



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA



Estudo de pré-tratamento de bagaço de cana pela associação do γ -valerolactona (GVL) e glicerol visando a sacarificação

FAUSTO RODRIGUES DE AMORIM

Uberlândia – MG

2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA



Estudo de pré-tratamento de bagaço de cana pela associação do γ -valerolactona (GVL) e glicerol visando a sacarificação

Fausto Rodrigues de Amorim

Orientador: Ubirajara Coutinho Filho

Co-orientador: Carlos Frederico de Souza Castro

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química

Uberlândia – MG

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

A524e
2018 Amorim, Fausto Rodrigues de, 1978-
Estudo de pré-tratamento de bagaço de cana pela associação do γ -valerolactona (GVL) e glicerol visando a sacarificação / Fausto Rodrigues de Amorim. - 2018.
114 f. : il.

Orientador: Ubirajara Coutinho Filho.
Coorientador: Carlos Frederico de Souza Castro.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2018.789>
Inclui bibliografia.

1. Engenharia química - Teses. 2. Bagaço de cana - Teses. 3. Biomassa - Teses. 4. Lignocelulose - Teses. I. Coutinho Filho, Ubirajara. II. Castro, Carlos Frederico de Souza. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

CDU: 66.0

Maria Salete de Freitas Pinheiro – CRB6/1262

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM ENGENHARIA QUÍMICA, EM 25 DE MAIO DE 2018

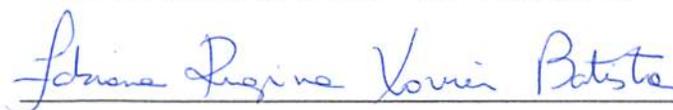
BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Ubirajara Coutinho Filho
Orientador (FEQ/UFU)



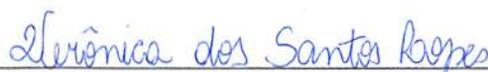
Prof. Dr. Carlos Frederico de Souza Castro
Co-orientador (IFGoiano – Rio Verde, GO)



Prof^a. Dra. Fabiana Regina Xavier Batista
(FEQ/UFU)



Prof. Dr. Diego Andrade Lemos
UFTM/Uberaba



Dra. Verônica dos Santos Lopes
PNPD/UFU

Dedico esta Tese

À Deus, ao meu filho, à minha família e amigos

Agradecimentos

A DEUS, pela oportunidade de ter alcançado mais um dos meus objetivos, pela força nos momentos difíceis e por estar sempre presente em minha vida.

À UniRV - Universidade de Rio Verde, em nome do Magnífico Reitor, professor Dr. Sebastião Lázaro Pereira pela concessão da licença remunerada que possibilitou que eu me dedicasse para alcançar mais essa etapa e contribuir com o melhoramento do ensino e pesquisa na nesta universidade ao qual sou docente.

À todos professores, pesquisadores e funcionários da Faculdade de Engenharia Química da UFU - Universidade Federal de Uberlândia em nome do professor Dr. Ubirajara Coutinho Filho, pela orientação, amizade, exemplo de profissionalismo, pelas lições de sapiência e humildade e, principalmente, pela confiança em me designar este trabalho.

A todos professores, pesquisadores e funcionários da Faculdade de Química do IFGoiano - Instituto Federal Goiano - Campus Rio Verde, em nome do professor Dr. Carlos Frederico de Castro pela co-orientação e iguais ensinamentos.

À todos professores, pesquisadores e funcionários da QUT - Queensland University of Technology, Austrália, em nome do professor Dr. Ian M. O'Hara e dos pesquisadores Dr. Zhanying Zhang e Dr. Mark D. Harrison do "CTCB - Centre for Tropical Crops and Biocommodities", pela confiança designada para desempenhar este trabalho e pela oportunidade para realizar um sonho antigo de estudar fora do país.

À toda minha família, em especial ao meu filho Miguel de Paula Amorim pelo período de ausência de quase um ano enquanto estive na Austrália. Aos meus pais Baltazar Viana de Amorim e Edna Maria Rodrigues de Amorim pela educação, pelas lições de honestidade, integridade, responsabilidade e, principalmente, por sempre terem me apoiado, confiado e acreditado em mim. Igualmente, aos meus irmãos Lucas Frank de Amorim e Monik Aparecida Viana Rodrigues pela sadia infância vivida juntos e pelas sinceras torcidas e

vibrações em cada uma de minhas conquistas. Aos meus querida sobrinha Leticia Maria Avellar de Amorim, à minha sobrinha e afilhada Allana Máisa Silva Amorim e ao meu sobrinho e afilhado Rafael Viana de Avellar.

Por último, e nem por isso menos importante, a todos meus amigos que de uma forma ou de outra participaram, contribuíram e/ou não atrapalharam a concretização deste trabalho.

MUITO OBRIGADO A TODOS!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABELAS.....	II
LISTA DE ABREVIATURAS.....	III
RESUMO	IV
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO 2 - REVISÃO DE BIBLIOGRÁFICA	7
2.1. BIOMASSA/BIORREFINARIAS: OPORTUNIDADES E DESAFIOS	7
2.1.1. ESTRUTURA DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA	9
2.1.1.1. CELULOSE	12
2.1.1.2. HEMICELULOSE	13
2.1.1.3. LIGNINA	14
2.1.2. CONVERSÃO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA EM BIOCOMBUSTÍVEIS E BIOQUÍMICOS 16	
2.1.3. PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA.....	18
2.1.4. PRÉ-TRATAMENTO ORGANOSOLV	20
2.1.4.1. PRÉ-TRATAMENTO DE BIOMASSA UTILIZANDO GLICEROL.....	31
2.1.4.2. PRÉ-TRATAMENTO DE BIOMASSA UTILIZANDO γ -VALEROLATCONE (GVL)	34
2.1.5. RECUPERAÇÃO DOS SOLVENTES PÓS PRÉ-TRATAMENTO	36
CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
3.1. PLANEJAMENTO DOS EXPERIMENTOS.....	41
3.2. PREPARAÇÃO DA AMOSTRA	42
3.3. PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA	44
3.4. HIDRÓLISE ÁCIDA	48
3.5. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.....	52
3.6. ANÁLISE DE HPLC	53
3.7. RECUPERAÇÃO DO SOLVENTE APÓS PRÉ-TRATAMENTO	54
3.8. CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA SÓLIDA APÓS O PRÉ-TRATAMENTO	56
3.8.1. CARACTERIZAÇÃO POR INFRA VERMELHO - FT-IR	56
3.8.2. CARACTERIZAÇÃO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA - MEV	57
3.8.3. CARACTERIZAÇÃO POR DIFRAÇÃO DE RAIO X - DRX	58
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES	61
4.1. HIDRÓLISE ÁCIDA	61
4.2. HIDRÓLISE OU SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA.....	66
4.3. RENDIMENTO DA BIOMASSA, RECUPERAÇÃO DE COMPONENTES E RENDIMENTO DA GLICOSE.....	69
4.4. RECUPERAÇÃO DE SOLVENTE, CARBOIDRATOS E SUBPRODUTOS	76
4.5. CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA SÓLIDA APÓS O PRÉ-TRATAMENTO	84
4.5.1. CARACTERIZAÇÃO POR FT-IR	85
4.5.2. CARACTERIZAÇÃO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	88
4.5.3. AVALIAÇÃO DA CRISTALINIDADE POR DIFRAÇÃO DE RAIO X – DRX E FT-IR	91
CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES E SUGESTOES.....	94
CAPÍTULO 6 - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura de uma célula vegetal	10
Figura 2 – Estrutura da celulose	12
Figura 3 – Estrutura da hemicelulose	14
Figura 4 – Estrutura da lignina	16
Figura 5 – Produção de químicos e combustíveis	17
Figura 6 – Fluxograma do pré-tratamento por solvente orgânico	22
Figura 7 - Fluxograma resumido das etapas deste trabalho.....	40
Figura 8 – Processo de preparo da amostra	44
Figura 9 – Processo de pré-tratamento da biomassa.....	46
Figura 10 – Processo de filtração e coleta das amostras líquidas.....	47
Figura 11 – Processo de secagem por freeze dry.....	48
Figura 12 – Processo de filtração pós hidrólise ácida	50
Figura 13 – Processo preparação de amostras líquidas e secagem de cadinhos.....	51
Figura 14 – Processo coleta e preparação de amostras líquidas.....	52
Figura 15 – Preparo e funcionamento da hidrólise enzimática	53
Figura 16 – Equipamento e leitura de amostras em HPLC	54
Figura 17 – Processo separação das fases aquosa e solvente	55
Figura 18 – Caracterização das amostras em FT-IR	57
Figura 19 - Caracterização das amostras em SEM.....	58
Figura 20 – Caracterização das amostras por DRX.....	60
Figura 21 – Composição da biomassa recuperada do pré-tratamento.....	62
Figura 22 – Digestibilidade da glicose	67
Figura 23 – Rendimento da biomassa	75
Figura 24 – Componentes recuperados	76
Figura 25 – Rendimento da glicose	76
Figura 26 – Concentração de GVL.....	79
Figura 27 – Distribuição de massa de GVL	79
Figura 28 – Concentração de xilose	83
Figura 29 – Distribuição de massa de xilose	83
Figura 30 – Espectros do FT-IR	86
Figura 31 – Espectros do FT-IR (continuação)	86
Figura 32 – Alterações estruturais na biomassa (magnitude de 100x e 500µm).....	89
Figura 33 – Alterações estruturais na biomassa	91
Figura 34 – Espectros de Difração de raio-X - DRX	92
Figura 35 – Índice de cristalinidade	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição de biomassas lignocelulósicas	11
Tabela 2 – Estruturas e constantes físicas para seleção de solvente orgânico para pré- tratamento	24
Tabela 3 – Parâmetro de solubilidade e classificação dos solventes	26
Tabela 4 – planejamento do experimento	41
Tabela 5 – Composição da biomassa	61
Tabela 6 – Digestibilidade da glicose	66
Tabela 7 – Rendimento, composição e componentes recuperados da biomassa; digestibilidade e rendimento da glicose.	70
Tabela 8 – Concentração e distribuição de GVL	77
Tabela 9 – Concentração e distribuição de glicose	80
Tabela 10 – Concentração e distribuição de xilose	81
Tabela 11 – Grupos funcionais encontrados na biomassa	88
Tabela 12 – Cálculo do índice de cristalinidade	92

LISTA DE ABREVIATURAS

GVL - γ valerolactona

EG - etilenoglicol

AGU - anidroglicose

DP - grau de polimerização

NREL - Laboratório Nacional de Energia Renovável

HMF – 5- hidroximetil furfural

THF – Tetrahidrofuran

MIBK - Metil isobutil cetona

2-MTHF - 2-Metiltetra-hidrofurano

DMF - dimetilformamida

CBMs - módulos de ligação a carboidratos

QUT - Queensland University of Technology

CARF - Central Analytical Research Facility

CTCB - Centre for Tropical Crops and Biocommodities

GLi – Glicerol

EUA – Estados Unidos da América

SRS – Standard recovery sugar (padrão de recuperação de açúcar)

UV - ultra violeta

HPLC – High-performance liquid chromatography (cromatografia líquida de alta performance)

FT-IR – Fourier-transform infrared spectroscopy (Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier)

DRX - Difração de Raio X

MEV - Microscópio eletrônico de varredura

ATR - Attenuated total reflection (Reflexão total atenuada)

CrI – Crystallinity index (índice de cristalinidade)

RESUMO

O rápido consumo dos combustíveis fósseis, aliado aos problemas ambientais atribuídos a eles, e a crescente demanda por energia têm direcionado à busca de energias renováveis. A biomassa surge como a alternativa mais viável, mas sua característica recalcitrante exige um pré-tratamento, cujo destaque aponta para aqueles utilizando solventes orgânicos (organosolv). Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da associação do γ -valerolactona (GVL) com glicerol no pré-tratamento do bagaço de cana visando melhorar a sacarificação. Os experimentos foram realizados em sete diferentes condições de pré-tratamento variando as proporções GVL e glicerol na solução de reação: 80% GVL/0%Gli, 70%GVL/10%Gli, 60%GVL/20%Gli, 50%GVL/30%Gli, 40%GVL/40%Gli, 20%GVL/60%Gli, 0%GVL/80%Gli. Após a biomassa do bagaço de cana ter sido pré-tratada foram realizadas análises de hidrólise ácida, hidrólise enzimática para verificar a disponibilidade de açúcares fermentáveis (glicose e xilose) e de subprodutos inibidores da fermentação (furfural e hidroximetilfurfural). Além disso, foi verificada a recuperação do solvente GVL e dos açúcares na fase solvente e aquosa formadas após a indução de solução bifásica do hidrolisado. A alteração estrutural da biomassa sólida depois do pré-tratamento também foi analisada utilizando técnicas de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier – FT-IR, difração de raio X e microscopia de varredura eletrônica – MEV. Os resultados da composição e recuperação da biomassa, digestibilidade e rendimento da glicose mostraram de uma forma geral que os melhores resultados foram encontrados nos pré-tratamentos com maiores porcentagens de GVL (60, 70 e 80%). A recuperação do solvente GVL também apresentou melhores resultados nos pré-tratamentos com maiores porcentagens do solvente (60, 70 e 80%) e sua distribuição se concentrou na fase solvente da solução bifásica, chegando a 77% de recuperação. A distribuição da glicose foi de 100% na fase aquosa em todos pré-tratamentos e a xilose, apesar de ter aparecido na fase solvente, se concentrou na fase aquosa com resultados variando de 70 até 87%. Os espectros do FT-IR apresentaram picos em comprimentos de onda 2,915, 1726, 1606, 1507, 1230 e 833 cm^{-1} . Todas bandas identificadas caracterizam a remoção da lignina pelos pré-tratamentos, com exceção da primeira que está relacionada com a celulose e/ou hemicelulose. As imagens do MEV são congruentes com os resultados do FT-IR pois mostram que o revestimento de lignina e hemicelulose nas fibras de celulose foram removidas em maior ou menor grau conforme cada pré-tratamento. O índice de cristalinidade, calculado através da DRX, demonstrou que houve diminuição da cristalinidade da biomassa pré-tratada quando comparada com a biomassa sem pré-tratamento. Com esses resultados, pode-se concluir que a associação de GVL ao glicerol favoreceu o aumento da digestibilidade da glicose em até 8,3 vezes quando comparado com o bagaço sem pré-tratamento. As técnicas de FT-IR, DRX e MEV foram capazes de mostrar que o pré-tratamento GVL/Gli geraram alterações nas fibras e estado cristalino do bagaço pré-tratado. E que o GVL pode ser recuperado em proporções superiores à 74% sem a destilação do mesmo na fase aquosa.

Palavras chaves: bagaço de cana, organosolv, valerolactona (GVL), glicerol,

ABSTRACT

The rapid consumption of fossil fuels, coupled with the environmental problems attributed to them, and the growing demand for energy have driven the search for renewable energies. Biomass appears as the most viable alternative, but its recalcitrant characteristic requires a pre-treatment, whose prominence points to those using organic solvents (organosolv). This work aimed to evaluate the effects of the association of γ -valerolactone (GVL) with glycerol in the pre-treatment of sugarcane bagasse in order to improve saccharification. The experiments were carried out in seven different pretreatment conditions varying the GVL and glycerol proportions in the reaction solution: 80%GVL/0%Gly, 70%GVL/10%Gly, 60%GVL/20%Gly, 50%GVL/30%Gly, 40%GVL/40%Gly, 20%GVL/60%Gly, 0%GVL/80%Gly. After the biomass of the sugarcane bagasse was pretreated, acid hydrolysis, enzymatic hydrolysis analyzes were performed to verify the availability of fermentable sugars (glucose and xylose) and fermentation inhibiting byproducts (furfural and hydroxymethylfurfural). In addition, the recovery of the solvent GVL and the sugars in the solvent and aqueous phase formed after the induction of biphasic hydrolysis solution was verified. The structural alteration of the solid biomass after pretreatment was also analyzed using Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), X-ray diffraction and SEM-scanning electron microscopy techniques. The results of the composition and recovery of biomass, digestibility and glucose yield showed in general that the best results were found in the pre-treatments with higher GVL percentages (60, 70 and 80%). The GVL solvent recovery also showed better results in the pre-treatments with higher solvent percentages (60, 70 and 80%) and their distribution was concentrated in the solvent phase of the biphasic solution, reaching 77% recovery. The glucose distribution was 100% in the aqueous phase in all pre-treatments and xylose, although it appeared in the solvent phase, was concentrated in the aqueous phase with results ranging from 70 to 87%. FT-IR spectra showed peaks at wavelengths 2,915, 1726, 1606, 1507, 1230 and 833 cm^{-1} . All identified bands characterize the removal of lignin by pre-treatments, except for the first one that is related to cellulose and / or hemicellulose. SEM images are congruent with FT-IR results as they show that the lignin and hemicellulose coating on the cellulose fibers were removed to a greater or lesser extent according to each pretreatment. The crystallinity index, calculated by XRD, showed that the crystallinity of the pretreated biomass decreased when compared to the biomass without pre-treatment. With these results, it can be concluded that the association of GVL to glycerol favored the increase of glucose digestibility by up to 8.3 times when compared to bagasse without pre-treatment. The FT-IR, DRX and MEV techniques were able to show that the GVL / Gli pretreatment generated changes in the fibers and crystalline state of the pretreated bagasse. And that the GVL can be recovered in proportions higher than 74% without the distillation thereof in the aqueous phase.

Key words: sugarcane bagasse, organosolv, valerolactone (GVL), glycerol.

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

Apesar do carbono fóssil ser conhecido desde a antiguidade, passou a ser utilizado como principal fonte de energia e produtos químicos em meados do século XIX. Desde então, o petróleo e seus produtos de fracionamento têm proporcionado grandes avanços em todas as áreas de ciência e tecnologia e conseqüentemente contribuído para o desenvolvimento humano (ZHANG et al., 2016).

No entanto, o rápido consumo desses recursos aliados aos problemas ambientais atribuídos a ele, e a crescente demanda por energia, tem direcionado à busca de energias alternativas. Geralmente, estas energias são oriundas de recursos renováveis e reconhecidas como excelentes alternativas para complementar a matriz energética existente. Dentre elas, destacam-se a energia solar, eólica, biomassa, hidrelétrica e geotérmica (WEISS e PATEL, 2007).

Apesar da energia eólica e hidrelétrica deterem considerável potencial, são insuficientes e incapazes de atenderem sozinhas a demanda global de energia. Apesar de apresentar maior possibilidade de resolver o problema, a energia solar só será viável em longo prazo. No entanto, para curto e médio prazo, a maioria dos especialistas aposta na biomassa como fonte alternativa mais viável para solucionar o “déficit” de energia sustentável e renovável (GEBOERS et al., 2011). Isso porque ela representa o maior volume potencial e o menor custo para produção de biocombustíveis e bioquímicos (ZHANG; PEI; WANG, 2016). Estima-se que a produção anual de biomassa seja entre 80 a 164 bilhões de toneladas de matéria seca, tendo o potencial de deslocar uma proporção significativa de recursos fósseis como matéria-prima para a produção de combustíveis e produtos químicos (ZHANG et al., 2016).

Além disso, a biomassa é a única fonte sustentável de carbono orgânico e pode ser obtida em todo o mundo na forma de materiais orgânicos, como por exemplo resíduos florestais, madeira e seus resíduos, culturas agrícolas e resíduos da agroindústria. Ela também apresenta um ciclo fechado no qual o CO₂ liberado pela sua transformação em produtos químicos, combustíveis ou energia é recapturado pelas plantas através da fotossíntese (SERRANO-RUIZ; LUQUE; SEPÚLVEDA-ESCRIBANO, 2011).

Apesar do processo de hidrólise da biomassa comestível (amidos e óleos vegetais) ser bem mais simples que a da biomassa de materiais lignocelulósicos, a primeira pode levar à concorrência de terras para a produção de alimentos, o que pode acarretar o aumento dos preços dos mesmos, como ocorrido em 2007 e 2008.

Com vistas a se evitar este problema, a utilização da biomassa oriunda dos resíduos agroflorestais surge como uma alternativa promissora devido à sua abundância e ao seu baixo custo de obtenção. Por outro lado, por se tratar de um material lignocelulósico, possui fortes ligações químicas, recalcitrante e de difícil degradação. Isso eleva o custo de conversão dessa fonte renovável em biocombustíveis e bioprodutos.

Várias tecnologias têm sido estudadas visando facilitar e diminuir os custos da degradação da biomassa lignocelulósica. O pré-tratamento da biomassa destaca-se como a principal tecnologia que visa romper as estruturas da lignocelulose e aumentar a acessibilidade das enzimas aos açúcares fermentáveis presentes na celulose e hemicelulose da biomassa (ZHANG et al., 2016).

No entanto, na escolha da tecnologia de pré-tratamento mais adequada a ser utilizada deve também considerar o tipo de matéria prima, manipulação e processo, composição e tamanho do vaso de tratamento, eficiência da fermentação, concentração e composição enzimática, disposição de resíduos e oportunidade para gerar co-produtos (YANG; WYMAN, 2008).

A literatura fornece uma visão geral das diferentes abordagens para o pré-tratamento de lignocelulose. As tecnologias de pré-tratamento podem ser categorizadas como químicas, físicas, biológicas ou suas combinações. Os pré-tratamentos químicos são tipicamente conduzidos sob pressão a temperaturas significativamente acima do ponto de ebulição do solvente (por exemplo, água ou líquidos orgânicos), com ou sem a adição de catalisadores. Os pré-tratamentos físicos incluem fragmentação mecânica (por exemplo, moagem de bolas e moagem de disco húmido), extrusão e irradiação (por exemplo, ultra-sons, microondas, raios γ). Os pré-tratamentos biológicos geralmente empregam fungos de podridão branca, que agem pela degradação enzimática da lignina (WAN; LI, 2012).

Os pré-tratamentos puramente físicos ou biológicos requerem entradas de energia relativamente altas ou tempos de pré-tratamento longos (dias ou semanas), respectivamente,

para melhorar os rendimentos de sacarificação para um nível comercialmente viável e, portanto, não são práticas atualmente para aplicações industriais. A maioria dos estudos de pré-tratamento recentes se concentrou em processos físico-químicos em que a biomassa lignocelulósica é desconstruída quimicamente e depois processada fisicamente para reduzir o tamanho de partícula (ZHANG et al., 2016).

Pré-tratamentos de lignocelulose que utilizam solventes orgânicos (mais comumente conhecidos como pré-tratamentos organosolv) tem sido intensamente estudados desde o seu desenvolvimento na indústria de celulose e papel e emergiram como uma das estratégias de pré-tratamento mais promissoras para o aprimoramento da sacarificação enzimática da lignocelulose (CALVO-FLORES; DOBADO, 2010).

