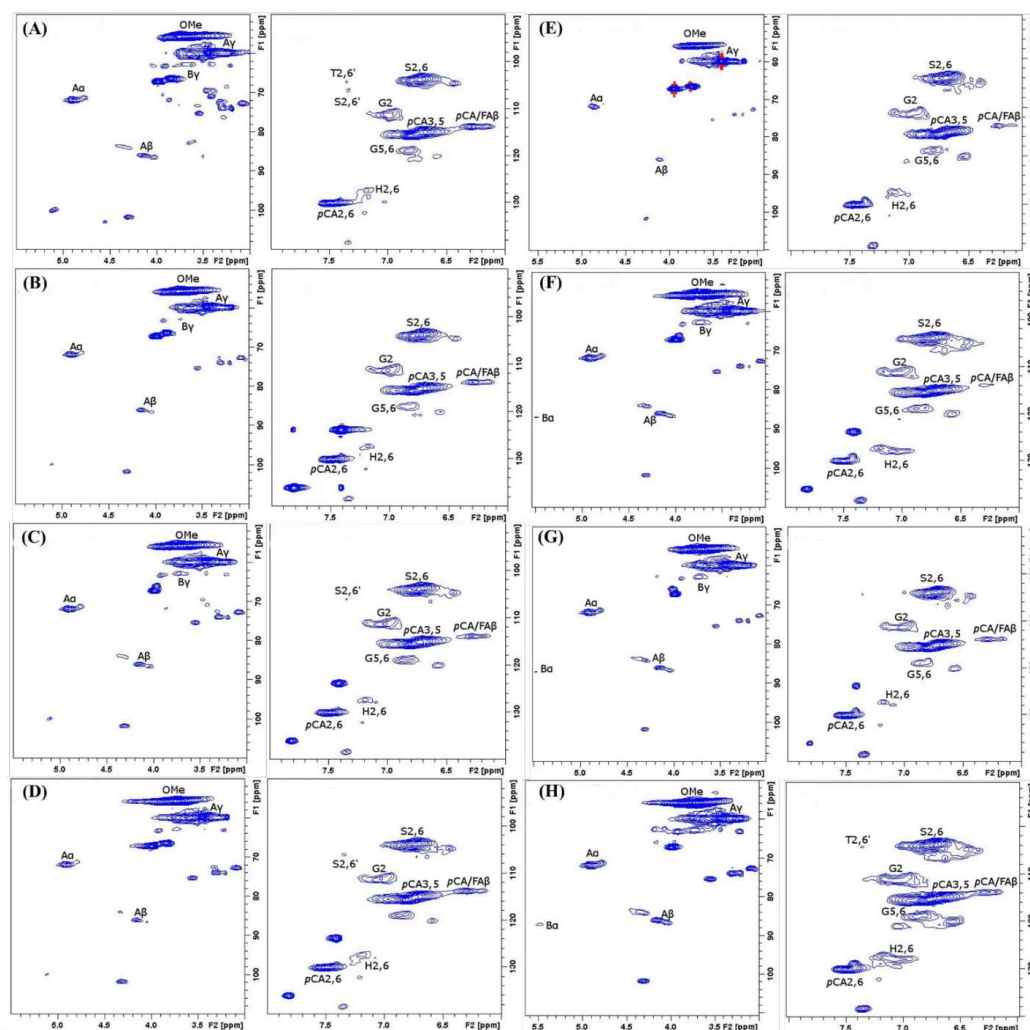


Figure S10. Representation of the main structures present in the PIL-recovered lignins as identified in the 2D HSQC NMR spectra. A: β -O-4-structures; A': β -O-4-structures with acylated (by acetate or pCA) g-OH; B: phenylcoumaran structures formed by β -5-coupling; pCA: p-coumarate moieties; FA: ferulate moieties; (esterified with hemicelluloses); pCA': p-coumarate amide; FA': ferulate amide; H: p-hydroxyphenyl units; G: guaiacyl units; S: syringyl units; T: Tricin end-groups; I: ρ -hydroxycinnamyl alcohol end-groups. The structures are colored to match the assigned contours in the 2D HSQC NMR spectra in Figure S7-9.

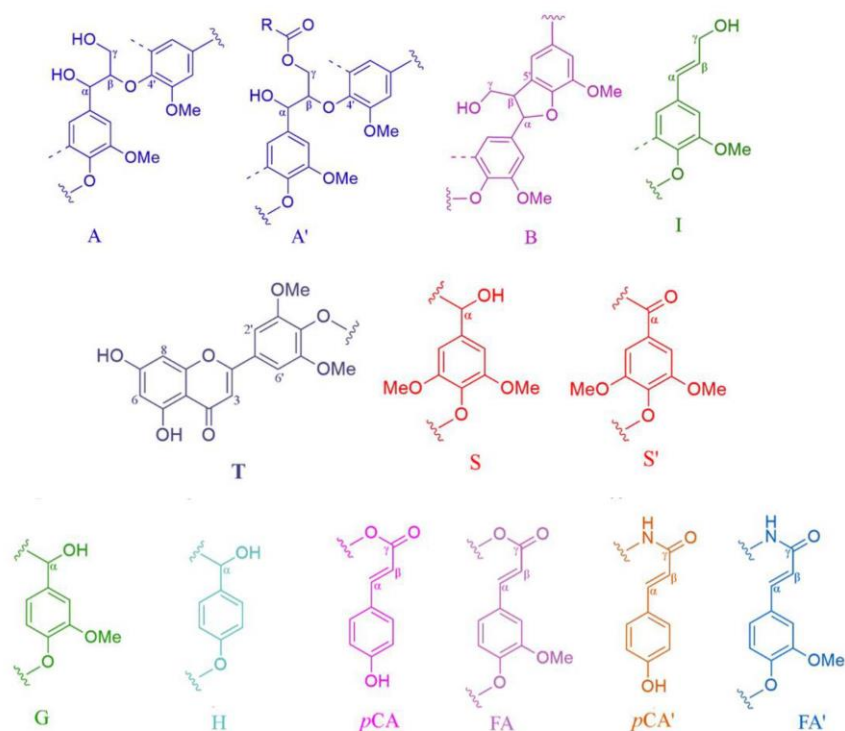


Table S5. Assignments of the lignin ^{13}C - ^1H correlation peaks in the 2D HSQC NMR spectra of the lignins extracted from PILs pretreatments.

Label	$\delta\text{C}/\delta\text{H}$ (ppm)	Assignment
Methoxyl	55.6/3.71	C-H in methoxyls
A γ	59.3-60.0/3.6	C γ -H γ in β -O-4' substructures (A)
I γ	60.8/4.11	C γ -H γ in cinnamyl alcohol end-groups (I)
B γ	62.9/3.4-3.7	C γ -H γ in phenylcoumaran substructures (B)
A γ '	62.9-63.04/3.45-3.9	C γ -H γ in γ -acylated β -O-4' substructures (A')
A α /A α '	70.6-71.63/4.88	C α -H α in β -O-4' substructures (A)
A β (G) ou (S)	83.9/4.27 85.4-86.0/4.08	C β -H β in β -O-4 substructures (A) linked to a G ou S unit
B α	86.30/5.44	C α -H α in β -5' phenylcoumaran substructures (B)
T $_{2,6}$ '	103.9-7.3	C $_{2,6}$ -H $_{2,6}$ ' in tricin units (T')
S $_{2,6}$	103.9/6.69-6.78 104.09/6.68	C $_{2,6}$ -H $_{2,6}$ in syringyl units (S)
G $_2$	109.7-110.5-111.2/6.99-7.03	C $_2$ -H $_2$ in guaiacyl units (G)
pCA β /FA β	113.2/6.2	C β -H β in p-coumarate (pCA) and ferulate (FA)
G $_{5,6}$	114.96-115.4-118.6/6.75-6.9	C $_{5,6}$ -H $_{5,6}$ in guaiacyl units (G)
pCA $_{3,5}$	115.7/6.9-6.77	C $_{3,5}$ -H $_{3,5}$ in p-coumaric acid (pCA)
H $_{2,6}$	126.5-127.2/ 7.05-7.13	C $_{2,6}$ -H $_{2,6}$ in p-hydroxyphenyl units (H)
pCA $_{2,6}$	128.9/7.42	C $_{2,6}$ -H $_{2,6}$ in p-coumarate (pCA)
Fa α '/pCA α '	138.5/7.29	Feruloyl amide and pCA amide
pCA α '/FA α '	138.3/7.30	C α '-H α ' in p-coumarate amide and ferulate amide

$pCA\alpha/FA\alpha$	144.5/7.5	C α -H α in p-coumarate (pCA) and ferulate (FA)
Polysaccharide cross-peak signals		
Xn	72.8/3.5	C ₂ -H ₂ in β -d-xylopyranoside
	74.1/3.25	C ₃ -H ₃ in β -d-xylopyranoside
	70.7/3.4	C ₅ -H ₅ in β -d-xylopyranoside

- Inserção da C900 formula completa para os artigos Structural characterization of sugarcane lignins extracted from different protic ionic liquid pretreatments⁸⁵ e Influence of of chain length in protic ionic liquids on physicochemical and structural features of lignins from sugarcane bagasse¹⁶⁷.