E embora as pesquisas sobre a aplicação destes solventes tenham progredido significativamente nos últimos anos, as revisões abrangentes que descrevem os pré-tratamentos organosolv são limitadas (ZHAO; CHENG; LIU, 2009).

Os pré-tratamentos organosolv utilizam solventes tais como álcoois alifáticos de cadeia curta (por exemplo, metanol, etanol), polióis (por exemplo, glicerol, etilenoglicol (EG), trietilenoglicol), ácidos orgânicos, acetona, dioxano e fenol. Alguns desses solventes orgânicos (como o metanol, o etanol, a acetona, o ácido acético, o valerolactona (GVL) e o glicerol) podem ser obtidos a partir de fontes renováveis, aumentando sua aplicação para a produção sustentável de combustíveis e produtos químicos. Além disso, alguns pré-tratamentos organosolv possibilitam a obtenção de lignina relativamente pura, baixa em enxofre e menos condensada do que a obtida por outros pré-tratamentos de lignocelulose. Essa lignina de "alta qualidade" pode ser potencialmente transformada em produtos de maior valor (CALVO-FLORES; DOBADO, 2010).

Mais recentemente, o termo "organosolv" também foi aplicado a processos de pré-tratamento de biomassa lignocelulósica que utilizam solventes orgânicos tais como carbonatos de alquilenos, N-metil-N-óxido de morfolina (ou 4-óxido de 4-metilmorfolina), metilisobutilcetona e 2-metil-tetrahidrofurfurano e líquidos iônicos compostos de cátions e ânions orgânicos (HOU; LI; ZONG, 2013).

No entanto, os processos de tratamento desses líquido iônico são relativamente caros em comparação com os outros processos de organosolv devido aos altos custos associados à

sua produção e recuperação, apesar do seu potencial em dissolver e descristalinizar o componente de celulose da biomassa (BONAWITZ; CHAPPLE, 2010).

O pré-tratamento utilizando solventes orgânicos GVL ou glicerol, objeto desse estudo, são relatados constantemente na literatura. Por exemplo, HORVÁTH et al. (2008) consideraram o GVL um solvente orgânico ideal porque tem baixo ponto de fusão (-31°C), baixa pressão de vapor e é miscível com água. Além disso, QI et al. (2014) reforçam que é um solvente seguro e renovável, que pode ser derivado de lignocelulose. De acordo com SHELDON (2014), sua síntese parte da degradação de açúcares hexoses que produzem o HMF que subsequentemente é convertido em ácido levulínico (LA) e depois em GVL. No que se refere aos seus efeitos como solvente orgânico, WU et al. (2016) relatam que o GVL apresenta-se efetivo na extração de lignina e na degradação de glicose e xilose. Além disso apresentam baixa formação de subprodutos inibidores da fermentação tais como furfural, HMF, ácido láctico, fórmico e acético. ZHANG et al. (2016) também ressaltam que recentemente o GVL recebeu significativa atenção como solvente orgânico pois pode alcançar a sacarificação completa de biomassa a baixas concentrações de ácido. Esta abordagem difere do processo tradicional de organosolventes uma vez que produz açúcares solúveis em vez de substrato rico em celulose para subsequente sacarificação.

No que se refere ao glicerol, ISMAIL et al. (2010) relataram que ele é considerado um solvente orgânico atraente porque é um composto não inflamável e baixa pressão de vapor. Além disso, é sintetizado naturalmente a partir da conversão de matérias-primas de triglicérides de segunda geração - óleos vegetais não comestíveis, óleo de algas ou resíduos de óleos e gorduras de cozinha - em biodiesel e precursores químicos (SHELDON, 2014). Em um trabalho utilizando o glicerol como organosolvente, MARTÍN et al. (2011) relataram que a solubilização de lignina aumentou proporcionalmente com a concentração de glicerol, atuando mais seletivamente na lignina do que em xilano. Reportaram também que o pré-tratamento com glicerol foi eficaz aumentando a hidrólise enzimática de celulose.

Outros autores ainda reforçam que o GVL exhibe as características mais importantes de um meio de reação ideal, incluindo a possibilidade de usá-lo para a produção tanto de energia quanto de produtos que consomem carbono (ALONSO; WETTSTEIN; DUMESIC, 2013). É renovável, tem baixo ponto de fusão, altos pontos de ebulição e de fulgor, baixa toxicidade, alta solubilidade em água para auxiliar a biodegradação e não forma uma quantidade

mensurável de peróxidos ao longo do tempo (HORVÁTH et al., 2008). Além disso, a recuperação do GVL é simples e eficiente, pois não forma um azeótropo com água; o último pode ser removido por destilação, o que resulta em um processo que demanda menos energia para a reciclagem que o etanol por exemplo (MEHDI et al., 2008).

Foi demonstrado que a desidratação de açúcares em compostos furânicos resultam em rendimentos muito maiores quando o GVL é usado como solvente juntamente com uma pequena quantidade de água (GURBUZ et al., 2013). Recentemente, uma produção em escala laboratorial de carboidratos com alto rendimento (70-90%) de uma série de fontes de biomassa usando uma mistura solvente de GVL, água e ácido diluído foi relatada. O GVL pode ser separado dos carboidratos solúveis pela adição de NaCl ou extração com CO₂. Além disso, O GVL é estável em sistemas ácidos em altas temperaturas (470 K) (LUTERBACHER et al., 2014).

A literatura disponibiliza vários trabalhos que utilizam o glicerol ou o GVL como solvente orgânico, variando o tipo de biomassa pré-tratada, as condições de temperatura, tempo de reação, concentração dos solventes na solução de reação e os catalizadores. No entanto, apesar dessas variáveis, o objetivo comum é o de aumentar a digestibilidade da glicose através da hidrólise enzimática com vistas à produção de bioquímicos e biocombustíveis.

A solução de reação geralmente é um solvente orgânico e água variando suas proporções. Nesse sentido, este trabalho apresenta a novidade de utilização do glicerol juntamente com GVL com o intuito de verificar se essa associação contribuiria com o aumento da digestibilidade da glicose presente no bagaço de cana estudado. Ressalta-se que na literatura consultada não foram encontrados trabalhos que utilizaram-se dessa associação para esse fim.

Assim, neste trabalho foi realizado o estudo do processo organosolv com o uso de γ -valerolactona (GVL) associado ao glicerol como sistema de interesse. O objetivo geral foi o de avaliar os efeitos da associação do γ -valerolactona (GVL) com glicerol no pré-tratamento do bagaço de cana visando melhorar a disponibilização e digestibilidade da glicose contida na biomassa. E os objetivos específicos foram:

- ✓ Caracterizar, através de hidrólise ácida, a composição da biomassa bagaço de cana submetido às diferentes condições de pré-tratamentos;
- ✓ Avaliar a digestibilidade, via hidrólise enzimática, da biomassa bagaço de cana submetido às diferentes condições de pré-tratamento.
- ✓ Verificar as alterações na estrutura da biomassa associadas às diferentes condições de pré-tratamentos utilizando as técnicas de microscopia eletrônica, infravermelho e difração de raio-x.;
- ✓ Avaliar a recuperação de solvente GVL, por indução de solução bifásica a partir do hidrolisado originado das diferentes condições de pré-tratamentos;

CAPÍTULO 2 - REVISÃO DE BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo foi realizada uma breve revisão bibliográfica referente ao contexto das biorrefinarias de biomassa lignocelulósica, estrutura da biomassa lignocelulósica, processos de pré-tratamento mais comuns e o uso do processo organosolv com discurso de esforços gerais deste pré-tratamento e o uso do GVL associado ao glicerol como forma de pré-tratamento. Primeiramente será abordado o assunto biorrefinarias e biomassa, compreendendo o seus conceitos e componentes estruturais. Em seguida, serão discutidos os processos de pré-tratamento mais utilizados enfatizando a utilização de organosolv e em específico, abordando o uso de GVL e glicerol como solventes no pré-tratamento de biomassa lignocelulósica.

2.1. Biomassa/biorrefinarias: oportunidades e desafios

Várias tecnologias de conversão de biomassa em bioetanol tem sido estudadas nos últimos 50 anos, mas um conceito de biorrefinaria é atualmente integrado como a conversão de várias matérias-primas de biomassa em vários produtos. Para isso, são utilizadas diferentes tecnologias de processamento, com foco primário em biocombustíveis (bioetanol, biodiesel e biogás) e subprodutos, incluindo bioquímicos e bioenergia de valor agregado (calor e energia) (GAVRILESCU, 2014).

A biorrefinagem oferece flexibilidade de requisitos de matéria-prima e eficiência energética vantajosa em comparação com a produção de um único combustível (PANDE; BHASKARWAR, 2012).

De acordo com ALONSO; BOND; DUMESIC (2010), são consideradas três classes gerais de matéria prima derivada da biomassa apropriada para produção de energia renovável: amido (incluindo açúcares), triglicerídeos e lignocelulose.

As matérias-primas a base de amido, são derivadas de culturas agrícolas como milho, trigo e batata, por exemplo. São chamadas de biomassa comestível, formadas por polissacarídeos unidos por ligações glicosídicas que são facilmente hidrolisadas em monômeros de açúcares fermentáveis para produção de etanol.

Aquelas à base de triglicerídeos, são compostas por ácidos graxos e glicerol e suas fontes para produção de biodiesel incluem vários óleos vegetais (girassol e canola, por exemplo), resíduos de óleo e algas.

Por fim, as matérias-primas à base de material lignocelulósico são aquelas compostas por três diferentes frações de celulose, hemicelulose e lignina cuja porcentagem varia de acordo com o material. Estes três compostos juntos são responsáveis pela integridade estrutural das plantas e em geral pode ser encontrada, por exemplo, nas culturas agrícolas e seus resíduos, resíduos municipais, resíduos florestais e do processamento de madeira.

O material lignocelulósico têm sido considerado uma matéria prima apropriada para produção sustentável de biocombustíveis (etanol e butanol) e bioquímicos (ácido lático, ácido succínico, etc.), devido principalmente seu baixo custo de obtenção e abundância (ZHANG; DOHERTY; O'HARA, 2017).

Estima-se que a produção anual de biomassa seca seja de 80 a 164 bilhões de toneladas com potencial de substituir uma proporção significativa de material fóssil utilizado como matéria prima para a produção de combustíveis e produtos químicos (ZHANG et al., 2016).

Somente nos Estados Unidos, a área florestal produz cerca de 368 milhões de toneladas de biomassa e a área agrícola, cerca de 998 milhões, totalizando aproximadamente 1.3 bilhões de toneladas de biomassa seca por ano. Essa quantidade é suficiente para produzir biocombustíveis para atender mais de um terço da atual demanda de combustíveis de transporte daquele país. Os órgãos ligados à pesquisa e desenvolvimento de biomassa, energia e agricultura Americana estabeleceram um objetivo nacional para a biomassa abastecer 5% da demanda total de energia industrial e elétrica, 20% do consumo de combustível do transporte e 25% de produtos químicos e materiais até o ano de 2030, exigindo assim um suprimento anual de aproximadamente 1 bilhão de toneladas de biomassa secas (PERLACK et al., 2005).

Por outro lado, a composição da biomassa lignocelulósica apresenta alto grau de complexidade química e recalcitrância (lignina oferece uma extra proteção à celulose e hemicelulose) que aumenta custo de processamento em comparação com a biomassa comestível facilmente degradável (MÄKI-ARVELA et al., 2007). Esse custo é

aproximadamente duas vezes mais alto que o custo de produzir etanol com milho (ALONSO; BOND; DUMESIC, 2010).

Este é considerado um dos maiores problemas para tornar a utilização da biomassa lignocelulósica economicamente viável. Nesse sentido, a otimização de processos de pré-tratamento e da hidrólise da biomassa tem sido objeto de estudo de muitos pesquisadores com o intuito de diminuir custos e aumentar a eficiência de conversão da mesma (PICCOLO; BEZZO, 2009).

Antes de direcionar a atenção para o assunto pré-tratamento, objeto de grande interesse desse trabalho, será apresentada com uma riqueza maior de detalhes, a estrutura que compõe os materiais lignocelulósicos, destacando suas características químicas que as tornam tão difíceis de serem desconstruídas.

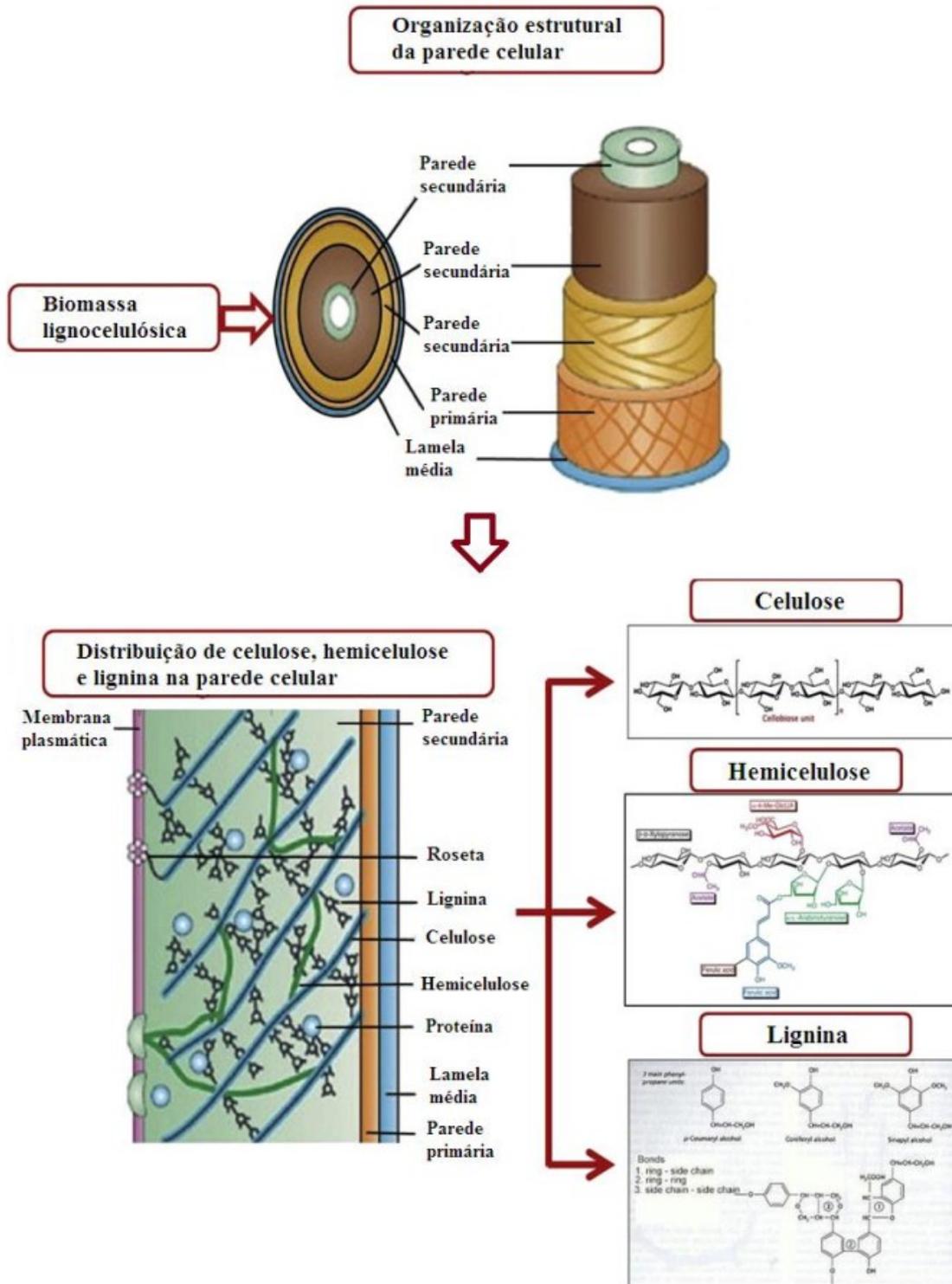
2.1.1. Estrutura da biomassa lignocelulósica

A maior parte da matéria seca das plantas terrestres é feita de paredes celulares vegetais que consistem em distintas camadas. A camada primária da parede celular é a camada mais externa e dessa forma, é a mais distante da membrana plasmática em uma célula madura (MANSUR et al., 2013).

Depois que atinge a maturidade, uma segunda camada celular surge entre a parede primária e a membrana plasmática da célula. Essa segunda camada consiste em fibras de celulose dentro de uma matriz de hemicelulose (principalmente glucuronoarabinoxilano) e juntamente com a lignina são os maiores constituintes da massa de fibras vegetais (ZHANG et al., 2016).

A

Figura 1, mostra a estrutura celular considerando a celulose, hemicelulose e lignina:



Fonte: Adaptado de MENON; RAO (2012) *apud* LOPES (2017)

Figura 1 – Estrutura de uma célula vegetal

Nas células vegetais, cerca de 40 a 50% é celulose, 25 a 35% de hemicelulose e 15 a 20% de lignina, havendo uma variação de acordo com o tipo de biomassa (MÄKI-ARVELA et al., 2007).

Dada essa maior quantidade de celulose, os pesquisadores normalmente usam o termo biomassa lignocelulósica para descrever qualquer fibra vegetal, independente da origem filogenética ou ausência efetiva de lignina em sua parede celular primária (ZHANG et al., 2016).

A Tabela 1 apresenta as diferentes composições de celulose, hemicelulose e lignina para vários tipos de biomassa.

Tabela 1 – Composição de biomassas lignocelulósicas

Biomassas	Composição de carboidratos (% peso seco)		
	Celulose	Hemicelulose	Lignina
Sabugo de milho	32,3 – 45,6	39,8	6,7 – 13,9
Palha de milho	35,1 – 39,5	20,7 – 24,6	11,0 – 19,1
Palha de arroz	29,2 – 34,7	23,0 – 25,9	17,0 – 19,0
Casca de arroz	28,7 – 35,6	11,9 – 29,3	15,4 – 20,0
Palha de trigo	35,0 – 39,0	22,0 – 30,0	12,0 – 16,0
Farelo de trigo	10,5 – 14,8	35,5 – 39,2	8,3 – 12,5
Bagaço de cana	32,0 – 45,0	27,0 – 32,0	14,0 – 24,0
Palha de sorgo	32,0 – 35,0	24,0 – 27,0	15,0 – 21,0

Fonte: Adaptado de MENON e RAO (2012) *apud* LOPES (2017)

Em vegetais superiores, 36 cadeias paralelas de celulose são agregadas via ligações de hidrogênio e força de van der Waals para formar microfibras de 3 a 5 nm de diâmetro (MATTHEWS et al., 2006).

A maior parte da celulose ao longo do comprimento de uma microfibrila é cristalina em uma das duas formas (I α e I β), com regiões amorfas intervenientes (BROWN, 2004). As microfibrilas de celulose são ainda ordenadas por ligação de hidrogênio a hemicelulose em agregados maiores (ou macrofibrilas) de 50 a 250 nm de diâmetro e residem dentro de uma matriz não cristalina tanto de hemicelulose quanto de lignina ou pectina (DING; HIMMEL, 2006).

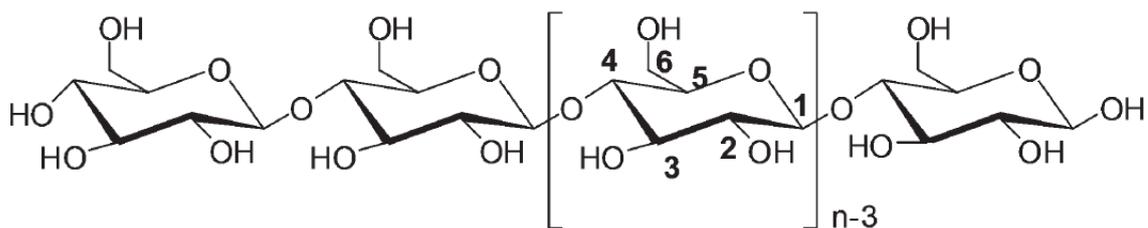
2.1.1.1. Celulose

Celulose é uma cadeia longa não ramificada homo polissacarídica composta de monômeros de glicose unidas por ligações covalentes β -1,4-glicosídicas entre subunidades de celobiose e é o biopolímero mais abundante na terra (BROWN, 2004). Estas ligações ocorrem entre os átomos de carbono C4 e C1, resultando em um extenso polímero de cadeia linear com três grupos hidroxilas em cada unidade de anidroglicose – AGU (KLEMM et al., 2005).

O número de monômeros de glicose nos polímeros de celulose é expressa pelo número de AGU's que a constitui, que por sua vez define o grau de polimerização – DP desta mesma cadeia que varia dependendo da espécie vegetal, da camada da parede celular em que a celulose se encontra e do tipo de tratamento que ela recebe (JORDAN et al., 2012).

Por exemplo, para a madeira os valores são tipicamente entre 300 e 1700 DP. Para o algodão e outras fibras vegetais, entre 100 e 10.000. As fibras regeneradas da celulose contêm de 250 a 500 DP. Através do tratamento ácido e hidrólise enzimática, a celulose pode ser quantitativamente decomposta em D-glicose. A degradação parcial da cadeia produz substratos em pós microcristalinos com valores de DP entre 150 e 300. E devido ao grande número de grupos hidroxila e das ligações β -1,4-glicosídica, é fácil formar intra e interligações de hidrogênio que tornam a celulose resistente ao tratamento químico e biológico, tornando-a altamente insolúvel em solventes comuns (KLEMM et al., 2005).

A Figura 2 apresenta a estrutura da celulose com suas ligações β -1,4-glicosídicas:



Fonte: ZHANG et al. (2016)

Figura 2 – Estrutura da celulose.