Lignina	C900 formula
[Eti][Ac]	$C_{900}H_{817}O_{178}(OCH_3)_{92}$
[Eti][For]	$C_{900}H_{792}O_{23}(OCH_3)_{315}$
[Eti][Lac]	$C_{900}H_{953}O_{15}(OCH_3)_{373}$
[Eti][Mal]	$C_{900}H_{390}O_{64}(OCH_3)_{55}$
[Etid][Ac]	$C_{900}H_{1231}O_{512}(OCH_3)_{65}$
[Etid][For]	-
[Etid][Lac]	$C_{900}H_{814}O_9(OCH_3)_{408}$
[Etid][Mal]	$C_{900}H_{1160}O_{664}(OCH_3)_{63}$
[2He][Ac]	$C_{900}H_{1000}O_{254}(OCH_3)_{146}$
[2He][For]	$C_{900}H_{393}O_{280}(OCH_3)_{48}$
[2He][Lac]	$C_{900}H_{842}O_{204}(OCH_3)_{180}$
[2He][Mal]	$C_{900}H_{509}O_{112}(OCH_3)_{143}$
[But][Ac]	$C_{900}H_{1047}O_{0,7}(OCH_3)_{160}$
[But][For]	$C_{900}H_{1138}O_{24}(OCH_3)_{192}$
[But][Lac]	$C_{900}H_{977}O_{37}(OCH_3)_{28}$
[But][Mal]	$C_{900}H_{1059}O_{52}(OCH_3)_{175}$
[Hex][Ac]	$C_{900}H_{1324}O_{228}(OCH_3)_{18}$
[Hex][For]	$C_{900}H_{1241}O_{59}(OCH_3)_{135}$
[Hex][Lac]	$C_{900}H_{1009}O_{74}(OCH_3)_{106}$
[Hex][Mal]	$C_{900}H_{1080}O_9(OCH_3)_{101}$

APÊNDICE B - Análises dos LIPs

- Karl-Fischer

A determinação da quantidade de água foi realizada no Laboratório Nacional de Biorenováveis (LNBR) utilizando o titulador automático Karl Fischer (Metrohm, Titrando-890) com software *tiamo*. O método consiste na titulação de uma quantidade de aproximadamente 0,0300 g de amostra em metanol com o reagente Karl Fischer, que é uma solução contendo iodo, dióxido de enxofre e amina.

- pH

Utilizou-se pHmetro (Digimed, DM-22) utilizado em temperatura ambiente. A análise foi realizada no LEPFE e foi utilizada uma quantidade de aproximadamente 5 mL de cada amostra.

- TGA

A análise para LIPs possui uma dinâmica com taxa de aquecimento de 10°C/min a inserção da derivada da curva de perda de massa ($d(\text{massa})/dt$) em função de temperatura. A partir do TGA é possível determinar também a temperatura onset (T_{onset}), encontrada pelo início da perda de massa, e que corresponde ao valor teórico da temperatura de extrapolação do evento. Embora os experimentos de TGA superestimem a estabilidade térmica, as temperaturas de decomposição são frequentemente úteis como indicadores comparativos da estabilidade térmica de curto prazo dos LIPs.

Foi utilizada uma faixa de 25 a 400°C, com taxa de aquecimento de 10°C/min e vazão de 50mL/min, sob uma atmosfera inerte de nitrogênio e usando analisador termogravimétrico (Shimadzu, TGA-50M). A amostra de aproximadamente 15 mg foi pesada em balança microanalítica (precisão de 0.1µg) (Mettler Toledo, MX5). As análises foram realizadas no Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC) da FEQ/UNICAMP e no LNBR/CNPEM.

- Acidez, basicidade e net-basicity

As otimizações geométricas dos LIPs foram realizadas com base em Sun et al. (2017)¹⁵². Cálculos de frequência foram realizados para verificar se as estruturas calculadas correspondiam a mínimos de energia. (MM2) usando ChemDraw Professional (versão de teste). No presente estudo, a previsão dos valores de acidez, basicidade e net-basicity foram baseadas

em descritores globais, como potencial químico (μ) (Eq. 1) e dureza química (η) (Eq. 2), e a eletrofilicidade foi calculada das equações padrão de Sun et al (2017).¹⁵²

$$\mu = \frac{E_{LUMO} + E_{HOMO}}{2} \quad (1)$$

$$\eta = \frac{E_{LUMO} - E_{HOMO}}{2} \quad (2)$$

Onde E_{LUMO} é a energia do orbital molecular mais baixo desocupado e E_{HOMO} é a energia do orbital molecular mais ocupado. Esses descritores foram usados para derivar os valores de basicidade molecular, acidez e net-basicity para os LIPs.

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

- Determinação do teor de umidade

O teor de umidade foi calculado utilizando o analisador de umidade por infravermelho, (GEHAKA, IV2000). A balança foi tarada e são pesados aproximadamente 0,5 g do material e determinada a 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 Eq. 3:

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

- 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. Inicialmente foram pesados 2,0 g de amostra considerando a umidade (M_2) em cadinhos previamente secos e pesados (M_1). Em seguida os cadinhos foram inseridos na mufla (EDG, F7000-10P-LCD) com calcinação programada em três rampas de aquecimento, 105°C por 18 min; 250°C por 37 min; e 575°C por 200 min. Por fim, após resfriamento, o material foi transferido para uma estufa e mantido por 24 h. Os cadinhos foram transferidos para um dessecador e então a massa final dos cadinhos (M_3) foi devidamente anotado para posterior cálculo. O teor de cinzas foi calculado a partir da Eq. 4:

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

- 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”.²⁴⁰

Foram pesados 3,0 gramas de bagaço já previamente moídos a 0,5mm (em base seca) (M_1) dentro de cartucho feito a partir de papel de filtro. O cartucho foi inserido em Soxhlet (Marconi, MA 188) e foram adicionados ciclohexano e etanol (1:1) em balão de vidro para proceder a lavagem por aproximadamente 8 h. Após o uso dos solventes, foi realizada processos de extração com água até que em torno do cartucho de extração se torne incolor. O banho de refrigeração (Marconi, Ma-184) para circulação da água nos condensadores do sistema é

ajustado para 10°C e as placas de aquecimento do Soxhlet são ajustadas para manter o ciclo de extração. Por fim, o sólido do cartucho foi seco em estufa (Marconi, MA-35) a 105°C até a obtenção de uma massa constante (M_2).

Para o cálculo de extrativos é utilizado a Eq. 5:

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

- Hidrólise ácida: Determinação de carboidratos, lignina total, grupo acetil, furfural e 5-hidroximetilfurfural

As seguintes análises foram baseadas nos procedimentos padrões do NREL “Determination of Acid Soluble Lignin Concentration Curve by UV-Vis-Spectroscopy”²⁴¹, “Determination of Acid-Insoluble Lignin in Biomass”, “Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass”²⁴², “Determination of Sugars, Byproducts and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples”²⁴³, nas normas ASTM “Determination of Carbohydrates in Biomass by High Performance Liquid Chromatography”²⁴⁴ e “Test Method for the Determination of Acid-Insoluble Residue in Biomass”²⁴⁵.

Para a realização dessa etapa a amostra deve estar livre de extrativo e na granulometria de 0,08mm. Foram pesados 0,3 g de amostra de bagaço em tubos de ensaio e adicionados 3,0 mL de ácido sulfúrico a 72% (m/m) em cada tubo. Os tubos foram encubados em um banho termostático (Marconi, Ma-184) a 30°C por 1 h.

Após este tempo, foram adicionados 84 mL de água destilada e os tubos foram fechados e autoclavados a 121°C por 1 hora. Posteriormente, os frascos foram retirados da autoclave e resfriados a temperatura ambiente para serem filtrados à 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.

- Determinação de lignina solúvel

A determinação da lignina solúvel foi determinada por medida de absorbância em espectrofotômetro UV-visível em cubeta de quartzo a 280nm. Cada hidrolisado foi diluído de acordo com sua coloração. As Eq. 6, 7 e 8 são utilizadas para o cálculo de teor de lignina solúvel.

$$\text{Teor de lignina solúvel } (\%) = \left(\frac{C_{Is} \cdot V_{f,FD}}{M_a} \right) \times \left(1 - \frac{\text{Extrativos}}{100} \right) * 100 \quad (6)$$

$$C_{ls} = (41,87 \cdot (A_T - A_{PD}) - 0,3279) \cdot 10^{-3} \quad (7)$$

$$A_{PD} = C_1 \varepsilon_1 + C_2 \varepsilon_2 \quad (8)$$

Onde:

A_T - Absorbância da solução de lignina junto com os produtos de degradação;

A_{PD} - Absorbância dos produtos de decomposição dos açúcares (furfural e HMF), cujas concentrações C_1 e C_2 serão determinadas previamente por HPLC e ε_1 e ε_2 são as absorvidades de furfural e HMF (146,85 e 114,00 L/g.cm), determinadas experimentalmente²⁴¹.

C_{ls} - Concentração de lignina solúvel (g/L);

V_f - Volume do hidrolisado filtrado (L);

FD - Fator de diluição do hidrolisado;

M_a - Massa do bagaço utilizando na hidrólise (g).

- Determinação de lignina klason (insolúvel)

O material retido no cadinho de filtração na hidrólise ácida foi lavado com água destilada. Após esse procedimento, o material retido no filtro foi colocado em uma estufa (Marconi, MA-35) a 100°C até massa constante para pesar.