2.1.1.2. Hemicelulose

Enquanto a celulose é um homopolímero linear de glicose, a hemicelulose consiste em um hetero polissacarídeo ramificado formado por pentoses (xilose e arabinose) e hexoses (manose, glicose e galactose), ácidos de açúcar e xiloglucanos, xilanos, mananos, glucomananos e β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 4)-glucanos (SCHELLER; ULVSKOV, 2010)

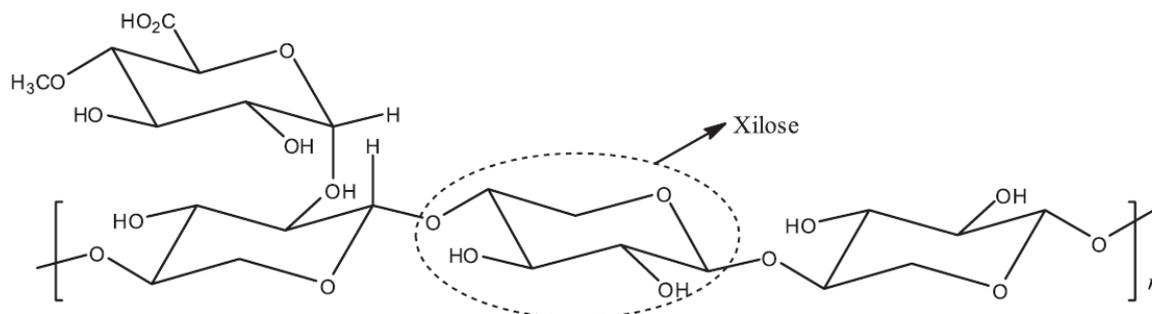
As ligações β -1,4 na cadeia principal das hemiceluloses permitem que esses polissacarídeos formem ligações de hidrogênio tanto com elas mesmas quanto com celulose (EBRINGEROVA; HROMADKOVA; HEINZE, 2005). Ao contrário da celulose, as estruturas das hemiceluloses são muito variáveis (tanto na natureza da cadeia principal, ligações e substituintes) para formar microfibrilas de linha de cristal, dessa forma podem ser descritas como amorfas (ZHANG et al., 2016).

A hidrólise da hemicelulose é intrinsicamente mais complexa que a da celulose por causa da heterogeneidade de substratos dentro de uma determinada célula vegetal, entre células na mesma planta e entre as paredes celulares de diferentes plantas (PAULY et al., 2013).

Ela é covalentemente ligada à lignina, servindo assim de conexão entre as fibras de lignina e de celulose, proporcionando rigidez à rede celulose-hemicelulose-lignina. Embora sua remoção raramente seja completa durante o pré-tratamento da biomassa, a maioria dos solventes pelo menos a solubilizam parcialmente (HARRIS; TRETHERWAY, 2009).

A Fonte: SANTOS et al. (2012)

Figura 3 apresenta a estrutura da hemicelulose com suas ligações e heterogeneidade de compostos:



Fonte: SANTOS et al. (2012)

Figura 3 – Estrutura da hemicelulose

2.1.1.3. Lignina

Lignina é um complexo e reticulado polímero de monômeros fenólicos com constituintes aromáticos e alifáticos. É totalmente amorfa e hidrofóbica e formada por três unidades estruturais principais: p-hidroxifenilo (H), guaitil (G) e siringil (S) e fenilpropano que diferem na substituição do grupo metil do anel aromático (JOHN; THOMAS, 2008).

Estas unidades estruturais estão ligadas por uma variedade de éteres (por exemplo, α -O-4, β -O-4 e 4-O-5) e carbono-carbono (β - β , β -5 e 5-5), cuja formação é catalisada por enzimas lacase e peroxidase durante a biossíntese de lignina (MANSUR et al., 2013).

Como resultado dessas ligações (diretas ou indiretas) com outros componentes da parede celular, um desafio fundamental na compreensão da química da lignina é a incapacidade de isolar a lignina em seu estado nativo da fibra vegetal. O que é conhecido sobre a estrutura da lignina é que ela depende não apenas da planta e/ou do tecido vegetal de que a originou, mas também o método químico utilizado para sua extração (ZHANG et al., 2016).

A lignina envolve as frações de hemicelulose e celulose, e uma função do pré-tratamento de biomassa é despolimerizar a lignina de modo que as porções de carboidratos possam ser acessadas. A lignina pode ser removida da biomassa para isolar a fração de carboidratos através da despolimerização/solubilização em soluções de álcool alcalino, de efeito semelhante para o processo de fabricação de pasta de papel Kraft (MOSIER et al., 2005). Ela também pode ser coletada após o pré-tratamento e hidrólise ácida ou enzimática

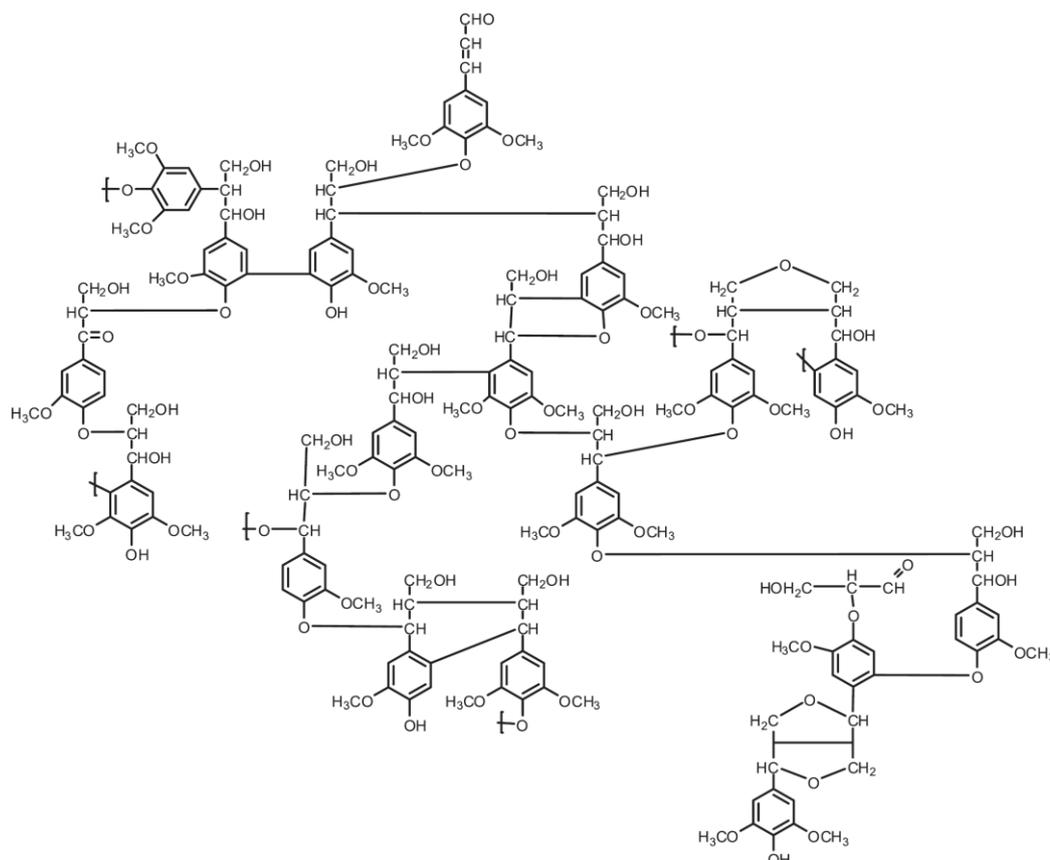
para extração de açúcares pentoses e hexoses da hemicelulose e celulose, respectivamente (WYMAN et al., 2005).

Embora a lignina possa ser isolada, ainda existe dificuldades na utilização destas técnicas. Assim sendo, uma opção para a utilização de lignina seria queimá-la para produção de calor e eletricidade. Um relatório do Laboratório Nacional de Energia Renovável (NREL) dos Estados Unidos, sugere que em uma biorrefinaria integrada para a produção de etanol celulósico, a lignina e outros resíduos sólidos possam ser usados para fornecer calor e potência a uma taxa superior à energia necessária para conduzir o processo (ADEN; FOUST, 2009).

Além disso, alternativas são sugeridas que permitem a produção de intermediários funcionais a partir da lignina para produzir produtos químicos valiosos. Por exemplo, a lignina pode ser usada como uma matéria-prima na produção de resinas fenólicas, uma vez que é rica em compostos aromáticos oxigenados. Outros estudos relatam estratégias de pirólise para a produção de bio-óleos e aromáticos de lignina (ALONSO; BOND; DUMESIC, 2010).

A Fonte: SANTOS et al. (2012)

Figura 4 apresenta a estrutura da lignina com suas ligações, heterogeneidade e complexidade de compostos:



Fonte: SANTOS et al. (2012)

Figura 4 – Estrutura da lignina

2.1.2. Conversão da biomassa lignocelulósica em biocombustíveis e bioquímicos

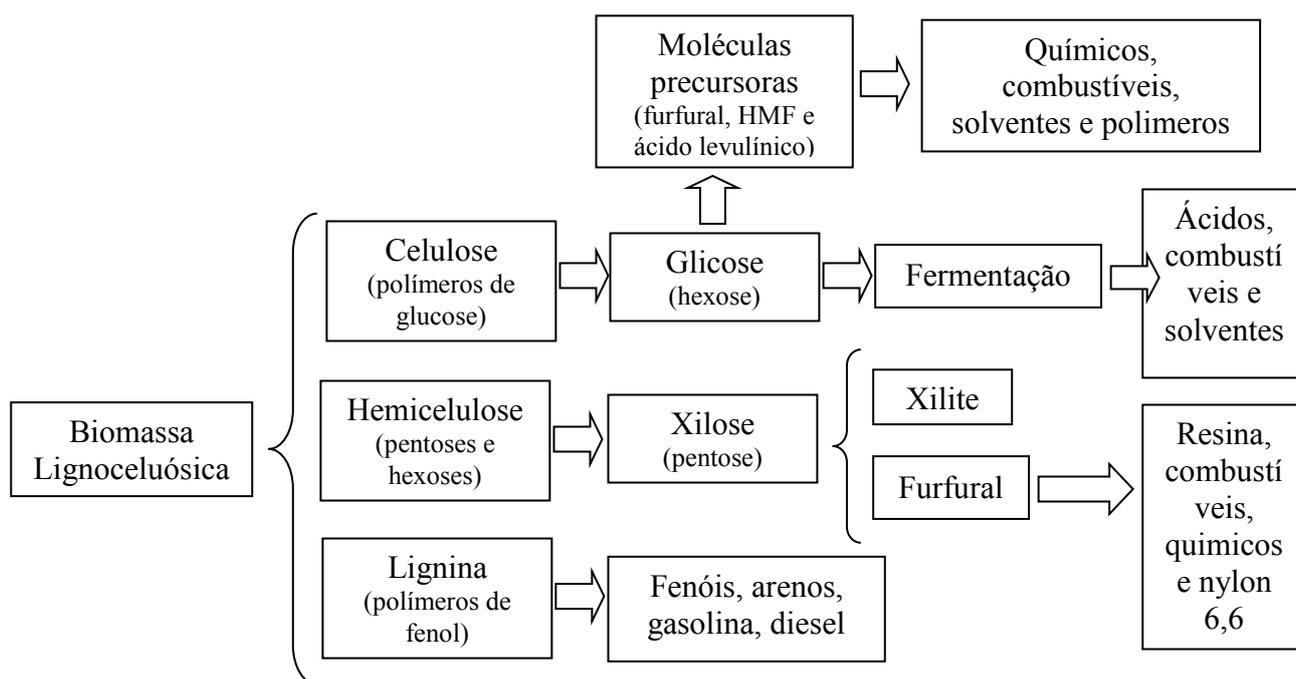
É importante destacar que dentre os biopolímeros que compõem a lignocelulose, a celulose (polímero de glicose) é a mais valiosa, pois ela pode ser convertida em glicose (hexose) e subsequentemente fermentada para produzir combustíveis, ácidos e solventes. Ou ainda, ela pode ser desidratada para produzir ácido levulínico e/ou hidroximetilfurfural - HMF, que são moléculas precursoras para produção de químicos, combustíveis, solventes e outros polímeros (GEBOERS et al., 2011).

Também por hidrólise, a hemicelulose (pentoses e hexoses) pode ser convertida em xilose (pentose) para a produção de furfural, que é uma molécula precursora para a produção de resinas, combustíveis, químicos e nylon. Por fim, a partir da lignina (polímero de fenol) podem ser produzido fenóis, gasolina, arenos e diesel. Por essa gama de possibilidades para produção não só de combustíveis, mas também os outros produtos acima relacionados, os

materiais lignocelulósicos tem sido considerado os mais promissores candidatos para substituir aqueles atuais baseados em petróleo (HUANG; FU, 2013).

O fluxograma da Fonte: adaptado de HUANG e FU (2013)

Figura 5 ilustra as possibilidades de obtenção de produtos a partir dos materiais lignocelulósicos em uma biorrefinaria.



Fonte: adaptado de HUANG e FU (2013)

Figura 5 – Produção de químicos e combustíveis

O primeiro passo para utilização de celulose é a despolimerização em oligossacarídeos e glicose solúveis. Entretanto, polímeros naturais são formados por estruturas cristalinas robustas com alta estabilidade química, fazendo a despolimerização um processo difícil (REGALBUTO JR, 2009).

Na literatura são citados alguns métodos já estabelecidos cujo objetivo é o de promover a desestabilização química da celulose. De acordo com SALVADOR; SANTOS; SARAIVA (2010), a primeira delas é conhecida como hidrólise enzimática cujo processo é catalisado por enzimas denominadas celulases. No entanto, é limitada pela baixa eficiência de conversão e o alto custo das enzimas. A segunda, hidrólise ácida, é catalisada por ácidos

minerais, com destaque para o sulfúrico e ácido clorídrico. Entretanto, além de também apresentar baixo rendimento, seu uso em larga escala enfrenta vários problemas como a corrosão dos equipamentos, a recuperação catalítica e a necessidade de tratamento dos resíduos dos ácidos, gerados em grande quantidade.

Muitas tecnologias de pré-tratamento associadas a estes ácidos também têm sido desenvolvidas para reduzir a cristalinidade da celulose e aumentar sua área superficial para melhorar a eficiência e seletividade da reação. A exemplo cita-se a moagem de bolas, solubilização/precipitação em líquidos iônicos, ácidos líquidos/alcalinos soluções, método do plasma atmosférico não térmico, dentre outros (ZHANG et al., 2010).

2.1.3. Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica

Conforme já mencionado anteriormente, o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica é um importante processo para a sua transformação em biocombustíveis e/ou bioprodutos. Isso porque a resistência estrutural inerente da lignocelulose à sacarificação enzimática dificulta a obtenção dos açúcares fermentáveis da lignocelulose bruta. O pré-tratamento interrompe a estrutura da lignocelulose e aumenta substancialmente o acesso das enzimas à hemicelulose e à celulose. Como resultado, a extensão e a taxa de sacarificação enzimática são aumentadas e os custos diminuem drasticamente.

ZHANG; PEI; WANG (2016) destacam que o pré-tratamento é essencial para alterar a estrutura da biomassa lignocelulósica, a fim de aumentar a digestibilidade enzimática e obter uma eficiente conversão de bioetanol. No entanto, não existe uma abordagem universal de pré-tratamento para a conversão de biomassa. Portanto, a escolha da abordagem ótima de pré-tratamento baseia-se em características das fontes de matérias-primas e produtos, bem como viabilidade econômica e impacto ambiental.

No pré-tratamento da biomassa lignocelulósica é necessário para reduzir a cristalinidade da celulose, aumentar a porosidade da biomassa e melhorar a acessibilidade enzimática (celulase) à celulose para melhorar a produção de açúcares fermentáveis (ZHANG; DOHERTY; O'HARA, 2017).

Além disso, um pré-tratamento eficaz além de aumentar a eficiência enzimática, deve minimizar as perdas de carboidratos e minimizar⁸⁷ a formação de subprodutos inibidores da

fermentação. Estes subprodutos geralmente são encontrados em hidrolisados e incluem o ácido fórmico, ácido acético, ácido levulínico, furaldeído 2-furaldeído (furfural), 5-hidroximetil-2-furaldeído (HMF), vanilina e outros aldeídos (PARAWIRA; TEKERE, 2011).

A escolha da abordagem de pré-tratamento depende das características das matérias-primas e dos produtos finais. Além disso, o pré-tratamento é reconhecido como um passo chave devido à sua influência essencial na maioria dos outros processos, incluindo requisitos de redução de tamanho, carga e taxas de hidrólise enzimática e toxicidade de fermentação (WYMAN et al., 2005).

A resistência estrutural inerente a da biomassa lignocelulósica às enzimas de sacarificação faz o custo dos açúcares fermentáveis da lignocelulose bastante onerosa. O pré-tratamento perturba essa estrutura e aumenta substancialmente o acesso enzimático à hemicelulose e celulose (WEINGARTEN et al., 2010). Como resultado, a taxa de sacarificação enzimática da lignocelulose melhora dramaticamente (ZHANG; DOHERTY; O'HARA, 2017).

A escolha da tecnologia de pré-tratamento e as condições de pré-tratamento selecionadas não impacta apenas sobre a sacarificação enzimática, mas também sobre a escolha da matéria-prima de lignocelulose, manuseio e processamento, composição e tamanho do vaso de pré-tratamento, eficiência da fermentação, carga e composição da enzima, eliminação de resíduos e oportunidades para gerar co-produtos (SELIG et al., 2007).

Portanto, o pré-tratamento é a tecnologia central em um sistema de produção com base na sacarificação enzimática da lignocelulose. Discussões recentes fornecem uma visão geral das diferentes abordagens para o pré-tratamento (HAUSSER; MARINKOVIC; ESTRINE, 2013).

As tecnologias de pré-tratamento podem ser categorizadas como químicas, físicas, biológicas ou suas combinações. Pré-tratamentos químicos são tipicamente conduzidos sob pressão a temperaturas significativamente acima do ponto de ebulição do solvente (por exemplo, água ou solventes orgânicos), com ou sem adição de catalisadores. Os pré-tratamentos físicos incluem a fragmentação mecânica (por exemplo, moagem de bolas e moagem de disco molhado), extrusão e irradiação (por exemplo, ultra-som, microondas, raios

γ). Pré-tratamentos biológicos geralmente empregam fungos que atuam por enzimas na degradação da lignina (KARATZOS; EDYE; DOHERTY, 2012).

Pré-tratamentos puramente físicos ou biológicos requerem entradas de energia relativamente elevadas ou pré-tratamento longos (dias ou semanas), para melhorar o rendimento da sacarificação a um nível comercialmente viável (ZHANG; DOHERTY; O'HARA, 2017).

No entanto, a maioria dos estudos de pré-tratamento recentes se concentrou em processos físico-químicos em que a biomassa lignocelulósica é desconstruída quimicamente e depois processada fisicamente para reduzir o tamanho de partícula (ZHANG et al., 2016).

Recentemente, pré-tratamentos de lignocelulose que utilizam solventes orgânicos (mais conhecidos como pré-tratamentos organosolv) têm sido estudados intensamente desde seu desenvolvimento na indústria de papel e celulose e tem sobressaído como uma das mais promissoras estratégias de pré-tratamento para aprimorar a sacarificação enzimática da lignocelulose (ZHANG; DOHERTY; O'HARA, 2017).

E é sobre esse tratamento, objeto de grande interesse deste estudo, que tratará detalhadamente o item a seguir, abordando os principais tipos de solventes orgânicos utilizados, suas interações com a biomassa, suas vantagens, desvantagens, enfatizando os dois solventes orgânicos utilizados neste trabalho: γ -valerolactona (GVL) e glicerol.

2.1.4. Pré-tratamento organosolv

O pré-tratamento organosolv é considerado o mais promissor pré-tratamento. As vantagens inerentes a esse processo incluem a separação de celulose de alta pureza, produção de lignina de alta qualidade e alta eficiência no fracionamento da hemicelulose quando comparado com os pré-tratamentos convencionais e recuperação de solvente orgânicos (ZHANG et al., 2016).

O mecanismo de pré-tratamento por organosolv inclui três tipos de reações químicas. No primeiro, a degradação da lignina ocorre a partir da clivagem da ligação éter na posição de carbono das cadeias laterais em condições de pré-tratamento de baixa e média intensidade para a clivagem da ligação do éter alfa-aril, condições graves para a clivagem da ligação do éter beta-aril (LI et al., 2012).

No segundo tipo de reação química, as ligações glicosídicas da hemicelulose e celulose são interrompidas originando oligossacarídeos e monossacarídeos de acordo com as condições de pré-tratamento de organosolv. Finalmente, os oligossacarídeos e monossacarídeos se desidratam para gerar furfural (de pentoses) e HMF (de hexoses), que se degradam ainda mais para formar ácido levulínico e ácido fórmico, respectivamente (KIM; PAN, 2010).

De acordo com a literatura, o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica com solvente orgânico ainda é uma abordagem pouco estudada, mas é uma área promissora e fortemente incentivada pelos seguintes motivos:

1) O solvente orgânico permite a separação de celulose em alta pureza com apenas uma pequena degradação. A celulose é recuperada como sólidos, enquanto a maior parte da lignina e hemicelulose é dissolvida no solvente. Conseqüentemente, o resultado da remoção de lignina e hemicelulose resulta na redução da recalcitrância e aumento da área de superfície da celulose, aumentando assim a acessibilidade enzimática à hidrólise e produção de bioetanol por fermentação (KOO et al., 2011).

2) A lignina de alta qualidade isolada pode diminuir o custo de vários produtos químicos porque tem uma ampla gama de aplicações industriais, incluindo adesivos e resinas específicas para revestimentos, construção, plastificantes de concreto para construções, materiais de fricção para produtos de freio de alto desempenho, graxa, entre outros (ARATO; PYE; GJENNESTAD, 2005).

3) O pré-tratamento com solvente orgânico demonstra maior eficiência no fracionamento de hemicelulose em comparação com tratamentos convencionais. A hemicelulose, que é quase completamente hidratada no pré-tratamento com solvente orgânico com alta concentração de ácido, pode ser convertida em bioetanol e outros produtos químicos de alto valor, tais como furfural e xilitol (ZHAO; CHENG; LIU, 2009).