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, e assim descontado do valor de lignina insolúvel obtida. O cálculo do teor de lignina insolúvel segue na Eq. 9:

$$\text{Teor de lignina insolúvel (\%)} = \left(\frac{M_{c+l} - M_c}{M_a} \right) \times \left(1 - \frac{\text{Extrativos}}{100} \right) \times 100 - \text{cinzas (\%)} \quad (9)$$

Onde:

M_{c+l} - Massa do cadinho + lignina insolúvel seca (g);

M_c - Massa do cadinho (g);

M_a - Massa da amostra seca (g).

- Determinação de carboidratos e ácidos orgânicos

A degradação da celulose por hidrólise ácida pode levar a produção de glicose, celobiose e 5-hidroxi-metil-furfural; a degradação da hemicelulose pode levar a produção de xilose, arabinose, furfural e ácido acético. A degradação dos compostos dos grupos acetila levará a formação de ácido acético. Os açúcares celobiose, xilose, glicose e arabinose e os ácidos acético e fórmico presentes no filtrado da hidrólise ácida têm seus teores determinados por HPLC.

As concentrações foram obtidas utilizando a Eq. 8 e 9 e os fatores de conversão usados foram glicose 0,9, celobiose 0,95, xilose 0,88, arabinose 0,88, ácido acético 0,72, ácido fórmico 3,52, ácido glicurônico 0,91, furfural 1,37 e HMF 1,29.

$$\text{Celulose}_{(\%)} = \left(\frac{(C_{\text{glic}} \cdot \text{FC} + C_{\text{celob}} \cdot \text{FC} + C_{\text{HMF}} \cdot \text{FC} + C_{\text{ác.fór}} \cdot \text{FC}) \cdot V_{\text{filtrado}}}{M_1} \right) \times \left(1 - \frac{\text{Extrativos}}{100} \right) \times 100 \quad (8)$$

$$\text{Hemicelulose}_{(\%)} = \left(\frac{(C_{\text{xil}} \cdot \text{FC} + C_{\text{arab}} \cdot \text{FC} + C_{\text{furf}} \cdot \text{FC} + C_{\text{ác.acét}} \cdot \text{FC} + C_{\text{ác.gli}} \cdot \text{FC}) \cdot V_{\text{filtrado}}}{M_1} \right) \times \left(1 - \frac{\text{Extrativos}}{100} \right) \times 100 \quad (9)$$

Onde:

C - Concentração dos compostos de degradação quantificado por HPLC (g/L);

FC – Fator de conversão^{246,247};

V_{filtrado} - Volume do hidrolisado filtrado (L);

M₁ - Massa do bagaço seco utilizando na hidrólise (g).

- Quantificação de compostos para caracterização química, hidrólise e fermentação por HPLC

As análises de quantificação foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) (Agilent Technologies, Infinity 1260) com detector de índice de refração IR e DAD UV-Vis.

Em HPLC foi utilizada duas opções de análise, a primeira para açúcares, etanol, glicerol, xilitol e ácidos orgânicos, e a segunda para inibidores (HMF e furfural). A primeira, foi utilizando coluna BioRad Aminex, HPX87H, equipada com pré-coluna no 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; Temperatura de RID e forno da coluna de 35°C para ambas. Já a segunda análise foi utilizando uma coluna Nova-Pak C18, 4 µm (Waters) e

detector DAD. As condições de análise são: Volume de injeção de 20 μ L; Fase móvel de acetonitrila/água (1:8 com 1% de ácido acético) desgaseificada; Taxa de fluxo de 0,8 mL/min; Temperatura de DAD e forno da coluna são ambientes e 30°C, respectivamente; Comprimento de onda de 280 nm. Todas as amostras foram filtradas utilizando membrana de nylon com poros de 0,22 μ m (JetBiofil).

APÊNDICE D – Procedimento de pré-tratamento, hidrólise e fermentação

- Pré-tratamento

Os pré-tratamentos 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. Antes do reator ser alimentado e submerso no banho, o bagaço foi previamente homogeneizado com o LI e a água. 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 aos mesmos adicionados 10 mL água/g bagaço *in natura* para a dissolução do LIP. Posteriormente, a biomassa foi prensada manualmente para retirada do licor de pré-tratamento. O licor foi armazenado em frasco com tampa e refrigerado para posterior precipitação de lignina. Já a fração sólida foi lavada com 100 mL água/g bagaço *in natura* para remoção dos componentes solúveis. Depois de lavado, o bagaço pré-tratado foi seco em temperatura ambiente e dividido em duas partes. Uma delas foi para análise de composição química (Apêndice C) e a outra parte foi utilizada posteriormente na hidrólise enzimática.