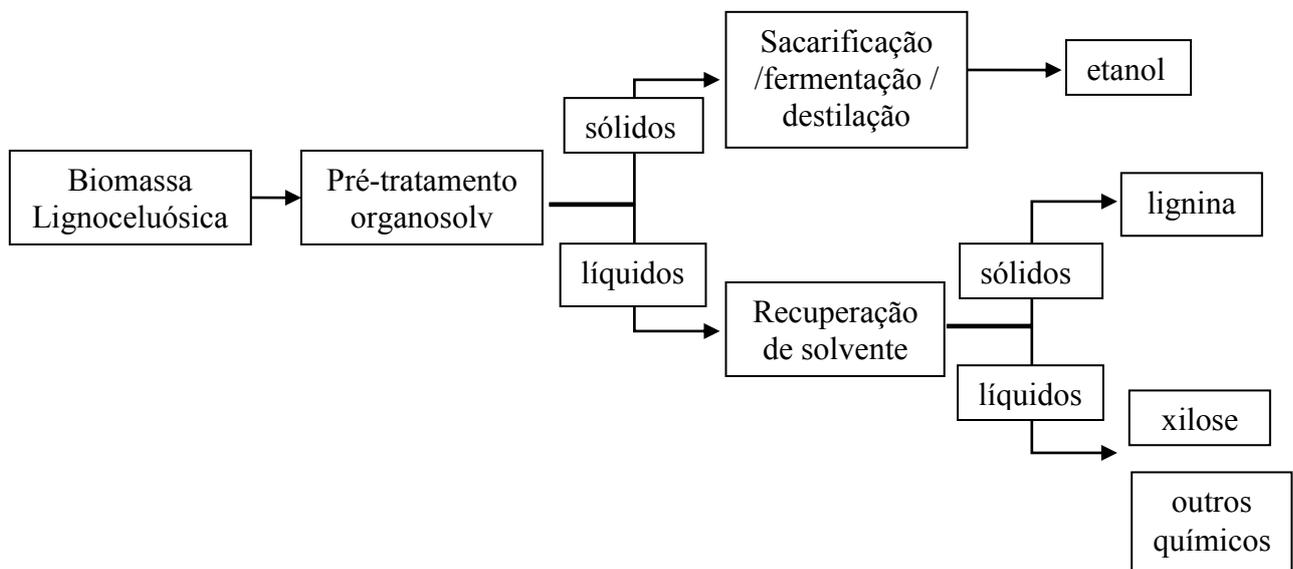
4) O pré-tratamento com solvente orgânico recupera rapidamente o solvente usando destilação e o reutiliza no pré-tratamento

5) O pré-tratamento com solvente orgânico possui relativamente baixo investimento. Como há obtenção de receita de alto valor dos subprodutos no pré-tratamento com solvente

orgânico, pequenas plantas podem ser construídas e em locais mais flexíveis (PYE et al., 2008).

Ainda de acordo com ZHANG; PEI; WANG (2016), no pré-tratamento com solvente orgânico, as ligações internas de lignina e hemicelulose são quebradas, separando a biomassa lignocelulósica em frações macromoleculares principais: celulose, hemicelulose e lignina.

A Figura 6 mostra como ocorrem as duas separações fundamentais no pré-tratamento por organosolventes:



Fonte: adaptado de ZHANG; PEI; WANG, (2016)

Figura 6 – Fluxograma do pré-tratamento por solvente orgânico

Primeiro, a biomassa lignocelulósica é tratada com solvente orgânico a altas temperaturas e pressões por um tempo específico. A maior parte da lignina e hemicelulose se degrada em fragmentos de pequeno peso molecular, dissolvendo-se no solvente. A celulose é separada e fica altamente suscetível à hidrólise enzimática e à fermentação. A segunda separação é conseguida por diluição, secagem e precipitação de líquidos ricos em lignina para recuperação e depois reciclagem do solvente para o pré-tratamento. A xilose e a lignina de alta pureza, com potencial para várias aplicações industriais, são obtidas na segunda separação. Durante o pré-tratamento com solvente orgânico, são adicionados catalisadores ácidos para aumentar a taxa de remoção de lignina e diminuir a temperatura de pré-tratamento porque os catalisadores ácidos clivam as ligações facilmente degradadas por ácidos (ligações

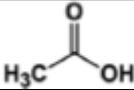
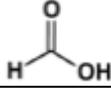
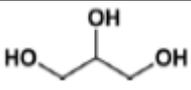
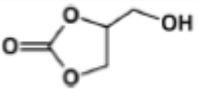
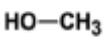
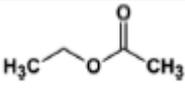
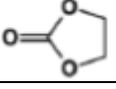
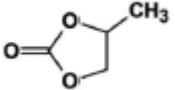
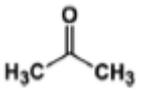
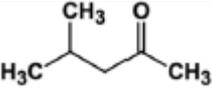
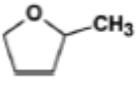
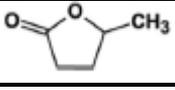
éter aril e arilglicerol-beta-aril) para ajudar a estabilizar os fragmentos de lignina (GHOZATLOO; MOHAMMADI-ROVSHANDEH; HASHEMI, 2006).

Os ácidos minerais (ácidos clorídrico, sulfúrico e fosfórico) e ácidos orgânicos (ácidos oxálico, acetilsalicílico e salicílico) também podem ser utilizados como catalisadores no pré-tratamento com solvente orgânico (SUN; CHENG, 2002). Uma grande variedade de solventes orgânicos com ou sem catalisadores tem sido utilizado para estudar o pré-tratamento variando de temperatura ambiente à 240°C (ZHANG; PEI; WANG, 2016).

O conhecimento dos impactos dos solventes orgânicos em escala microscópica na biomassa pré-tratada é limitado. No entanto, em uma escala macroscópica as propriedades do solvente, como a viscosidade e o tamanho da molécula (volume molar), são importantes para as interações com o substrato no pré-tratamento. A penetração de solvente nos poros resulta em mudanças físicas da biomassa e a arquitetura do substrato é importante para a desconstrução da lignocelulose. Outras propriedades dos solventes que possuem importante relação com o pré-tratamento, incluem alteração da polaridade pelo íon hidrogênio. O desempenho do solvente é classicamente correlacionado pelos parâmetros de solubilidade e solvatocrômico. A polarização é mensurada empiricamente como oposição à medida direta da constante dielétrica do solvente (ZHANG et al., 2016).

A Tabela 2 mostra a comparação dos principais solventes orgânicos utilizados no tratamento de biomassa lignocelulósica no que diz respeito à suas estruturas químicas e constantes físicas.

Tabela 2 – Estruturas e constantes físicas para seleção de solvente orgânico para pré-tratamento

Solvente	Estrutura química	Classificação ^b	Constantes físicas		
			Ponto de ebulição, °C	Ponto de ignição, °C	Pressão de vapor, Pa
Etanol		Antiprótico	78,3	13	5900 (20° C)
Butanol		Antiprótico	117,7	35	800 (20° C)
Ácido acético		Polar estruturado	117,9	43-44,5	1530 (20° C)
Ácido fórmico		Polar estruturado ^a	101	68,9	4200 (20° C)
Etileno glicol		Polar estruturado	197	111,1	8 (20° C)
Glicerol		Polar prótico	290	160	3 (50° C)
Glicerol carbonato		Polar prótico ^a	137-140	110	Não disponível
Metanol		Polar prótico	64,5	11-12	12800 (20° C)
Acetato de etil		Dipolar aprótico	77,1	-4	7300 (20° C)
Tetrahidrofuran THF		Dipolar aprótico	66	-14	17600 (20° C)
Carbonato de etileno		Dipolar altamente aprótico ^a	243	160	2 (20° C)
Carbonato de propileno		Dipolar altamente aprótico	241,7	132	4 (50° C)
Acetona		Dipolar altamente aprótico	56,1	-17	24000 (20° C)
Metil isobutil cetona -MIBK		Dipolar altamente aprótico ^a	117,5	17,8	800 (20° C)
2-Metiltetra-hidrofurano - 2-MTHF		Dipolar altamente aprótico ^a	80	-11,11	Não disponível
γ valerolactona GVL		Dipolar altamente aprótico ^a	207	81	Não disponível

Exceto onde indicado, são fornecidas constantes físicas para materiais a 25 ° C e 100 kPa, e ponto de ebulição, permissividade relativa, pressão de vapor e a toxicidade foi tirada de MARCUS (1993). ^a Previsões de ZHANG et al. (2016). ^b Extraído de DURAND et al. (2011).

Fonte: adaptado de ZHANG et al. (2016).

Apesar dos parâmetros já citados serem importantes na definição do tipo solvente orgânico a ser aplicado em um determinado pré-tratamento, o parâmetro de solubilidade “Hildebrand”, possivelmente é o mais utilizado e é obtido experimentalmente a partir de medidas de viscosidade, determinando o poder de dissolução do solvente (DURAND et al., 2011).

Se o valor desse parâmetro for similar ao do substrato, então espera-se uma boa dissolução. Esses parâmetros ainda não estão disponíveis para a celulose e a lignocelulose, mas para a lignina o valor estimado é de 22,5 o qual está próximo de muitos organosolventes, o que explica o comportamento deles em relação a ela. No entanto, aspectos de engenharia, tais como custo e facilidade de recuperação, têm que serem levados em conta na escolha do solvente adequado. Da mesma forma, outras questões como a saúde (ex. toxicidade), segurança (ex. pressão de vapor) e impactos ambientais também são importantes e devem ser levados em consideração (ZHANG et al., 2016).

ZHANG; PEI; WANG (2016) também ressaltam que a escolha do pré-tratamento baseia-se em características da matéria-prima e dos produtos, bem como viabilidade econômica e impacto ambiental.

A Tabela 3 apresenta alguns organosolventes com seus respectivos parâmetros de solubilidades e classificação no que se refere à saúde, segurança e meio ambiente:

Tabela 3 – Parâmetro de solubilidade e classificação dos solventes

Solvente	Parâmetro de solubilidade “Hildebrand”	Classificação do solvente ^b		
		Saúde	Segurança	Meio Amb. ^c
Etanol	26,5	4	3	4,0
Butanol	23,1	3	5	4,3
Ácido acético	21,4	3	6	5,0
Ácido fórmico	24,9	2	6	5,3
Etileno glicol	32,9	3	3	4,3
Glicerol	36,1	-	-	-
Glicerol carbonato	-	-	-	-
Metanol	29,6	3	5	5,0
Acetato de etil	18,1	5	4	4,7
THF	19,4	5	6	4,7
Carbonato de etileno	29,6			
Carbonato de propileno	27,2			
Acetona	20,0	4	4	4,3
MIBK	17,0	5	6	4
2-MTHF	17,4	5	6	4
GVL	23,1	-	-	-

Parâmetros e classificação: JESSOP et al. (2012) e MÄKI-ARVELA et al. (2010), classificação: ^b Valores obtidos da Sociedade Americana de Química, Instituto de Química Verde. ^c Média de pontuação de impacto de ar, água e resíduos.

Fonte: adaptado de ZHANG et al. (2016)

Dentre todos os solventes orgânicos, os álcoois são os mais utilizados para o pré-tratamento de biomassa. Aqueles que possuem baixo ponto de ebulição, baixo custo e facilidade de recuperação como o etanol e o metanol, tem sua utilização favorecida. Contudo, os álcoois com alto ponto de ebulição, como o etileno glicol e o glicerol, oferecem baixas demandas de temperatura e pressão, mas aumentam o consumo de energia para serem recuperados. Na utilização de álcoois como organosolventes, a biomassa lignocelulósica de tamanho reduzido "cozinha" o líquido de reação a elevadas temperatura e pressão com ou sem catalisadores. Grandes hemiceluloses e polímeros de lignina são divididos em pequenos fragmentos que se dissolvem no licor quente. Além disso, o ácido acético, furfural, vários açúcares de hexose e pentose e extrações lipofílicas da biomassa aparecem no licor quente. A filtração é empregada para obter sólidos como celulose recuperada. O licor resultante, também chamado de licor preto, é rico em lignina e hemicelulose. Os sólidos são lavados com solvente quente e água para posterior sacarificação e fermentação para bioetanol. O licor preto

é evaporado e condensado para recuperação do solvente e o licor preto concentrado é misturado com água acidificada para a precipitação de lignina. Filtração e destilação adicionais são aplicadas para separar o furfural, extrativo, ácido acético e xilose (ZHANG; PEI; WANG, 2016)

Normalmente, as condições do pré-tratamento com álcool variam com base nas características da biomassa, mas podem ser geralmente categorizadas nas seguintes faixas: temperatura de cozimento de 180-195 ° C; tempo de cozedura de 30-90 min; concentração de solvente alcoólico de 35-70% (m/m); uma proporção de licor para sólidos de 10-25% (m/m). O pH do licor varia de pH 3,8 a pH 2,0 (ARATO; PYE; GJENNESTAD, 2005).

Os catalisadores são comumente usados em condições brandas para auxiliar o pré-tratamento. Os mais utilizados são o ácido sulfúrico, acético, ácido fórmico, alcalino (hidróxido de sódio - NaOH) e metal terra rara neutro. No pré-tratamento sem catalisadores, é necessária uma temperatura de cozimento elevada (> 185° C) para acidificar o licor solvente por grupos acetil libertados pela hidrólise da hemicelulose.

Um estudo de revisão feito por ZHANG et al. (2016) mostrou que os catalisadores ácidos são os mais utilizados em pré-tratamento utilizando etanol como solvente orgânico, pois proporcionam uma maior digestibilidade de glucano quando comparado com a não adição ou quando catalisado por base. Além disso, reduzem a temperatura e tempos de reação. Revelou ainda que a melhora na digestibilidade de glucano com a adição de catalisador ácido não depende dos aumentos na eficiência de deslignificação e sim de uma redução no grau de polimerização da celulose (com um aumento contábil nas "extremidades" da cadeia de celulose acessíveis às enzimas), redução do comprimento médio da fibra e aumento da porosidade do substrato da biomassa pré-tratada obtida em condições ácidas. Todos estes efeitos podem levar a uma maior acessibilidade de celulose às enzimas hidrolíticas.

O estudo também relatou que o uso de ácidos orgânicos ou sais inorgânicos como catalisadores durante o pré-tratamento oferece a oportunidade de reduzir significativamente a corrosão, um parâmetro chave para a ampliação da tecnologia de pré-tratamento do laboratório para a escala comercial. (DEL RIO; CHANDRA; SADDLER, 2010)

Uma avaliação de seis sais inorgânicos (FeCl_3 , $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, FeSO_4 , AlCl_3 , $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, MgSO_4) como catalisadores para o pré-tratamento com etanol de palha de cevada revelou que

o FeCl_3 é o mais eficaz e melhora a digestibilidade de glucano na fibra residual em aproximadamente 30% quando comparado com 1% de H_2SO_4 . Além disso, melhorou a eficácia do pré-tratamento ao catalisar a desidratação de carboidratos e também reduziu a formação de produtos da degradação de carboidratos, furfural e HMF, devido à acidez reduzida (KIM et al., 2010).

Os catalisadores ácidos orgânicos também apontaram valores significativos nos sistemas de pré-tratamento organosolv. A presença de ácido acético durante o pré-tratamento de bagaço de eucalipto reduziu o teor de etanol exigido em mais de 80% sem aumentar a pressão de reação inicial ou afetar negativamente a digestibilidade de glucano (TERAMOTO; LEE; ENDO, 2009).

A combinação deste processo com moagem de bolas melhora ainda mais a digestibilidade do glucano, embora a alta demanda de energia durante o pré-tratamento físico exclua a aplicação industrial prática (ZHANG et al., 2016).

A concentração de etanol também é outro fator significativo na deslignificação na presença de um catalisador ácido. Em menores concentrações de etanol em catálise ácida, ocorre a clivagem das ligações α e β -éter na lignina e produz fragmentos de lignina com pesos moleculares menores que se tornam solúveis, enquanto concentrações mais altas de etanol aumentam a solubilização da lignina sem necessariamente ocorrer essa fragmentação (NI; HU, 1995).

Clivagem das ligações éter β -O-4 (da glicose) é o passo principal para a despolimerização da lignina em várias biomassas, incluindo a gramínea "*miscanthus*" e "*kanlow switchgrass*", um tipo de pinheiro denominado "*loblolly pine*" e uma planta florífera denominada "*buddleja davidii*" com soluções de etanol acidificado (HALLAC; PU; RAGAUSKAS, 2010).

No entanto, HAGE et al. (2010) relataram a clivagem de ligações α -éter como a causa primária da despolimerização de lignina com etanol catalisado por ácido durante o pré-tratamento de *miscanthus*. Por outro lado, HAGE et al., (2009) consideraram uma conclusão precoce e inconsistente, apesar das condições de reação similares. Isto pode ser porque as ligações α -éter são mais fracas que as ligações β , e assim são mais fáceis de decompor, mas não conduz necessariamente à despolimerização.

SANNIGRAHI; RAGAUSKAS; MILLER (2010) observaram que no pré-tratamento de biomassa com etanol catalisado por ácido, aumentaram a desidratação das cadeias laterais e condensação da lignina na biomassa de “*miscanthus*”. Relataram também que aumentou a concentração dos grupos fenóis e diminuiu a massa molecular dos fragmentos de lignina. No entanto, a estrutura da lignina central não foi alterada. Embora tenha sido formada lignina altamente condensada durante o pré-tratamento, a eficiência da deslignificação não foi prejudicada.

Apesar da deslignificação ser a principal característica do pré-tratamento do etanol, o processo também tem impactos na celulose e na hemicelulose, apesar dos efeitos não serem uniformes. Por exemplo, o aumento da cristalinidade da celulose foi observado após o pré-tratamento com ácido-etanol como resultado da hidrólise da hemicelulose amorfa, da celulose e remoção da lignina na biomassa de pinheiro (PAN et al., 2008).

Em contraste, a cristalinidade da celulose permaneceu efetivamente inalterada após o pré-tratamento com ácido e etanol em biomassa de gramínea em condições similares de pré-tratamento anteriormente descrito (CATETO; HU; RAGAUSKAS, 2011).

A remoção da hemicelulose e as alterações na estrutura da celulose são tão importantes quanto a deslignificação quando se considera a eficiência da sacarificação enzimática da celulose na biomassa lignocelulósica pré-tratada com etanol. Por exemplo, a conversão da cristalinidade dimorfa da celulose (I α e I β) para formas para-cristalinas e amorfas mais facilmente degradáveis com uma diminuição do grau de polimerização - DP tem sido observada durante o pré-tratamento de biomassa com etanol (HALLAC et al., 2010).

Por outro lado, não há correlação entre a digestibilidade de glucano e a deslignificação da biomassa de palmeira ou solubilização de hemicelulose em madeira de eucalipto durante o pré-tratamento com etanol (GOH et al., 2011).

De uma forma geral, os estudos abordados nessa revisão confirmam que a acessibilidade das enzimas de sacarificação de celulose a seu substrato é afetada pela deslignificação, tamanho de partícula, remoção de hemicelulose e/ou porosidade da biomassa. Estes são fatores chave que determinam a digestibilidade do glucano na biomassa pré-tratada com etanol (ROLLIN et al., 2011).

O ácido acético e o ácido fórmico são os co-solventes de ácido orgânico mais estudados para o pré-tratamento de biomassa organossolvido. O ácido acético e o ácido fórmico têm pontos de ebulição de 118 ° C e 100,8 ° C, respectivamente. Como resultado, os pré-tratamentos de biomassa que utilizam esses co-solventes podem ser conduzidos em temperaturas relativamente baixas (isto é, perto de seus pontos de ebulição) sob pressão atmosférica (FERRER et al., 2013).

Ácido fórmico e ácido acético reagem com peróxido de hidrogênio para formar peroxiforme ácido e ácido peroxiacético (ácido peracético). Estes ácidos peroxílicos são oxidantes fortes e agentes de deslignificação muito eficazes; Como resultado, o ácido fórmico e o ácido acético, em combinação com o peróxido de hidrogênio, têm sido usados no pré-tratamento / polpação de biomassa (ZHAO et al., 2014).

O pré-tratamento com organossolv ácido orgânico pode ser realizado com ou sem catalisador de ácido mineral ou na presença de peróxido de hidrogênio. No entanto, deve-se notar que a esterificação (ou seja, formilação) da celulose durante o pré-tratamento do ácido fórmico pode limitar a digestibilidade da celulose apesar da remoção de lignina e hemicelulose (ZHAO; CHENG; LIU, 2009)

Enquanto a digestibilidade da celulose após o pré-tratamento do ácido fórmico pode ser melhorada pela deformilação alcalina, a melhora na digestibilidade do glucano decorrente da deformilação pós-tratamento depende da extensão da formilação que, por sua vez, depende da concentração de ácido fórmico usada durante o pré-tratamento (ZHAO; CHENG; LIU, 2012).

Combinações de ácidos orgânicos também são usadas para organossolução, pré-tratamento de biomassa lignocelulósica. Por exemplo, VANDERGHEN et al., (2012) predizem a digestibilidade máxima da celulose de 75,3% em biomassa de *miscanthus giganteus* após pré-tratamento com uma mistura de ácido fórmico e ácido acético usando análise de superfície de resposta.

Combinando misturas de ácidos orgânicos para pré-tratamento e deslignificação pós-tratamento com H₂O₂, SNELDERS et al., (2014) demonstraram 95,5% de deslignificação da palha de trigo. O pré-tratamento otimizado de ácido peracético de estágio único do bagaço de

cana-de-açúcar é capaz de fornecer 82% de digestibilidade do glucano (ZHAO; WANG; LIU, 2008)

ZHAO; WU; LIU (2011) combinaram pré-tratamento ácido peroxílico com pré-tratamento alcalino em um processo de dois estágios, o que reduz a quantidade de ácido peroxílico requerido de 50% em peso a 15% em peso mas melhorou a digestibilidade de glucano para 90%.

Os ácidos orgânicos como ácido fórmico e ácido acético para tratamento de biomassa podem ser utilizados à pressão atmosférica, mas causam corrosão e acetilação de celulose (ESPINOZA-ACOSTA et al., 2014). Além disso, o custo do perácido orgânico limita o pré-tratamento em grande escala, embora remova seletivamente a lignina em condições moderadas. Outros tipos de solventes orgânicos, como a acetona (ARAQUE et al., 2008) e a dimetilformamida (DMF) também tem sido estudados para o pré-tratamento da lignina (GHOZATLOO; MOHAMMADI-ROVSHANDEH; HASHEMI, 2006).

2.1.4.1. Pré-tratamento de biomassa utilizando glicerol

O glicerol é um organosolvente não tóxico, viscoso e pode ser produzido por saponificação de triglicerídeos em gorduras e óleos ou a partir de propileno via sintética. O glicerol bruto é produzido como subproduto do biodiesel e o aumento da produção deste, tem reduzido significativamente o custo de produção do glicerol. Este composto já tem sido usado a algum tempo como solvente para isolamento da lignina oriunda de madeira e como agente de cozimento. No entanto, sua utilização como organosolvente para o pré-tratamento de biomassa para melhorar a hidrólise enzimática é relativamente nova (ROMANI et al., 2013).

O glicerol pode ser usado sozinho como organosolvente ou combinado com catálise alcalina para pré-tratamentos de biomassa lignocelulósica para produzir sólidos prontamente digestíveis. Entretanto, é mais frequentemente utilizado em catálise ácida (HUNDT; SCHNITZLEIN; SCHNITZLEIN, 2013).

Em uma revisão de literatura, ZHANG et al. (2016) apresentaram os resultados do pré-tratamento à base de glicerol em diferentes biomassas e mostraram melhorias na digestibilidade da celulose. As condições de experimentos e resultados dessa revisão são apresentadas nos parágrafos seguintes:

Na ausência de catalisador, SUN; CHEN (2008a) observaram que é necessária uma temperatura de reação de 220°C e um tempo de reação de 3h sob pressão atmosférica para obter remoção de hemicelulose de 70%, deslignificação de 65% e digestibilidade de glucano a 90% após o pré-tratamento de palha de trigo com glicerol bruto que continha impurezas como água, sais e outros. O pré-tratamento atmosférico de palha de trigo com 220°C por 3h leva à digestão de celulose de 72-75% (SUN; CHEN, 2008b).

Do mesmo modo, a digestibilidade de glucano de 98% e a deslignificação de 64,3% da madeira de eucalipto só foi alcançada após aproximadamente 70 minutos de pré-tratamento a 200°C em glicerol na ausência de catalisador (ROMANI et al., 2013).

Na presença de 10% de KOH, o pré-tratamento de madeira macia a 210°C durante 15 min leva a uma digestibilidade de celulose de 97% enquanto o pré-tratamento de madeira dura a 190°C durante 15 minutos resultou na digestibilidade da celulose de 95% (HUNDT; SCHNITZLEIN K.; SCHNITZLEIN M., 2013)

Em comparação com o pré-tratamento da biomassa por glicerol com catalise básica, a catalise ácida requer temperaturas de pré-tratamento relativamente baixas e/ou tempos de pré-tratamento relativamente baixos e/ou concentrações relativamente baixas de catalisador para obter maior digestibilidade de glucano. O pré-tratamento eficiente da biomassa lignocelulósica com glicerol acidificado geralmente requer temperaturas de reação de menor que 200°C (ZHANG et al., 2013).

Por exemplo, MARTÍN et al. (2011) chegaram a uma digestibilidade de glucano de 90% no bagaço de cana-de-açúcar após o pré-tratamento em glicerol a 190°C durante 60 minutos com H₂SO₄ a 0,94%. A combinação de glicerol acidificado e irradiação de microondas reduziram ainda mais os tempos de reação.

LIU et al. (2010) chegaram a rendimentos de açúcares redutores totais de 79% após apenas 6 min de pré-tratamento na biomassa de cedro japonês a 180°C na presença de HCl acidificado a 0,1%. O HCl é mais eficaz como catalisador para processos de pré-tratamento com glicerol do que outros ácidos, incluindo H₂SO₄ por causa de sua baixa pKa (~ -6) e, portanto, alta acidez.

ZHANG et al. (2013) avaliaram em escala de laboratório (4 g de massa seca em 40 g líquido) o pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar a temperaturas relativamente baixas (≤ 130 ° C) utilizando glicerol acidificado. O pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com glicerol contendo $\leq 20\%$ de água e 1,2% de HCl a 130°C durante 60 min resultou em fibras com digestibilidade de glucano $\geq 88\%$, apesar da deslignificação relativamente baixa ($< 40\%$). Além disso, demonstraram o pré-tratamento de glicerol acidificado na escala-piloto num reator horizontal agitado e, apesar de uma redução significativa no tempo de reação (de 60 min a 15 min), a da concentração de catalisador ácido (de 1,2% a 0,4% de HCl) e a relação líquido/sólido (de 10:1 para 6:1), conseguiram obter uma digestibilidade de glucano (90%) comparável com a obtida na escala laboratorial. Atribuíram a maior eficiência do pré-tratamento na escala piloto o melhoramento da mistura e transferência de calor obtida no reator horizontal.

Por conseguinte, investigaram o efeito do pré-tratamento sobre a sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar por misturas de enzimas complexas e simples. O bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com glicerol acidificado (0,4% em peso de HCl) e a explosão de vapor subsequente foram sacarificados mais facilmente com uma mistura binária de celulase (CBH I e β G) do que o pré-tratado com ácido diluído ou NaOH combinado com explosão de vapor

Esses resultados indicaram que o pré-tratamento de glicerol acidificado oferece a oportunidade de simplificar a complexidade das misturas de enzimas necessárias para a sacarificação da biomassa lignocelulósica, o que pode levar a uma redução significativa no custo do processo. Além disso, gerou níveis mais baixos de produtos de degradação do açúcar (furfural e HMF) do que o pré-tratamento somente com ácido diluído (sem glicerol) a um nível similar de digestibilidade de glucano. Os baixos níveis de produtos de degradação de açúcar podem ser devidos à produção de glicerol e derivados de carboidratos, que protegem a degradação dos açúcares.

O glicerol como pré-tratamento organosolv funciona através de uma classificação de deslignificação, redução de tamanho de partícula e melhoria do acesso de celulase à celulose. Espera-se que os mecanismos de deslignificação no pré-tratamento com glicerol sejam semelhantes aos outros processos organosolv; isto é, clivagem de ligações de éter aril em lignina e clivagem de ligações éter entre carboidrato e lignina. No entanto, informações detalhadas sobre a extensão da clivagem dessas ligações e a condensação de lignina não estão

disponíveis. A deslignificação com pré-tratamento de glicerol catalisado com ácido é geralmente menor do que a obtida com o pré-tratamento de etanol catalisado por ácido ou EG130 para atingir o nível similar de digestibilidade de celulose. A solubilidade relativamente baixa da lignina no glicerol é a causa mais provável para esta observação (SONG et al., 2013).

O comprimento médio da partícula de biomassa do bagaço pré-tratado acidificado com glicerol é muito menor do que o bagaço pré-tratado acidificado. Os módulos de ligação a carboidratos (CBMs) são domínios de proteínas que desempenham um papel fundamental na mediação da ligação de celulase à celulose (SHOSEYOV; SHANI; LEVY, 2006).

Os CBMs recombinantes foram utilizados para sondar a acessibilidade da enzima em madeira macia pré-tratada com glicerol acidificado e os resultados indicam que a acessibilidade da celulase (e, portanto, digestibilidade de glucano) no resíduo resultante é maior que a obtida de outros pré-tratamentos de polioliol, incluindo EG (LIU et al., 2010).

2.1.4.2. Pré-tratamento de biomassa utilizando γ -valerolactone (GVL)

O γ -valerolactona (GVL) pode ser obtido a partir de biomassa e apresenta melhorias significativas no desempenho da reação em comparação com meio aquoso, tais como aumento da atividade catalítica e maior seletividade para o desejado produto de reação (LUTERBACHER et al., 2014).

Por exemplo, altos rendimentos de ácido levulínico (~70%) a partir de celulose usando GVL como solvente foram obtidos usando Amberlyst 70 como catalisador em comparação com rendimentos de 20% obtidos em água (ALONSO et al., 2013).

Além disso, significativos aumentos de seletividade foram alcançados usando GVL como solvente em comparação com reações em água para a conversão de açúcares C5 e C6 em seus correspondentes componentes furânicos furfural e HMF que são valiosos compostos precursores (QI et al., 2014b).

Em um estudo que avaliou a taxa de hidrólise da celobiose utilizando GVL em diferentes proporções com água, MELLMER et al. (2014) verificaram que houve tendência exponencialmente crescente com o aumento da concentração de GVL. Por exemplo, a constante da taxa de hidrólise para a conversão de celobiose em GVL-H₂O (4: 1) mostrou um

aumento significativo de 31 vezes em comparação com o valor somente em H₂O nas mesmas condições de reação. Assim, concluíram que a taxa de hidrólise da celobiose catalisada por ácido é aumentada significativamente usando GVL como solvente, promovendo a taxa crescente de clivagem de ligação β (1 \rightarrow 4).

Esses mesmos autores também estudaram a hidrólise de celulose em polímeros de glucose usando GVL como solvente e água em condições similares ao estudo com a celobiose. Os resultados também mostraram um aumento da hidrólise da celulose em glucose de 25 vezes maior na proporção de GVL-H₂O (4: 1) quando comparado com somente com a água.

FANG e SIXTA (2015) realizaram um trabalho utilizando GVL e água no pré-tratamento de pó de madeira com o objetivo de recuperar celulose da fração de madeira, açúcares da hemicelulose e lignina pura. As variáveis foram a porcentagem de água no sistema (35 a 50%), temperatura (150 a 170° C), tempo de reação e catalizador ácido. Alcançaram resultados de 90,5% de pureza de celulose, média de 40% da lignina recuperada por precipitação simples em água. O restante da lignina poderia ser recuperada através da extração líquido-líquido usando, por exemplo, acetato de etila. O tempo de reação pode ser reduzido por menos da metade do tempo quando adicionado o catalizador ácido sem que os resultados alterassem significativamente.

Recentemente LUTERBACHER et al. (2015) relataram um processo não enzimático alternativo para despolimerizar a biomassa usando γ -valerolactona (GVL) como solvente. Neste processo, uma mistura contendo 80% em peso ou mais de GVL, água e 2% ou menos de H₂SO₄ foi usada para recuperar 70-90% de polissacarídeos de biomassa como açúcares solúveis e 85-95% de produtos identificáveis como produtos de desidratação (furfural, 5 - (hidroximetil) furfural e ido levulico). A produção de carboidratos na presença de GVL é melhor em comparação com a conversão em água pura devido aos efeitos favoráveis do solvente sobre a cinética de hidrólise e desidratação catalisada por ácido envolvida nos sistemas de carboidratos.

(LUTERBACHER et al., 2015b) A abordagem baseada em GVL pode ser usada em paralelo com o aprimoramento da lignina para produzir carboidratos solúveis com alto rendimento (~70%) a partir de biomassa sem o uso de enzimas, líquidos iônicos ou ácidos

concentrados. A lignina foi isolada após uma etapa inicial de hidrólise em que a palha de milho foi tratada em um reator em batelada de alta concentração de sólidos a 393 K por 30 min em uma mistura de solvente consistindo de 80% em peso de GVL e 20% em peso de água.

Em trabalho anterior estes mesmos autores usaram misturas de γ -valerolactona (GVL), água e H_2SO_4 a baixa concentrações para despolimerizar a fração de carboidratos biomassa. Segundo os autores, o GVL catalisado por ácido promove a desconstrução da biomassa à açúcares, aumentando a taxa de reações melhor que tratamentos concorrentes utilizando líquidos iônicos. O aumento da hidrólise dos polissacarídeos foi alcançada devido ao efeito do GVL na solvatação do próton e sua seletividade na diminuição da barreira de ativação na hidrólise dos polissacarídeos quando comparado com outros métodos utilizados na hidrólise ácida (LUTERBACHER et al., 2014).

Solventes orgânicos como a γ -valerolactona (GVL) têm sido mostrado para aumentar as taxas de sacarificação, dissolvendo a lignina e aumentando a atividade de prótons ácidos (MELLMER et al., 2014). O sistema GVL-água mostrou que os sistemas aumentam a produção de glicose durante o sacarificação para perto de 80%, que foi duas vezes tanto quanto o rendimento obtido com o sistema idêntico água (LUTERBACHER et al., 2014).

Tendo em vista as citações encontradas na literatura sobre as vantagens de se utilizar tanto o GVL quanto o glicerol como organosolventes, este trabalho propôs a utilização de ambos em conjunto com o intuito de verificar se isso potencializaria a desconstrução da biomassa e conseqüentemente a digestibilidade da glicose quando comparado com cada um de forma individual.

2.1.5. Recuperação dos solventes pós pré-tratamento

De acordo com CONSULTANT (1987) solventes usados são um dos tipos mais comuns de resíduos perigosos, bem como um dos problemas ambientais mais frequentes. Mesmo que esses produtos químicos sejam relativamente fáceis de reciclar e reutilizar, muitas vezes os custos para isso favoreceram o descarte em vez de recuperação. A situação está mudando rapidamente, no entanto, devido a novos requisitos regulamentares, nova disposição econômica, e uma maior conscientização por parte dos geradores sobre as vantagens da reciclagem.

Ainda de acordo com o mesmo autore, dentre essas vantagens cita-se a redução da quantidade de material a ser descartado; redução da responsabilidade do transporte e eliminação fora do local; e redução na compra de solventes virgens. No entanto, algumas desvantagens são citadas, tais como: gasto de tempo e mão-de-obra especializada para avaliar, desenvolver e testar as opções de recuperação; gastos de capital nos sistemas operacionais, manutenção, treinamento e gerenciamento; novos riscos podem ser incorridos, como o aumento da exposição dos trabalhadores a possíveis solventes tóxicos, incêndios, derramamentos, vazamentos, etc; a recuperação no local pode contribuir para outras liberações ambientais, como emissões atmosféricas e/ou aumento de águas residuais;

Segundo CONSULTANT (2010) em 2007 foram geradas 119.000 toneladas de resíduos perigosos na Irlanda foram solventes orgânicos e, dessas, 55.400 toneladas foram exportadas para recuperação ou descarte. Esta geração está relacionada principalmente ao setor farmacêutico e em quantidades muito menores, aos setores de fabricação de tintas, eletrônicos e dispositivos médicos. No entanto, de acordo com o Plano Nacional de Gestão de Resíduos Perigosos da Agência de Proteção Ambiental (EPA) 2008-12, deve-se reduzir a exportação e aumentar o tratamento interno de resíduos perigosos. Mas para isso é necessária ter capacidade e instalações de tratamento de solventes.

No que se refere à recuperação do GVL, MEHDI et al. (2008) relataram em seu trabalho que sua recuperação é simples e eficiente, pois não forma um azeótropo com água; o último pode ser removido por destilação, o que resulta em um processo que demanda menos energia para a reciclagem que o etanol por exemplo.

De acordo com LUTERBACHER et al. (2015a) a modelagem econômica inicial do processo de pré-tratamento revelou que uma variável-chave para tornar o processo economicamente viável é a separação bem-sucedida e a reciclagem do solvente GVL. Relataram em seu trabalho que uma separação bem-sucedida foi obtida pela adição de CO₂ líquido, que formou uma fase de GVL expandida com CO₂ que, diferente do GVL puro, não é mais solúvel com água. Esta adição de CO₂ concentra os açúcares 4 a 5 vezes na fase aquosa usando um processo de separação e reutilização de GVL com baixo consumo de energia. No entanto, as altas pressões (> 5 MPa) envolvidas no processo de separação de CO₂ podem levar a problemas de segurança e aumento de custos com equipamentos e energia, o que os levou a explorar soluções de separação alternativas.

Uma técnica de extração líquida de CO₂ modificada foi utilizada por SHUAI; QUESTELL-SANTIAGO e LUTERBACHER (2016) para avaliar a recuperação de GVL da suspensão de pré-tratamento. A técnica envolveu bombear CO₂ líquido continuamente a alta pressão e recuperando GVL continuamente em um vaso de baixa pressão conectado. Mais de 99,5% do GVL foram recuperados e quase todos os açúcares, lignina e material sólido ficaram na fase aquosa. Apenas uma quantidade insignificante dos açúcares solubilizados (0,3 a 1%) foram extraídos na fase CO₂-GVL. A recuperação dos açúcares foi melhorada em comparação com o sistema descontínuo usado anteriormente (0,3-1% vs. 10-20%) e isso se deve provavelmente à redução da mistura inversa das fases GVL-CO₂ e aquosa na configuração contínua (LUTERBACHER et al., 2014). Em resumo, a extração de CO₂ deixou todos os açúcares no substrato e levou a uma maior concentração final de açúcar, simplificando o processo de recuperação do GVL. Em contraste, a lavagem com água poderia separar o xilano do glucano, mas exigiria medidas adicionais para recuperar o GVL do licor diluído (SHUAI; QUESTELL-SANTIAGO; LUTERBACHER, 2016).

Uma consideração importante do ponto de vista econômico é a recuperação e reciclagem do sistema solvente. O GVL, que pode ser feito a partir de biomassa, é atualmente um solvente caro, e para o processo para ser econômico, é necessário que pelo menos 98% dele seja reciclado. Para alcançar alto índice de recuperação, estes autores estudaram vários co-solventes orgânicos que foram adicionados ao sistema GVL/água com o objetivo de aumentar a recuperação do GVL, açúcares e subprodutos da fermentação. Dos co-solventes estudados, tolueno alcançou maior eficiência de extração: 64,4% de GVL, 26,7% de furfural, 19,2% de ácido levulínico e ácido fórmico e 41,3% de HMF foram recuperados na fase orgânica, enquanto 94,3% de açúcares e todas as ligninas e huminas precipitadas permaneceram na fase aquosa (MOTAGAMWALA et al., 2016).

A separação dos açúcares do hidrolisado à base de GVL é necessária para maior atuação biológica, já que o GVL tem um efeito inibitório no crescimento microbiano.²¹ Uma fase aquosa contendo mais de 90% dos açúcares pode ser obtida pela adição de NaCl ou CO₂ líquido ao hidrolisado GVL/H₂O, levando a um sistema bifásico que consiste em um líquido aquoso contendo os açúcares, juntamente com um líquido orgânico que consiste principalmente de GVL. No entanto, a indução bifásica por adição de sal complica o processamento a jusante, pois tem um efeito inibitório no crescimento microbiano (MOTAGAMWALA et al., 2016).

Mesmo apesar dessa desvantagem indicada pelos autores anteriores, ZHANG; DOHERTY e O'HARA (2017) realizaram um trabalho no qual induziram a formação de solução bifásica pela adição do sal $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ até a saturação de hidrolisado cujo organosolvente presente foi o n-propanol. Na fase solvente ficou contido o solvente, produtos de degradação de açúcar e ligninas com baixo peso molecular e na fase aquosa, sal e açúcares solúveis. A fase de solvente foi diretamente reutilizada para pré-tratamento, enquanto a fase aquosa foi destilada para reciclar sal e água. A fase de solvente de reciclagem direta para o pré-tratamento quatro vezes levou a uma ligeira diminuição na digestibilidade do glucano de 100% (solvente fresco) para 96%. A reutilização direta da fase solvente também levou a um aumento significativo na concentração de furfural de 2,4 g/kg para 15,1 g/kg, enquanto a reciclagem de água e o sal em fase aquosa por destilação levou a um aumento substancial na concentração de xilose de 3,2 g/kg para 13,5 g/kg ap cinco lotes de pré-tratamentos. Além disso, o rendimento total de ligninas de alto peso molecular aumentou gradualmente de 38% para 49%.

Tendo este último trabalho citado como referência para recuperação de solventes, esse estudo concentrou esforços na indução de uma solução bifásica do hidrolisado do pré-tratamento pela adição do sal NaCl, de mais fácil acesso e menor curso. O objetivo também foi o de separar na fase solvente os próprios solventes, produtos de degradação e lignina. Já na fase aquosa, sal e açúcares solúveis.

CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão apresentadas todas as técnicas e análises utilizadas em cada um dos experimentos realizados ao longo do desenvolvimento deste trabalho, assim como os materiais e as metodologias empregadas.

A Figura 7 apresenta resumidamente o fluxograma cronológico das análises realizadas:

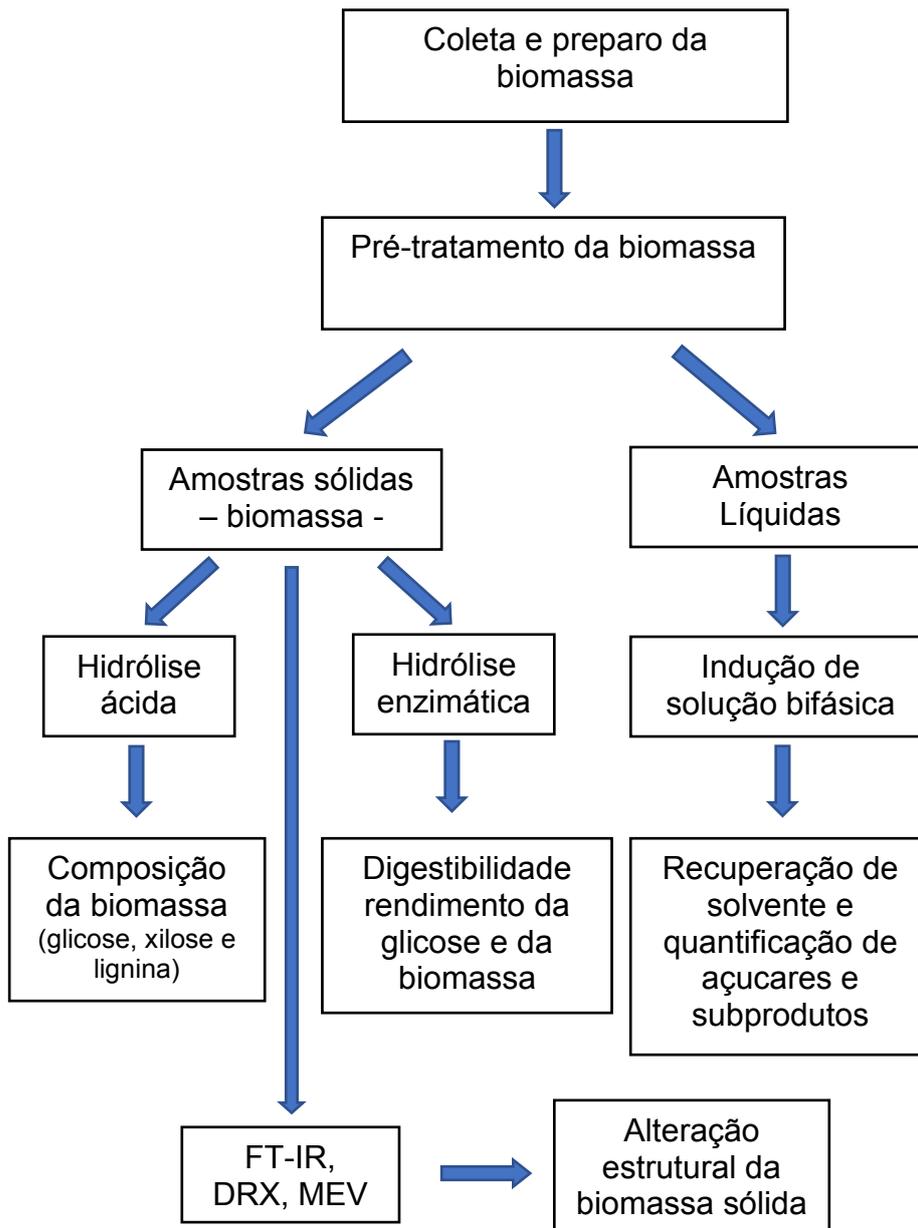


Figura 7 - Fluxograma resumido das etapas deste trabalho

Ressalta-se que toda parte experimental foi realizada na “Queensland University of Technology - QUT”, na cidade de Brisbane, Estado de Queensland, na Austrália em diferentes laboratórios do Centro de Ciência e Engenharia daquela Universidade.