O rendimento do pré-tratamento foi calculado de acordo com a Eq. 1.

$$\text{Rendimento}_{(\%)} = \frac{M_{sf}(\text{g}) \times 100}{M_{si}(\text{g})} \quad (1)$$

Onde:

M_{si} – Massa do bagaço em base seca (g) que entra no reator (antes do pré-tratamento)

M_{sf} – Massa do bagaço final obtido após o pré-tratamento.²⁴⁸

Após o pré-tratamento e a caracterização do material pré-tratado é possível calcular as frações (celulose, hemiceluloses e lignina) solubilizadas durante a etapa (Eq. 2).

$$\text{Solubilização } (\%) = \frac{100 \times (1 - C_2 \times M_2)}{C_1 \times M_1} \quad (2)$$

Onde:

C_1 – Porcentagem das frações (celulose, hemiceluloses e lignina) no bagaço *in natura*;

C_2 – Porcentagem das frações (celulose, hemiceluloses e lignina) no bagaço pré-tratado;

M_1 – Massa de bagaço seco utilizado para o pré-tratamento (g);

M_2 – Massa de bagaço seco após pré-tratamento (g).

- Hidrólise enzimática

A enzima utilizada no procedimento de hidrólise possuía uma atividade de aproximadamente 112,63 FPU/mL. A atividade enzimática da enzima é determinada de acordo com a metodologia de Ghose (1987)²⁴⁹, Wood et al. (1988)²⁵⁰ e Adney e Baker (2008)²⁵¹, conforme recomendado pela IUPAC. Essas análises foram realizadas no LEPFE.

A atividade da celulase foi determinada como unidade de papel de filtro (FilterPaper 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 min. Após o final da reação é aplicado o método DNS²⁴⁸ 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 Eq. 12²⁴⁹.

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

$$\text{FPU/mL} = \frac{0,037}{[\text{fator de diluição da enzima}]} \quad (3)$$

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 min de reação.

A hidrólise enzimática foi realizada em um tampão citrato com a devida compensação no volume da solução tampão com relação ao percentual de água presente no bagaço pré-tratado. As amostras coletadas foram resfriadas para posterior quantificação em HPLC (Apêndice C).

Os resultados de hidrólise enzimática foram baseados no cálculo de conversão de carboidratos em açúcares fermentescíveis, conforme descrito na Eq. 14.

$$\text{Conversão (\%)} = \frac{C_1 \times V_1 \times FC \times 100}{M_1 \times \frac{C_2}{100}} \quad (4)$$

Onde:

C_1 – Concentração de açúcar na hidrólise enzimática (g/L);

V_1 – Volume reacional na hidrólise enzimática (L);

M_1 – Massa seca inicial de bagaço na hidrólise enzimática (g);

C_2 – Concentração de carboidrato após o pré-tratamento;

FC – Fator de conversão dos polissacarídeos, sendo glicose 0,9 e xilose 0,88.

- Fermentação

Propagação foi baseada em duas etapas^{235,252}, primeiro, pré-inóculo, a levedura estoque foi transferida para o meio contendo (g/L) extrato de levedura (10); peptona (20); e glicose (20) e mantidos em shaker (Marconi, MA-830) por 24 h, 30°C e 200 rpm. Nesta etapa foram usados erlenmeyers de 250mL com 100 mL de meio.

A segunda etapa, inóculo, 10% (v/v) do meio anterior foi adicionado ao meio contendo (g/L): extrato de levedura (5.0); peptona (5.0); glicose (1.32); xilose (12); KH_2PO_4 (2.0); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1.0); ureia (2.3) e mantido em shaker por 24 h, 30°C e 200 rpm. Os erlenmeyers usados foram de 500 mL com 150 mL de meio.

Por fim, a propagação de célula^{235,253} foi realizada em erlenmeyer de 1000 mL contendo 250 mL de meio com a seguinte composição (g/L): 10% (v/v) de meio de inoculação anterior, extrato de levedura (3.0); peptona (5.0); ureia (5.0); glicose (30.0); and KH_2PO_4 (2.0) com um pulso de glicose (30.0) em 24 h em shaker por 48 h, 30 °C e 200 rpm. Depois do tempo decorrido as células foram centrifugadas a 4.000 rpm por 20 min and re-suspendedidas em um mínimo necessário de água destilada estéril.

A amostras da fermentação eram contrifugadas (4.000 rpm por 5 min) e o sobrenadante era destinado a análise de HPLC para quantificação de etanol, glicose, xilose, arabinose, acido acético, acido láctico, glicerol e xilitol (Apêndice C), enquanto a células eram resuspendida duas vezes em água destilada para retirada de qualquer resíduo e seca em forno a 80 °C por 24 h para determinar sua concentração.