As análises de infra-vermelho, microscopia eletrônica e difração de raio x foram realizadas em equipamentos que estão instalados nos laboratórios do Central Analytical Research Facility – CARF. O CARF é um centro analítico que contém vários laboratórios que abriga instrumentos para analisar as propriedades físicas, mecânicas, químicas e biológicas de sólidos, líquidos e gases.

As outras análises foram realizadas em equipamentos instalados nos laboratórios do Centre for Tropical Crops and Biocommodities - CTCB. O CTCB é um centro de pesquisa especializado em agricultura tropical e no setor de biocommodities de alto valor.

3.1. Planejamento dos experimentos

Os experimentos deste trabalho foram planejados com o intuito de realizar o pré-tratamento da biomassa utilizando GVL associado ao glicerol em diferentes proporções, mantendo constante as outras variáveis, tais como volume de reação, massa de biomassa utilizada, temperatura e tempo de reação.

A Tabela 4 apresenta detalhadamente as condições experimentais trabalhadas:

Tabela 4 – planejamento do experimento

Pré-tratamentos	Condições experimentais							
	GVL, g	Glicerol, g	Água, g	Ácido sulfúrico 72%, g	Massa de biomassa, g	Solução de reação, g	Tempera- tura de reação, °C	Tempo de reação, min
80% GVL/0%Gli	40	0	10	0,236	5	50	120	60
70%GVL/10%Gli	35	5	10	0,236	5	50	120	60
60%GVL/20%Gli	30	10	10	0,236	5	50	120	60
50%GVL/30%Gli	25	15	10	0,236	5	50	120	60
40%GVL/40%Gli	20	20	10	0,236	5	50	120	60
20%GVL/60%Gli	10	30	10	0,236	5	50	120	60
0%GVL/80%Gli	0	40	10	0,236	5	50	120	60

GVL - gamma-valerolactona; Gli - glicerol

Conforme pode ser observado na tabela anterior, foram preparadas sete diferentes condições de pré-tratamento variando a porcentagem de GVL associado ao glicerol e fixando as outras variáveis. Na primeira condição de pré-tratamento, foi utilizado 80% de GVL e 0% de glicerol, o que correspondeu a 40 e 0g, respectivamente. As demais condições alteraram somente a porcentagem de GVL que foi diminuindo em relação ao glicerol até a razão de 0 para 80%. Os outros parâmetros do experimento permaneceram constantes, tais como a massa de água, de ácido sulfúrico, de biomassa, temperatura e tempo de reação.

3.2. Preparação da amostra

De acordo com HAMES et al. (2008), é de suma importância a conversão da biomassa bruta em um material uniforme quando se tem como objetivo analisar sua composição em açúcares e lignina. Essa uniformidade se refere principalmente ao tamanho das partículas e umidade das amostras.

A padronização do tamanho das partículas é importante pois uma amostra com desvio para um tamanho de partícula menor pode resultar em altos teores de carboidratos e conseqüentemente baixos teores de lignina devido a excessiva degradação dos carboidratos durante a hidrólise ácida. Por outro lado, o desvio para um tamanho de partícula maior, pode resultar em baixos teores de carboidratos e conseqüentemente altos teores de lignina, devido à hidrólise incompleta de açúcares poliméricos para açúcares monoméricos.

No que se refere ao teor de umidade, o excesso alterará a concentração do ácido no processo de hidrólise ácida e isso pode resultar em um baixo teor de carboidratos devido à hidrólise incompleta de açúcares poliméricos em açúcares monoméricos. Hidrólise incompleta deixa os açúcares oligoméricos insolúveis, estes são incorretamente contados como resíduo insolúvel, resultando em alto teor de lignina.

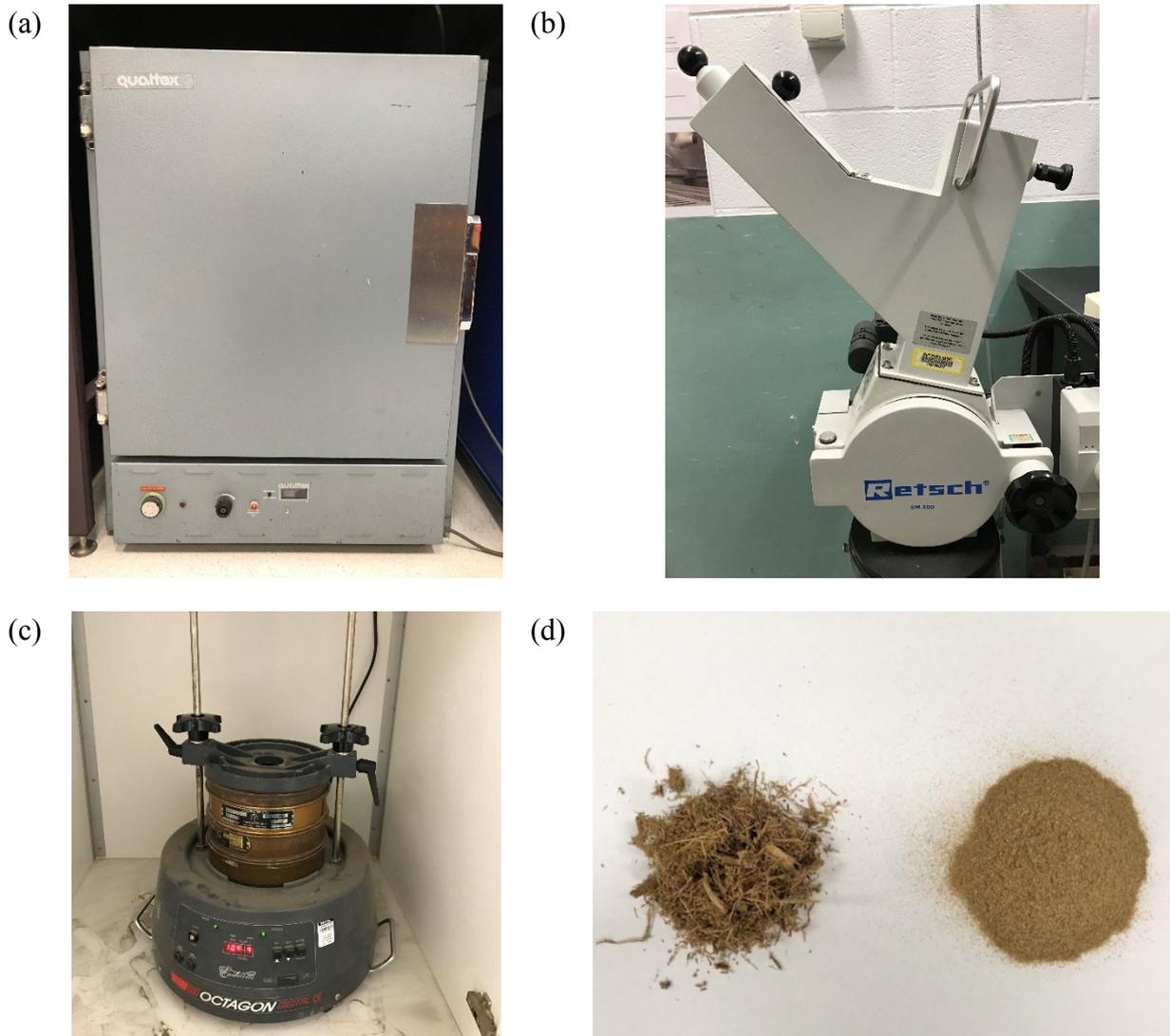
O procedimento para uniformização de amostras proposto pelo autor descreve várias técnicas de secagem e redução de tamanho. No entanto, essa revisão limitou-se somente `aquelas mais relevantes que foram utilizadas neste trabalho.

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado neste trabalho foi cedido pela empresa sucroenergética Racecourse Sugar Mill (Mackay Sugar Limited) em Mackay, Austrália. A coleta da amostra foi realizada no pátio de estocagem de bagaço, etapa após a trituração e moagem da

cana de açúcar. Foram utilizados sacos plásticos transparentes para acondicionamento e transporte de aproximadamente 5kg do material.

Após a coleta, o bagaço foi lavado com água corrente e posteriormente encaminhado para secagem em estufa de convecção forçada (Qualtex digital, Austrália) a $45 \pm 3^\circ \text{C}$ durante 48 horas, uma vez que o material estava muito úmido devido a lavagem. Por último, a amostra foi triturada em moinho de facas (Retsch SM100, Retsch GmbH, Alemanha). Após lavagem, secagem e trituração, o bagaço passou pelo peneirador automático (Endecotts Octagon Digital Sieve Shaker, Australia) em duas etapas simultâneas com peneiras de aberturas entre 1000 e 500 microns (número de mesh 18 e 35), originando materiais de tamanho entre 1 e 0,5 mm. Este material selecionado foi coletado e armazenado para o pré-tratamento. O processo de preparação das amostras seguiu a metodologia desenvolvida pelo National Renewable Energy Laboratory – NREL, descrito por HAMES et al. (2008).

As fotos da Figura 8 apresentam os equipamentos utilizados no preparo da amostra, (a), (b) e (c) e o resultado final comparativo entre a biomassa antes e depois de ser preparada (d):



(a) – forno de convecção; (b) – moinho; (c) – peneirador; (d) – bagaço antes e depois do preparo
Fonte: autor

Figura 8 – Processo de preparo da amostra

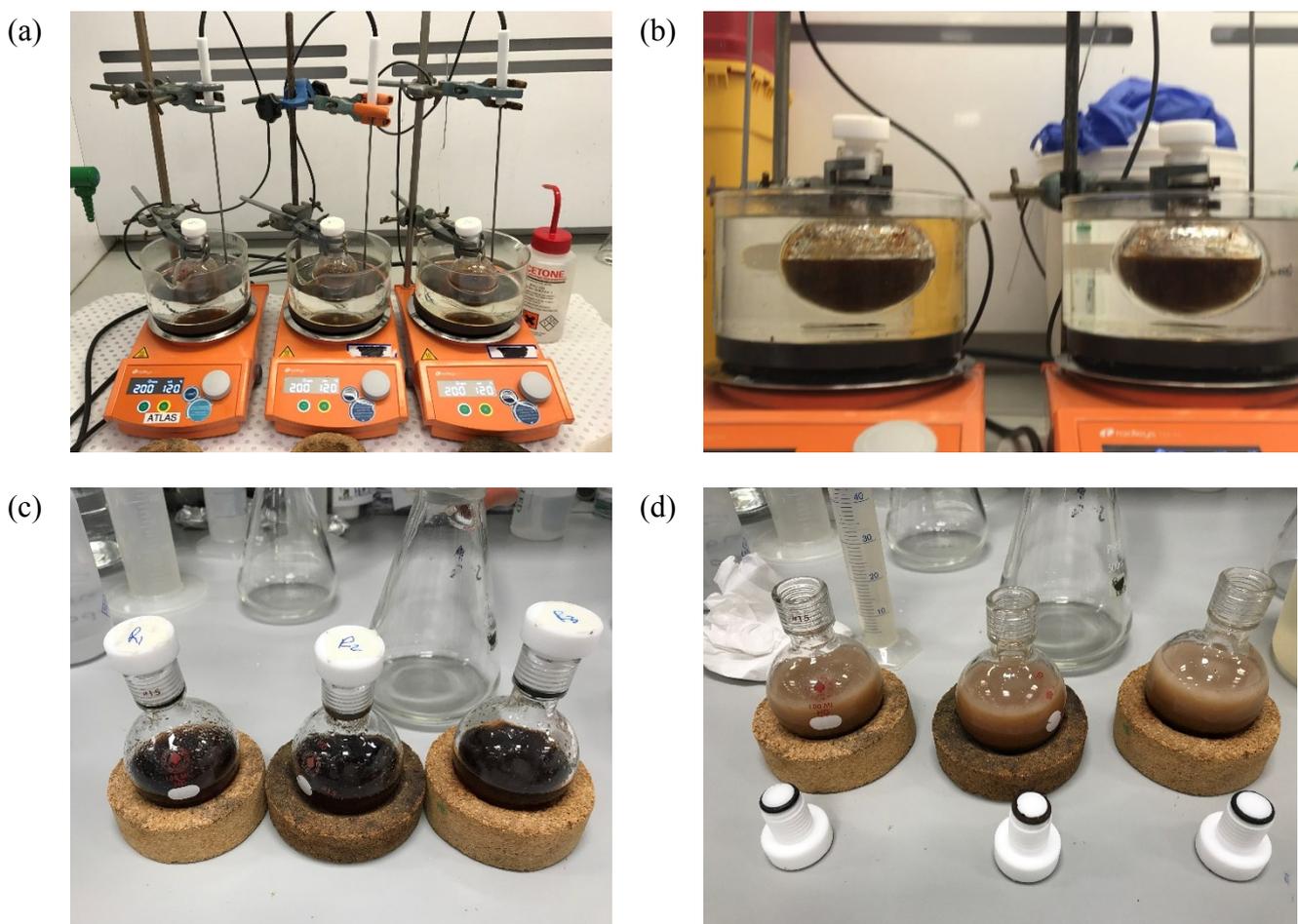
3.3. Pré-tratamento da biomassa

Antes de realizar o pré-tratamento propriamente dito, foi determinada a umidade e sólidos totais da biomassa de acordo com a metodologia desenvolvida pelo National Renewable Energy Laboratory – NREL e descrita por SLUITER et al. (2008). Para isso, foram utilizados três cadinhos de alumínio previamente lavados, secos e pesados em balança analítica (A&D Weighing, AND GX-600, Japão). Em cada um dos cadinhos foi pesada a quantidade aproximada de 1g da biomassa e posteriormente levados à estufa de convecção forçada (Memmert, UF30, Alemanha) a $105 \pm 3^\circ \text{C}$ durante 4 horas. Depois desse período, foram retirados do forno e colocados em dessecadores até o resfriamento para posterior pesagem. Após repetição desse

procedimento por duas vezes por 4 horas, esse tempo de exposição ao forno foi reduzido para 1 hora repetidamente até massa constante. Esse dado é importante para cálculo da quantidade exata de água a ser adicionada no sistema, considerando o volume total de reação em 50mL, conforme já exposto anteriormente.

De acordo com as quantidades especificadas no item 3.1, a biomassa e os reagentes do experimento foram transferidos para balões de vidro (Ace Glass Inc., EUA) de 100mL resistente a pressão. Os frascos foram selados com tampas de rosca e imersos em um banho de óleo de parafina pré-aquecido a 120°C durante 60 minutos sob agitação magnética a 300 rpm. Após esse procedimento, os frascos foram retirados do banho de óleo, o excesso foi retirado com papel toalha e os frascos imersos em um recipiente com gelo para resfriamento. Posteriormente, 40mL de água destilada foram adicionados a cada um dos frascos.

As fotos da Figura 9 mostram os balões durante o banho de óleo no pré-tratamento (a) e (b), após o pré-tratamento (c) e após a adição dos 40mL de água (d):



(a) e (b) – balões durante pré-tratamento; (c) – balões pós pré-tratamento; (d) – balões pós adição de água.

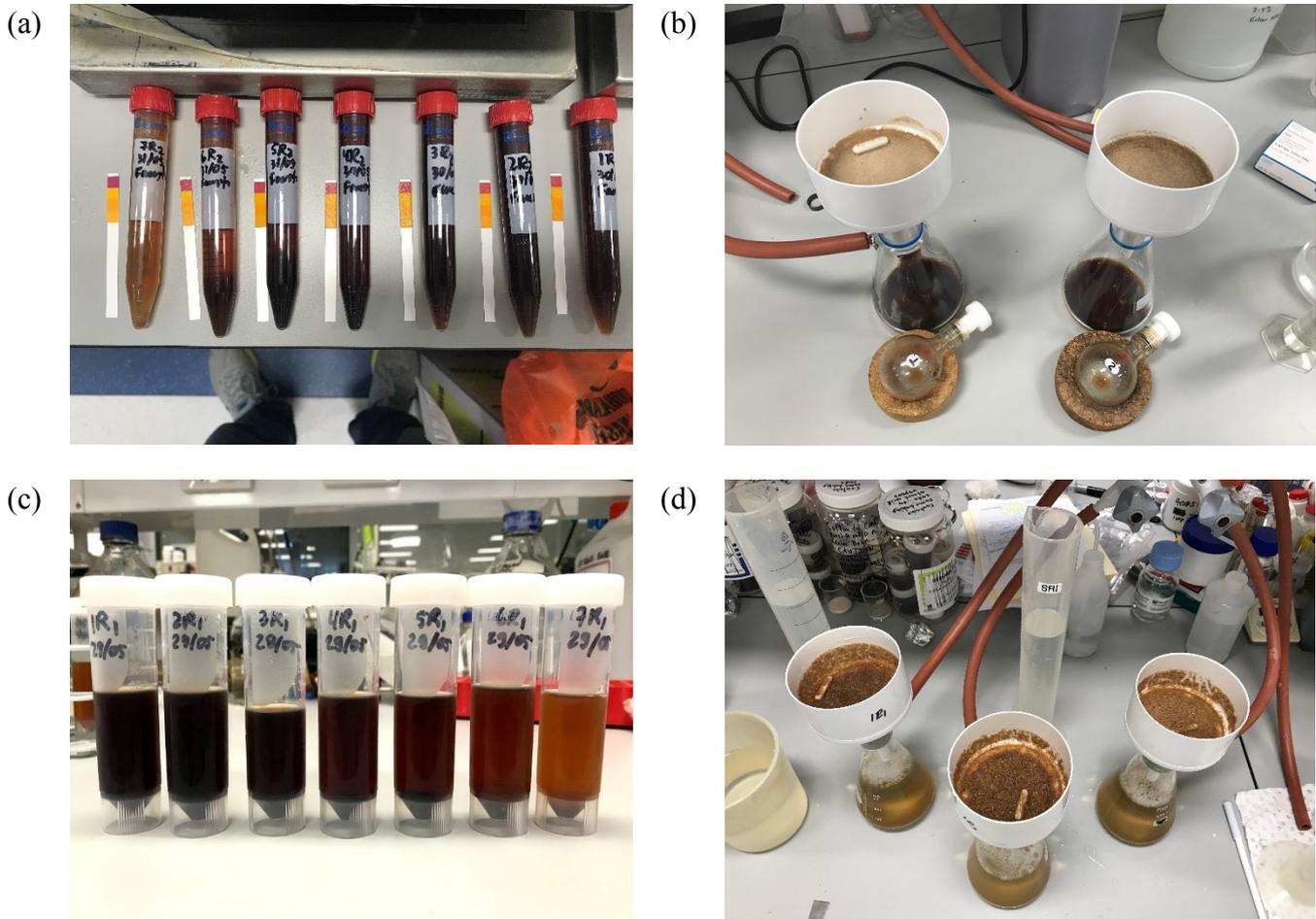
Fonte: autor

Figura 9 – Processo de pré-tratamento da biomassa

Após adição dos 40mL de água destilada supracitados e homogeneização, alíquotas de 15mL de cada um dos balões foram coletadas em tubos de centrífuga de mesmo volume para posteriores análises. O restante do conteúdo dos frascos foi filtrado a vácuo em kitassato utilizando Funil de Buchner e filtro Whatman 541. Outra amostra líquida de aproximadamente 50mL foi coletada em tubos de centrífuga Falcon de mesmo volume, também para posteriores análises. Ambas amostras líquidas foram coletadas em recipientes hermeticamente fechados e estocadas em freezer a -20°C , para evitar degradação de compostos de açúcares e seus subprodutos.

Após a filtragem, a biomassa retida foi lavada com 100mL de água destilada por duas vezes, outras duas vezes com 100mL de NaOH 0,2% e novamente com água destilada até obtenção de pH entre 5 e 7, verificado com fita-papel pH.

As fotos da Figura 10 mostram a alíquota de amostra líquida coletada antes da filtração (a), o processo de filtração (b), a alíquota coletada depois da filtração (c) e o processo de lavagem da biomassa (d):



(a) – amostras antes da filtração; (b) – processo de filtração; (c) – amostras depois da filtração; (d) – lavagem da biomassa

Fonte: autor

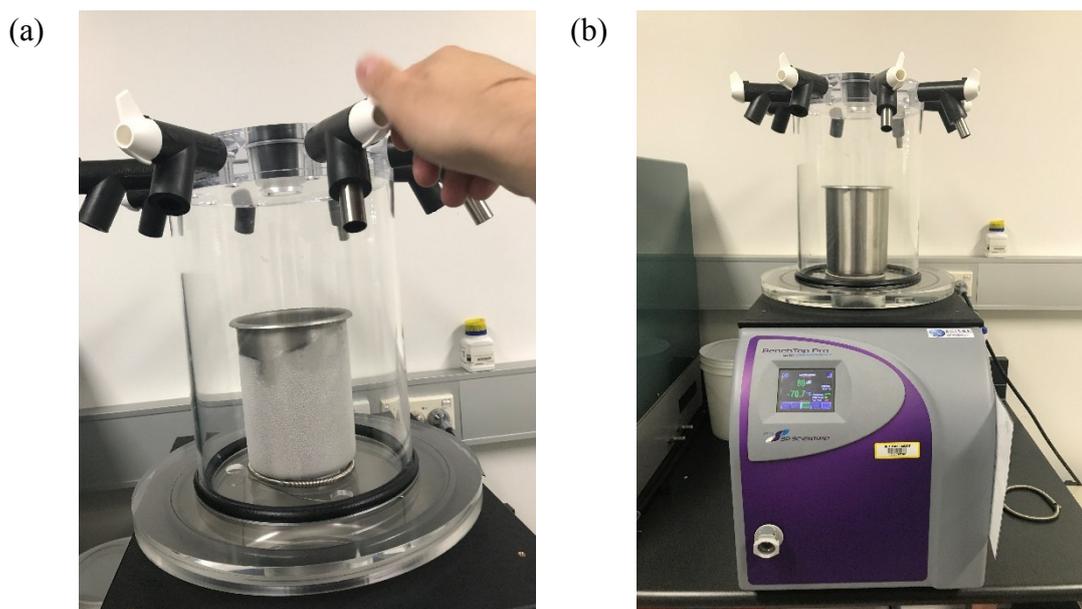
Figura 10 – Processo de filtração e coleta das amostras líquidas

Depois do excesso de umidade ter sido retirado pelo vácuo, o montante da biomassa foi pesado e dividido em duas partes iguais. A primeira foi encaminhada para secagem no freeze dry (BenchTop Pro with Omnitronics, VirTis SP Scientific, EUA), para posterior realização de hidrólise ácida, e a outra metade foi armazenada em refrigerador a 4° C para posterior realização de hidrólise enzimática e análises estruturais. Cada uma das condições de pré-tratamentos foi feita em duplicata para cada um dos dois lotes.