A fermentação teve sua eficiência avaliada pelo rendimento (η) na Eq. 5; Produtividade volumetrica do etanol (Q_P) na Eq.6; conversão de açúcar em etanol ($Y_{P/S}$) and e biomassa celular ($Y_{X/S}$) de acordo com as Eq. 7 e 8, respectivamente.

$$\eta = \frac{Y_{P/S}}{0.511} \times 100 = \frac{P_f - P_0}{S_0 - S_f} \times \frac{100}{0.511} \quad (5)$$

$$Q_P = \frac{P_f - P_0}{t_f} \quad (6)$$

$$Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S_f} \quad (7)$$

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S_f} \quad (8)$$

APÊNDICE E – Caracterização de lignina

- Precipitação da lignina

A partir dos licores de pré-tratamento obtido no Apêndice D, a fração líquida foi centrifugada (Nova Técnica, NT810, Brasil) por 10 min a 4.000 rpm para obtenção da fração de lignina. As amostras foram lavadas com água para retirada de resíduos de LIP e secas em estufa (Marconi, MA35, Brasil) a 40°C para posterior análise de sua estrutura.

- Py-GC-MS

A análise de pirólise das amostras (aproximadamente 100 µg) foi realizada com um pirolisador de micro-forno EGA/PY-3030S (Frontier Laboratories Ltd.) conectado a um cromatógrafo a gás Shimadzu CG2010 Plus usando uma coluna capilar de sílica fundida ultra liga (30 m x 0,25 mm i.d., espessura de filme de 0,25 µm) e um detector seletivo de massa Shimadzu QP-2010 Ultra (EI a 70 eV). A pirólise foi realizada a 500 °C e a temperatura do forno foi programada de 45°C (4 min) a 300°C (20 min) a 2°C/min. O hélio foi o gás transportador usado (1 mL/min). Os compostos foram identificados por comparação com as bibliotecas Wiley e NIST (NIST MS Search Program Version 2.3). As áreas dos picos molares foram calculadas para produtos de degradação da lignina e as áreas somadas foram normalizadas em porcentagem e expressas pelas unidades S, G e H.

- 2D HSQC NMR

Parte das amostras foram realizadas no LNBio e outra parte no ORNL, portanto neste tópico estão disponíveis duas metodologias de análise das ligninas.

Primeiro os espectros foram adquiridos nos espectrômetros Agilent DD2 e Agilent Inova 600 MHz (Califórnia, EUA), do LNBIO/CNPq, equipados com sondas de ressonância tripla fria usando a sequência de pulso padrão (“hsqcetgpsisp.2”). Resumidamente, cerca de 30 mg de amostra de lignina foram dissolvidas em 0,65 mL de DMSO-d₆. Os experimentos de HSQC foram adquiridos com larguras espectrais de 8012,8 Hz (de 16 a 0 ppm) e 25133,3 Hz (de 165 a 0 ppm) para as dimensões ¹H e ¹³C. O processamento usou a apodização gaussiana típica combinada na dimensão de ¹H e a apodização cosseno-sino ao quadrado na proporção ¹³C. Antes da transformação de Fourier, as matrizes de dados eram preenchidas com zero até 1202 pontos na dimensão ¹³C, o número de varredura foi de 16 e o tempo de atraso foi de 1,0s. Uma análise semiquantitativa foi realizada usando o software NMRViewJ.

As amostras de lignina realizadas no ORNL foram adquiridas em um Bruker Avance III HD 500MHz (Massachusetts, EUA) de acordo com uma sequência de pulso Bruker (hsqctgpspsi2.2) usando criosonda de N₂ (BBO ¹H e ¹⁹F-5 mm) sob as seguintes condições: Largura do espectro de 166 ppm na dimensão F1 (¹³C) com 256 pontos de dados (tempo de aquisição 6,1 ms), largura do espectro de 12 ppm na dimensão F2 (¹H) com 1024 pontos de dados (tempo de aquisição 85,2 ms), um atraso de 1,0s, um J_{C-H} de 145Hz e 128 varreduras, conforme publicado anteriormente na literatura.^{254,255} As amostras foram preparadas dissolvendo 40mg de lignina em 0,5 mL de DMSO-d₆. A análise semiquantitativa foi realizada usando software Bruker's Topspin 3.6.1.

As relativas unidades e interunidades das amostras de ligninas foram estimadas usando a integração dos picos S_{2,6}, G₂, H_{2,6}, pCA_{2,6} e FA₂ (só foi considerado a posição dois nas estruturas) e a posição α of β-O-4, β-5 e β-β quando presente nos espectros. Todas as unidades e ligações, bem como pCA e FA foram referidas como 100 unidades de lignina aromática (S+G+H=100)

- ³¹P NMR

A análise de grupo hidroxila das amostras de lignina foram baseadas na metodologia publicada por Pu et al. (2011)²⁵⁶ e Meng et al. (2019)²⁵⁷. ³¹P NMR foi baseado em uma solvente de RMN previamente preparado contendo piridina anidra e clorofórmio-d (1,6:1,0 v/v), agente relaxante (acetilacetato de cromo (III)), e um padrão interno *Endo*-N-hidroxi-norborneno-2,3-dicarboximida (NHND). Aproximadamente 15mg de lignina foi previamente seca em forno a vácuo a 40°C, dissolvida no solvente de RMN (0,5mL) e 2-cloro-4,4,5,5-tetrametil- 1,3,2-dioxafosfolano (TMDP) (0,05mL). O espectro foi obtido usando um Bruker 500MHz com detecção de porta inversa, largura do pulso de 90° e atraso de pulso de 25s. A análise do espectro foi realizada usando MestReNova.

- GPC

A massa molar média numérica (M_n), a massa molar média ponderal (M_w) e a polidispersidade (PDI) das ligninas foram determinados de acordo com Brandt et al. (2015)¹¹⁵. Parte das ligninas foram analisadas no GPC com processo de acetilação, isso ocorreu devido ao local de parceria onde foi realizada a análise, Imperial College e ORNL.

Inicialmente, o procedimento realizado sem acetilação foi usando um Agilent 1260 Infinity HPLC (Califórnia, EUA) equipado com um conjunto de colunas Viscotek (AGuard,

A6000M e A3000M, da Malvern Panalytical, Almelo, Holanda) acoplado a um detector de índice de refração (RID). DMSO contendo LiBr (1,0 g/L) foi usado como fase móvel a uma taxa de fluxo de 0,4 mL/min a 60 °C. Os desvios padrão para as ligninas foram $M_n \pm 100$, $M_w \pm 300$ e $PDI \pm 0,3$ ou menos e a curva de calibração estabelecida foi realizada com padrões de poliestireno (intervalo $170\text{--}2 \times 10^6$ g/mol) de massa molar conhecida obtido da Agilent.

A segunda metodologia desse tópico foi considerando uma etapa extra de acetilação da lignina, esta foi realizada usando um Agilent 1200 HPLC system (Agilent Technologies, Inc, Santa Clara, CA, US) equipado com coluna Waters Styragel (HR1, HR4 e HR5; Waters Corporation, Milford, MA, US). Um detector UV (270nm) foi usado para detecção e tetraidrofurano (THF) foi usado como eluente em uma vazão de 1,0 mL/min. As amostras foram previamente acetiladas com 1mL de 1:1 piridina/anidrido acético (v/v) com aproximadamente 3,0mg de lignina por 24h e 150 rpm em local sem luz. O solvente foi removido por coevaporação a 45°C com etanol, usando um rotaevaporador até secar. A lignina acetilada foi dissolvida em THF e posteriormente filtrada com filtro membrana 0.45 μm e submetido a análise de GPC. Padrões de poliestireno foram usados para calibração (intervalo $200\text{--}1 \times 10^6$ g/mol).

- FTIR

As análises de FTIR foram realizadas em equipamento Spectrum TM 400 séries FTIR/NIR (Perkin Elmer) com acessório de ATR com cristal de seleneto de zinco. A resolução espectral utilizada foi de $4,0\text{ cm}^{-1}$. Para cada amostra 16 varreduras foram acumuladas na região espectral de $650\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$.

- Análise elementar, C9-formula e DOU

A análise elementar das ligninas foi determinada Perkin Elmer CHNS/O Analyzer 2400 (Massachusetts, USA). Aproximadamente 3 mg de lignin foi pesada para determinar as quantidades de carbono, hidrogênio e nitrogênio. O oxigênio foi calculado pela diferença. A partir da análise elementar e dos dados de ^1H -NMR foi possível obter os valores da C_{900} fórmula e grupo metoxil da lignina.

Para complementar esse tópico foram calculados o grau de insaturação (DOU) da lignina baseada na fórmula empírica de Badertscher et. al. (2001)²⁵⁸ e as estruturas não condensadas (NCS) considerando a integração das regiões condensadas das unidades S, G e H usando ^{13}C NMR baseado em Costa et. al. (2015)²⁰².

- TGA

As transições térmicas e estabilidades das ligninas precipitadas foram determinadas usando análise termogravimétrica (TA instrumentos, Q500) com um fluxo de nitrogênio de 100 mL/min. Aproximadamente 5 mg das amostras foram colocadas no suporte constituído de alumina e as análises foram realizadas empregando-se uma taxa de aquecimento de 10°C/min de 25-900°C sob vazão de nitrogênio de 100 mL/min. A perda mássica foi registrada visando a avaliação dos diversos estágios de degradação.