3.4. Hidrólise ácida

Esta análise é uma etapa muito importante deste trabalho, pois é a partir dela que foi feita a “Determinação Estrutural de Carboidratos e Lignina”, ou seja, a quantificação de açúcares e lignina existentes na biomassa estudada. A realização desta foi orientada pela metodologia desenvolvida pelo National Renewable Energy Laboratory – NREL e descrita por SLUITER et al. (2012). As amostras das biomassas pré-tratadas e uma amostra de bagaço in natura (sem tratamento), com aproximadamente a mesma massa, foram congeladas por 24 horas em freezer a -80°C e posteriormente foram secas em “freeze dry” por 72 horas sob pressão e temperatura aproximadas de $100\ \mu\text{B}$ e -70°C . Novamente foram determinados os sólidos totais e umidade remanescentes utilizando a mesma metodologia de SLUITER et al. (2008) descrita no item 3.3.

As fotos da Figura 11 mostram o momento em que as amostras foram colocadas no “freeze dry” para secagem:



(a) – amostras no freeze dry; (b) – freeze dry em funcionamento
Fonte: autor

Figura 11 – Processo de secagem por freeze dry

Após esse processo, aproximadamente 0.3g de biomassa seca de cada um dos sete tipos de pré-tratamentos e do bagaço in natura foram pesadas e colocadas em tubo de pressão (Ace Glass Inc., US) de 150mL. Em cada um destes tubos foram adicionados $3,0 \pm 0,01$ mL de ácido sulfúrico 72% e incubados em banho maria (Ratec, Thermoregulator TH6P, Austrália) a $30,0 \pm$

3° C por um período de 1h. De 15 em 15 minutos a solução biomassa + ácido foi homogeneizada com um bastão de vidro, individual para cada tubo.

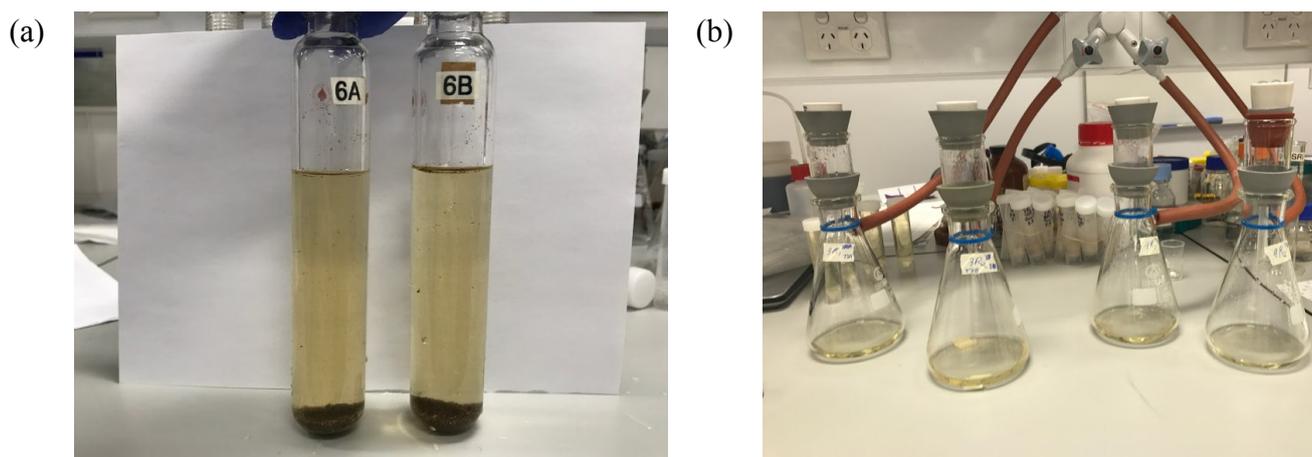
Ao final de 1h, os tubos de pressão foram retirados do banho maria e adicionados em cada um $84 \pm 0,04$ mL de água ultrapura, tendo o cuidado de enxaguar os bastões ao retirá-los dos tubos de forma a evitar a perda de biomassa. Os tubos foram hermeticamente fechados com tampa de rosca, encaminhados para a autoclave (Tomy SX-500E, Japão), e incubados por uma hora a 121° C.

Juntamente com os tubos contendo a solução de biomassas + ácido, seguiram para a autoclave, tubos contendo 10mL de solução padrão de recuperação de açúcar (SRS) mais 348 μ l de ácido sulfúrico 72%. Para o preparo de 100mL dessa solução, foram utilizados 0,2g de D-glicose, 0,07g de D-xilose, 0,02g de D-galactose e 0,02g de L-arabinose. O volume foi dividido em frascos volumétricos de 10mL e aqueles não utilizados foram acondicionados em freezer a -20° C para posterior e/ou eventual uso, em caso de repetição do experimento.

Após completo o ciclo da autoclave, os tubos foram retirados e colocados novamente em banho maria a 30 ± 3 ° C para resfriarem até atingir a temperatura ambiente. Posteriormente, procedeu-se a filtração a vácuo do conteúdo dos tubos em kitassato utilizando funil de vidro e cadinhos filtrantes. Estes cadinhos foram previamente lavados, secos e colocados em mufla a 575 ± 25 ° C por 4h para atingir a massa constante. Retirados da mufla, foram colocados em dessecador por 1h para resfriamento e depois pesados novamente.

Após a filtragem, uma alíquota de amostra líquida de aproximadamente 50mL foi coletada em tubos de centrifuga marca Falcon de mesmo volume. Essas amostras líquidas foram utilizadas para determinação de açúcares e de lignina solúvel, explicadas a seguir.

As fotos da Figura 12 mostram os tubos de ensaio após retirados da autoclave (a) e o processo de filtração a vácuo (b):



(a) – tubos de ensaio após a autoclave; (b) – processo de filtração a vácuo

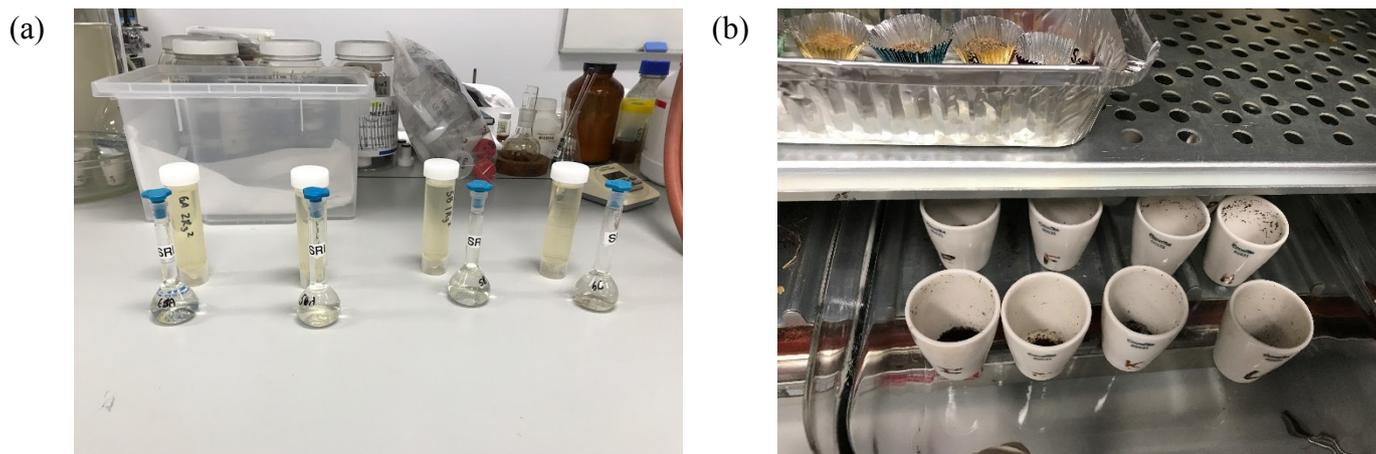
Fonte: autor

Figura 12 – Processo de filtração pós hidrólise ácida

Destes 50mL, foram retiradas alíquotas de 5mL para imediata determinação de lignina solúvel, uma vez que essa análise deve ser realizada no máximo 6 horas depois da hidrólise ácida. Para isso, esse volume foi adicionado em balão volumétrico de 25mL e completado com água destilada, diluindo assim essa amostra em cinco vezes. Após diluição e homogeneização, estas amostras foram encaminhadas ao espectrofotômetro (GBC, Cintra 40 UV-Visible Spectrometer, Austrália) para leitura de absorvância em comprimento de onda ultra violeta - UV de 240nm.

O restante das alíquotas que permaneceu nos tubos de centrífuga foram estocadas no freezer a -20°C para posteriores análises de glicose, xilose e arabinose. Depois de coletadas as alíquotas acima mencionadas, a biomassa remanescente nos tubos de pressão foi transferida para os cadinhos utilizando aproximadamente 50mL de água destilada. Após a total filtragem da água, os cadinhos contendo os resíduos insolúveis (biomassa remanescente) foram encaminhados para a estufa de convecção forçada para secagem e depois foram resfriados no dessecador e posteriormente pesados. Depois disso, os cadinhos foram encaminhados para a mufla, resfriados no dessecador e pesados, seguindo a mesma metodologia já abordada neste mesmo item. Pela diferença de peso entre os cadinhos antes e depois da mufla, obteve-se a porcentagem da lignina insolúvel das biomassas.

As fotos da Figura 13 mostram as amostras para leitura no espectrofotômetro (a) e cadinhos na estufa de convecção forçada (b):



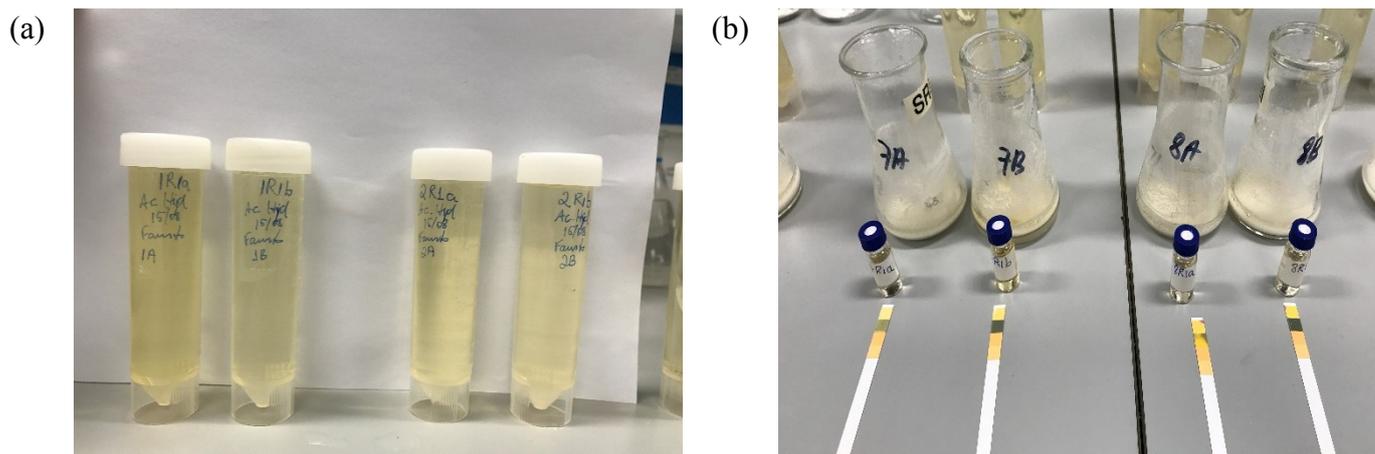
(a) – Amostras para leitura em espectrofotômetro; (b) – Cadinhos no forno de convecção
Fonte: autor

Figura 13 – Processo preparação de amostras líquidas e secagem de cadinhos

Da alíquota que restou dos 50mL, foram retirados outros 10mL e adicionados em frascos de vidro juntamente com 0,5g de carbonato de cálcio para neutralização. Após agitação por dois minutos e decantação do precipitado, aproximadamente 1mL do sobrenadante foi coletado com o auxílio de uma seringa e filtrado utilizando filtros de 0,45 μ m diretamente em frascos apropriados para leitura de açúcares em cromatografia líquida de alta performance – HPLC, descrita no item 3.6.

Os resultados obtidos no HPLC foram lançados em planilha eletrônica para correção de valores e cálculos quantitativos dos carboidratos estruturais glicose, xilose e arabinose. Todo experimento e análises de hidrólise ácida foram realizados em duplicata para cada um dos dois lotes.

As fotos da Figura 14 mostram as amostras líquidas extraídas da hidrólise ácida (a) e as amostras já preparadas para leitura em HPLC (b):



(a) – Amostras da hidrólise ácida; (b) – Amostras para leitura em HPLC

Fonte: autor

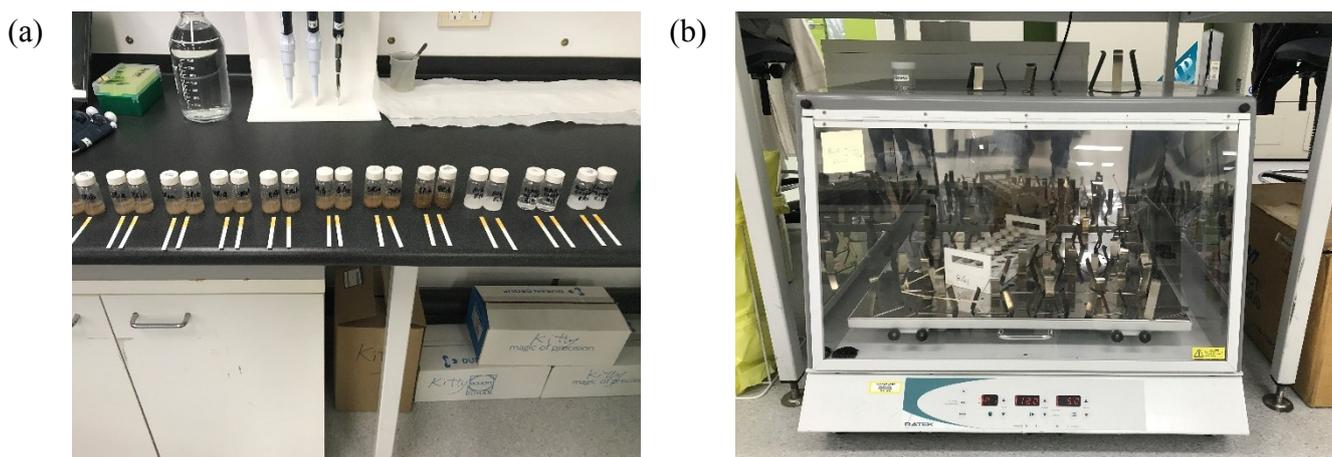
Figura 14 – Processo coleta e preparação de amostras líquidas

3.5. Hidrólise Enzimática

A realização dessa análise foi orientada pela metodologia do National Renewable Energy Laboratory – NREL, descrita por SELIG; WEISS; JI (2008). Para condução deste experimento, foram utilizados frascos de vidro de 20mL contendo 5g de solução de reação, no qual foram adicionados: 2% em peso de celulose, 0,25mL de solução tampão de citrato 1M (concentração final de 0,05M) para manter pH a 4,8 e 0,02% em peso do antibiótico azida de sódio para evitar o crescimento de microrganismos. Além disso, foi adicionada a enzima accellerase (accellerase™ 1000, Sigma-Aldrich) para hidrólise enzimática a uma dosagem de aproximadamente 20 FPU/g de celulose (0,5 mL de solução Accellerase / g de celulose). A reação deste experimento ocorreu a 50 ° C durante 72 h numa incubadora rotativa (Ratek OM 11 Orbital Mixer, Austrália) com uma velocidade de agitação de 150 rpm.

As alíquotas de amostragem foram de 0,2mL retiradas nos tempos de 6, 12, 24, 48 e 72h. Estas amostras foram centrifugadas a 9.000 g durante 5 min em centrífuga e 0,1 mL do sobrenadante foi diluído 10 vezes em água destilada em tubos de 2mL. As amostras diluídas foram coletadas com auxílio de uma seringa e filtradas através de filtro de disco de 0,22µm diretamente em frascos próprios para análise da digestibilidade de glicose no HPLC. Todo experimento e análises de hidrólise enzimática foram realizadas em duplicata para cada um dos dois lotes.

As fotos da Figura 15, mostram os frascos preparados para iniciar a hidrólise enzimática (a) e o experimento na incubadora (b):



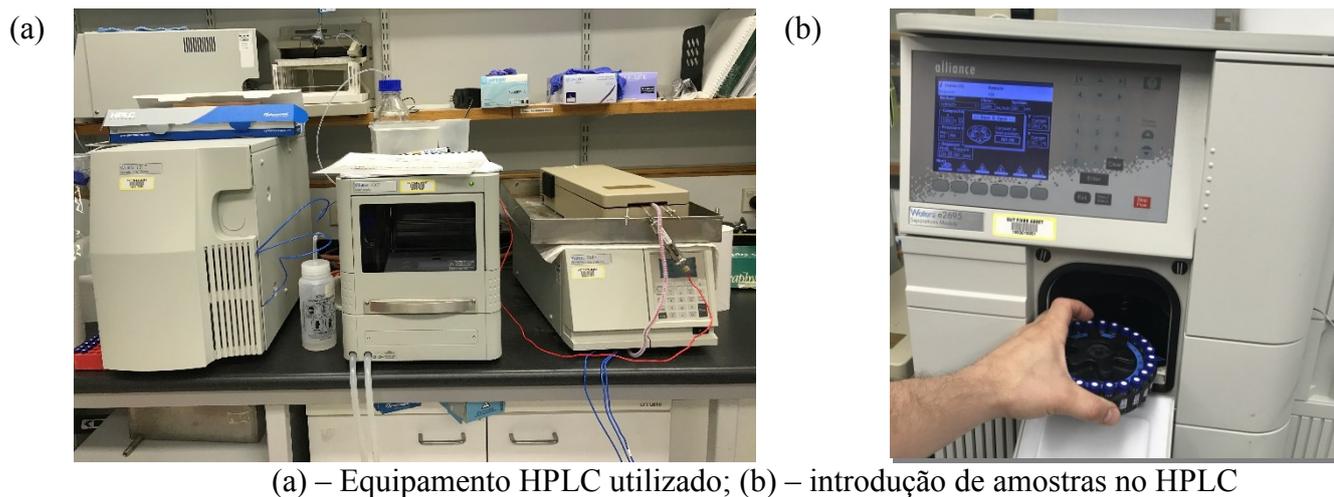
(a) – Frascos preparados para a hidrólise enzimática; (b) – Experimento em incubadora
Fonte: autor

Figura 15 – Preparo e funcionamento da hidrólise enzimática

3.6. Análise de HPLC

Para determinação das concentrações dos compostos das amostras, foram utilizados dois sistemas de HPLC. Para os solventes (GVL e glicerol) e produtos de degradação de açúcares (furfural HMF) foi utilizada a coluna Bio-Rad Aminex HPX- 87H e detector de índice de refração e detector de UV (280 nm). Foi utilizado ácido sulfúrico (H_2SO_4) em concentração de 5mM como fase móvel a taxa de fluxo de 0,6 mL/min e temperatura da coluna a 65°C. Para as concentrações de açúcares (glicose, xilose e arabinose), durante a hidrólise ácida, hidrólise enzimática e nas amostras líquidas coletadas após o pré-tratamento, utilizou-se a coluna Phenomenex RPM. Foi utilizada água destilada como fase móvel, taxa de fluxo de 0,5mL/min e temperatura da coluna de 85°C. Esta metodologia foi conduzida de acordo com aquela descrita por ZHANG; DOHERTY; O'HARA (2017). Todas concentrações determinadas por HPLC foram realizadas em duplicata para cada um dos dois lotes.

As fotos da Figura 16 mostram um dos HPLC utilizados para estas análises (a) e as amostras sendo introduzidas no equipamento para leitura (b):



Fonte: autor

Figura 16 – Equipamento e leitura de amostras em HPLC

3.7. Recuperação do solvente após pré-tratamento

A metodologia utilizada para realização desta técnica foi baseada naquela descrita por ZHANG; DOHERTY; O'HARA (2017). Para isso, as alíquotas do hidrolisado foram coletadas depois do pré-tratamento, descritas no item 3.3, foram descongeladas a temperatura ambiente para serem saturadas com sal e induzidas à formação de solução bifásica chamadas de fase líquida e fase solvente.

Para determinação do ponto de saturação do sal das amostras líquidas dos diferentes tipos de pré-tratamento, 5mL de cada uma delas foram transferidas para tubos de centrífuga de 15mL e a eles adicionados aproximadamente 2g de sal NaCl. Após agitação em vórtex por tempo suficiente para dissolver a quantidade máxima de sal, o conteúdo do tubo foi filtrado a vácuo em kitassato utilizando Funil de Buchner e filtro Whatman 541. O sal excedente retido no filtro foi lavado 3 vezes com 20mL de etanol 96% e encaminhado para secagem durante 20min em estufa de convecção forçada (Memmert, UF30, Alemanha) a $105 \pm 3^\circ \text{C}$. Depois de resfriados em dessecador, os filtros contendo o sal excedente foram pesados e a diferença entre a quantidade de sal adicionada e a quantidade de sal retida no filtro determinou o ponto de saturação do sal na alíquota.

Após a determinação do ponto de saturação do sal, outras alíquotas de 10mL destas mesmas amostras foram transferidas para tubos de centrífuga também de 15mL. A elas foi adicionado sal de forma gradual até atingir a saturação, formando assim soluções bifásicas que foram denominadas fase aquosa e fase solvente. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a

1000 rpm durante 5 min em centrífuga Beckman (GS- 6R, Beckman, EUA) para efetiva separação das fases. A fase aquosa (inferior ao tubo), foi retirada com o auxílio de uma seringa e transferida para outro tubo. Tanto a fase solvente quanto a fase aquosa foram pesadas para futuros cálculos. Cem microlitros, 100 μ l, de cada uma das fases foram retirados e diluídos em 900 μ l de água ultrapura em tubos de 1,5mL. Após homogeneização, o volume foi coletado com o auxílio de uma seringa e filtrado utilizando filtros de 0,45 μ m diretamente em frascos apropriados para leitura no HPLC, conforme descrito no item 3.6.

As concentrações de açúcares (glicose, xilose e arabinose) e seus produtos de degradação (5-hidroximetil furfural - HMF e furfural) foram determinadas nas duas fases, enquanto a concentração do GVL e glicerol somente na fase aquosa. As concentrações dos solventes GVL e glicerol não puderam ser determinados na fase solvente por HPLC por causa das altas concentrações que podem afetar a precisão dos resultados. No entanto, foi calculada com base na massa total já conhecida (massa de GVL e glicerol adicionada em cada tipo de pré-tratamento) e a massa em fase aquosa determinada por HPLC. Este experimento também foi conduzido em duplicata para cada um dos dois lotes.

A foto da Figura 17 mostra as alíquotas do hidrolisado após a indução de solução bifásica:



Fonte: autor

Figura 17 – Processo separação das fases aquosa e solvente

3.8. Caracterização da biomassa sólida após o pré-tratamento

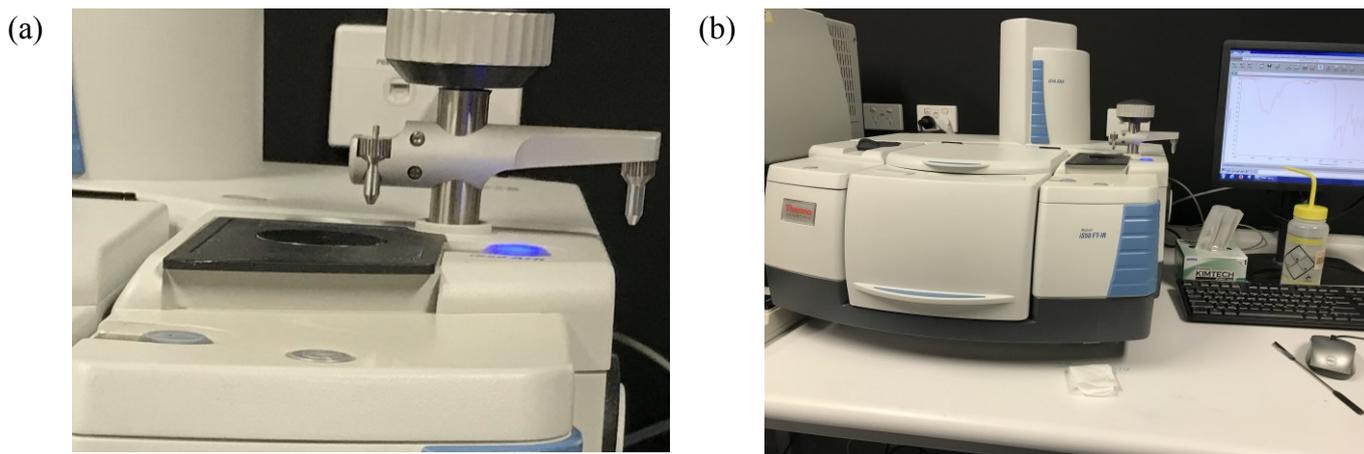
A fração sólida gerada a partir das diferentes condições de pré-tratamento foram coletadas e secadas em estufa de convecção forçada e partir delas foi reservada às análises de caracterização de suas estruturas sólidas pelas seguintes análises: Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier - FT-IR, Microscópio eletrônico de varredura – MEV e Difração de Raio X – DRX que serão detalhadas nos itens a seguir.

3.8.1. Caracterização por infra vermelho - FT-IR

A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier - FTIR é uma técnica usada para obter um espectro infravermelho de absorção ou emissão de um sólido, líquido ou gás. Um espectrômetro FTIR coleta simultaneamente dados de alta resolução espectral em uma ampla faixa espectral. Isso confere uma vantagem significativa sobre um espectrômetro dispersivo, que mede a intensidade em uma faixa estreita de comprimentos de onda por vez. O termo espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier origina-se do fato de que uma transformada de Fourier (um processo matemático) é necessária para converter os dados brutos no espectro real (GRIFFITHS; DE HASSETH, 2007).

Essa técnica foi utilizada neste estudo para auxiliar na avaliação das mudanças nos grupos funcionais das amostras provocadas (ou não) pelos pré-tratamentos aos que as mesmas foram submetidas. Neste trabalho foi utilizado um FTIR Nicolet, modelo IS IS50 GC-IR modules and the Thermo Scientific OMNIC Mercury GC software.

As fotos da Figura 18 mostram a preparação das amostras e sua introdução das mesmas no equipamento para realização da referida análise.



(a) – Preparação das amostras; (b) – Equipamento FT-IR utilizado;

Fonte: autor

Figura 18 – Caracterização das amostras em FT-IR

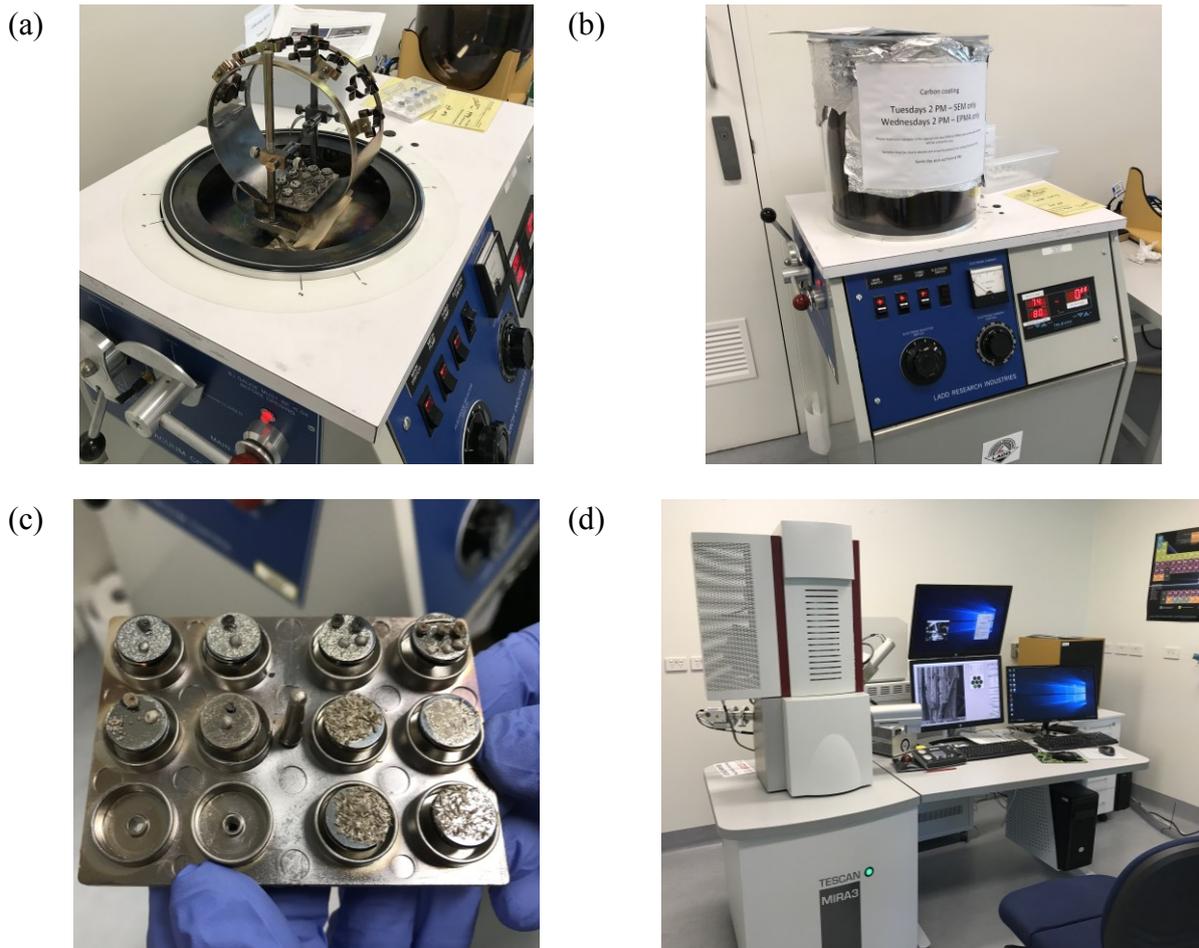
3.8.2. Caracterização por microscopia eletrônica de varredura - MEV

Um microscópio eletrônico de varredura - MEV é um tipo de microscópio eletrônico que produz imagens de uma amostra, examinando a superfície com um feixe focalizado de elétrons. Os elétrons interagem com átomos na amostra, produzindo vários sinais que contêm informações sobre a topografia e a composição da superfície da amostra. O feixe de elétrons é varrido em um padrão de varredura e a posição do feixe é combinada com o sinal detectado para produzir uma imagem.

A estrutura das biomassas submetida às diferentes condições e pré-tratamento e a não tratada foram avaliadas por essa técnica em diferentes magnitudes utilizando o microscópio de marca TESCAN MIRA3 FEG-SEM (Field Emission Scanning Electron Microscope), operando a uma tensão de 2, 3 ou 4 kV, com aumentos de 100 a 50.000 vezes.

Antes de introduzidas no microscópio, as amostras foram revestidas com carbono usando um dispositivo de revestimento por aspersão a vácuo para melhorar a condutividade das amostras e, assim, a qualidade das imagens obtidas pelo microscópio. Para fazer esse revestimento foi utilizado o equipamento 30008 - Vacuum Evaporator with Diffusion Pump, Floor Model, 110VAC / 60Hz, localizado no mesmo laboratório que o microscópio.

As fotos da Figura 19 mostram a preparação das amostras e sua introdução das mesmas no equipamento para realização da referida análise.



(a) e (b) - Preparação das amostras (revestimento de carbono); (c) – Amostras preparadas; (d) - Equipamento microscópio utilizado
 Fonte: Autor

Figura 19 - Caracterização das amostras em SEM

3.8.3. Caracterização por Difração de Raio X - DRX

A Difração de Raio X – DRX, é uma técnica usada para determinar a estrutura atômica e molecular de um cristal, na qual os átomos cristalinos fazem com que um feixe de raios X incidentes difrate em muitas direções específicas. Medindo os ângulos e as intensidades dos feixes difratados, um cristalógrafo pode produzir uma imagem tridimensional da densidade de elétrons dentro do cristal. A partir desta densidade de elétrons, as posições médias dos átomos no cristal podem ser determinadas, bem como suas ligações químicas, sua desordem e várias outras informações (EWALD, 1999)

Neste trabalho, os espectros de DRX correspondentes às amostras das biomassas pré-tratadas e não tratada foram adquiridos com o propósito de avaliar a cristalinidade da celulose presente nestes materiais. As amostras secas foram colocadas em suporte em formato de

pastilhas e prensadas a uma pressão de 5t. Posteriormente as mesmas foram encaminhadas para realização da leitura no aparelho.

O equipamento utilizado foi um difratômetro da marca PANalytical, modelo X Pert PRO tubo de cobalto e filtro de cobalto ($\text{CoK}\alpha = 1,541\text{\AA}$) Goniômetro horizontal, radiação de 40keV (40mA).

O índice de cristalinidade da celulose (IC%) foi calculado segundo a metodologia sugerida por SEGAL et al (1959) utilizando a Equação 1, abaixo:

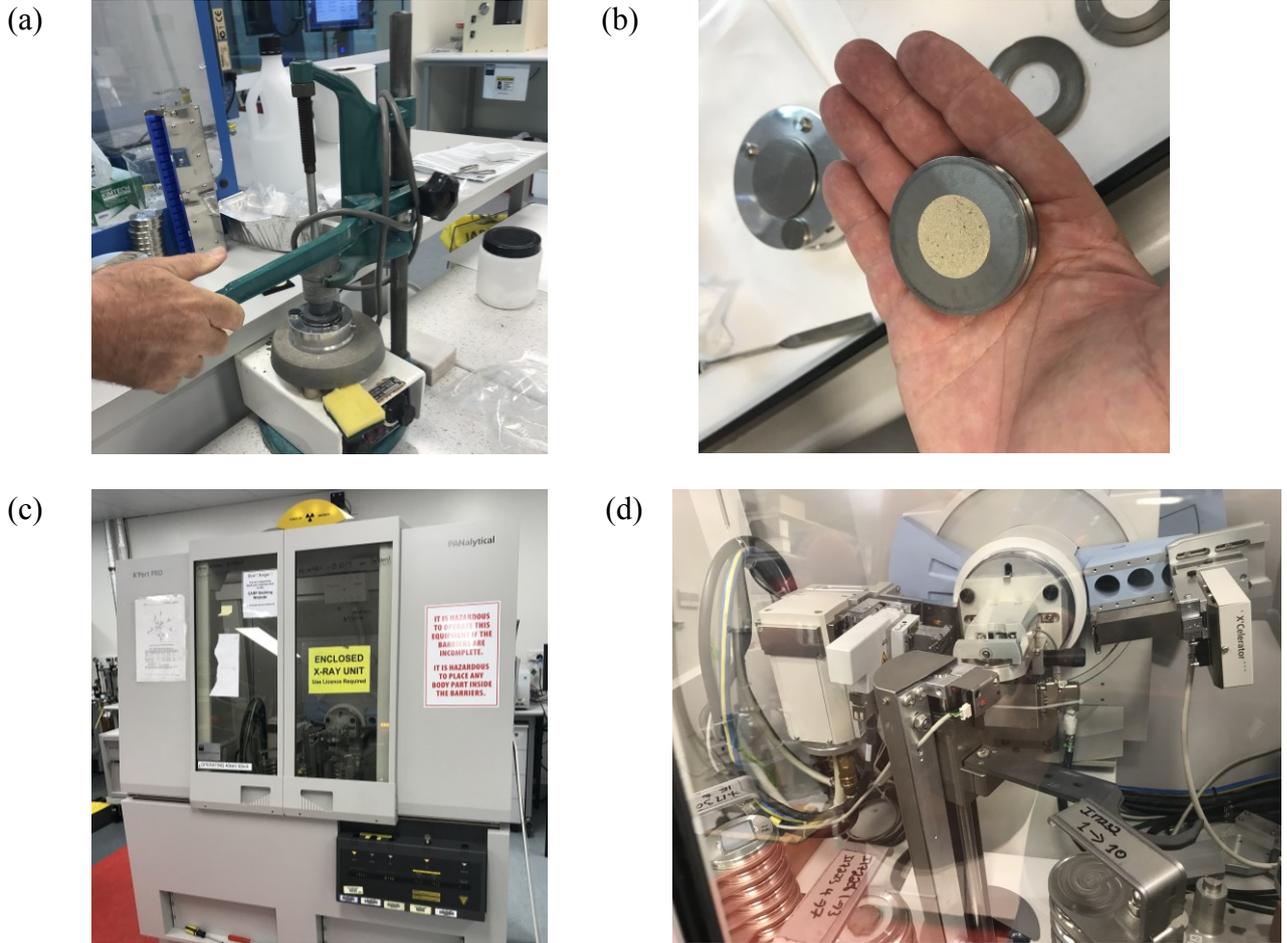
$$\%IC = [(I_{002} - I_{am})/I_{002}] \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

I_{002} = intensidade no pico cristalino 2θ (representa o maior valor da coluna)

I_{am} = intensidade da parte representativa à região amorfa 18° (representa o valor para o ângulo $2\theta = 18$ graus)

As fotos da Figura 20 mostram a preparação das amostras e sua introdução no equipamento para realização da referida análise:



(a) – Preparação das amostras; (b) – amostras preparadas; (c) – Equipamento DRX utilizado; (d) – amostras dentro do equipamento.

Figura 20 – Caracterização das amostras por DRX

CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os principais resultados obtidos no desenvolvimento deste trabalho serão apresentados e discutidos neste capítulo. Inicialmente, foram apresentados resultados obtidos via hidrólise ácida, da composição da biomassa submetida às diferentes condições de pré-tratamentos. Em seguida, apresentou-se os resultados obtidos pela hidrólise enzimática, da digestibilidade dessa mesma biomassa. Na sequência, foram apresentados os resultados das alterações provocadas na estrutura da biomassa utilizando as técnicas de microscopia eletrônica, infra vermelho e difração de raio-x. Por último, apresentou-se o estudo sobre a viabilidade de recuperação de solvente GVL no hidrolisado originado das diferentes condições de pré-tratamentos, por indução de solução bifásica.

4.1 Hidrólise ácida

A Tabela 5 apresenta os teores de glicose, xilose e lignina associados às diferentes condições de pré-tratamentos. Conforme já descrito no capítulo anterior, item 3.4, e resumidamente lembrado aqui, a biomassa depois de submetida às diferentes condições de pré-tratamento, foi separada por filtração, lavada e seca em estufa. Posterior a isso, uma porção dessa massa seca foi utilizada para realizar a hidrólise ácida, análise que viabilizou estes resultados mostrados a seguir:

Tabela 5 – Composição da biomassa

Composição da biomassa, %			
Pré-tratamentos	Glicose	Xilose	Lignina
80% GVL/0%Gli	75.65	7.66	10.06
70%GVL/10%Gli	73.11	9.33	10.28
60%GVL/20%Gli	71.25	8.99	10.13
50%GVL/30%Gli	68.80	9.18	11.55
40%GVL/40%Gli	66.09	9.72	13.69
20%GVL/60%Gli	61.99	9.67	17.30
0%GVL/80%Gli	55.40	8.65	24.66
Não tratada	36.85	16.05	30.98

A Figura 21 expressa esses mesmos resultados de composição da biomassa mostrados na Tabela 5, mas em formato de gráfico, o que facilita uma melhor visão das diferenças entre

os resultados obtidos para a composição da biomassa nas diferentes condições de pré-tratamento:

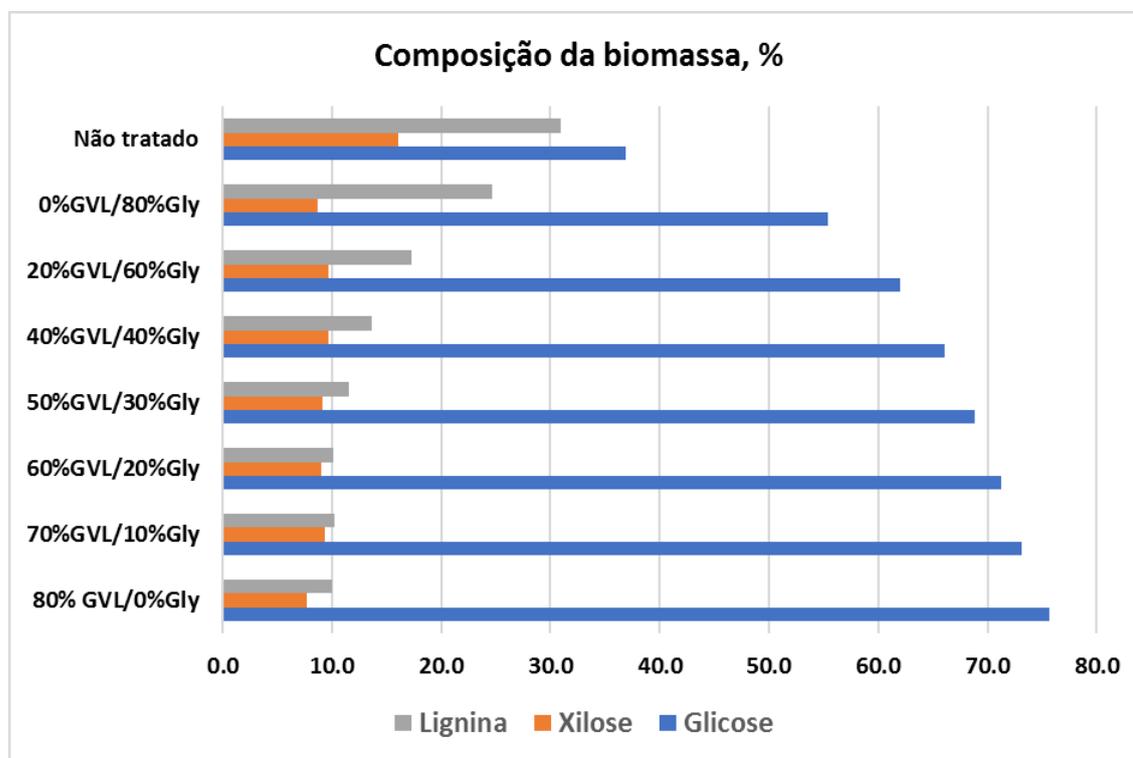


Figura 21 – Composição da biomassa recuperada do pré-tratamento

Antes de discutir esses resultados, é importante ressaltar que para a glicose, os maiores valores numéricos significam melhores resultados, uma vez que demonstra que o pré-tratamento foi mais eficiente na desconstrução da estrutura lignocelulósica e por consequência houve maior acesso à glicose. Com relação à xilose e à lignina, o raciocínio é o oposto: os menores valores numéricos significam melhores resultados. Isso porque o pré-tratamento mais eficiente dissolve maior quantidade de hemicelulose e de lignina e conseqüentemente menores quantidade de xilose e lignina são extraídas na composição da biomassa pela hidrólise ácida.

No que se refere à glicose, pode-se observar uma melhoria de aproximadamente 1,5 vezes no resultado quando compara-se a biomassa “Não tratada” com a biomassa pré-tratada que apresentou o pior resultado (0%GVL/80%Gli - somente com glicerol). E essa melhoria pode chegar a pouco mais de 2 vezes quando a biomassa “Não tratada” é comparada com o melhor pré-tratamento (80%GVL/0%Gli - somente GVL).

O pré-tratamento com 20% de GVL, apresentou uma melhoria de resultado de glicose em aproximadamente 11% quando comparado àquele com 0% de GVL. Isso indica que a adição do GVL no sistema teve um efeito positivo ao pré-tratamento. Comparando somente os pré-tratamentos que contém GVL entre si, a maior diferença no resultado de glicose foi de aproximadamente 8% entre os pré-tratamentos 40%GVL/40%Gli e 20%GVL/60%Gli. Nos outros, foi observada melhoria no resultado de glicose de 3 a 4% de um pré-tratamento para outro. Diante disso, observa-se que a melhoria dos resultados não foi proporcional ao aumento da porcentagem de GVL aos pré-tratamentos.

Outra observação feita é que individualmente o GVL teve um melhor efeito solvente do que o glicerol (75,66% contra 55,41%) no que se refere à dissolução da celulose e consequente disponibilização da glicose. Além disso, observou-se que ao adicionar GVL, os resultados foram melhorando a medida que se aumentou a porcentagem de GVL, porém em uma proporção menor. No entanto, a mistura dos dois solventes não potencializou o resultado de glicose pois o melhor resultado dentre todos foi aquele com maior porcentagem de GVL (80%).

Aplicando o Teste de Tukey para os resultados de glicose, verifica-se que os pré-tratamentos com 60 e 70% de GVL não apresentaram diferenças significativas entre si, mas os demais sim. Isso significa que utilizando 60 ou 70% de GVL os resultados seriam considerados estatisticamente iguais.

Teste Tukey para Glicose, %			
Pré-tratamentos	Médias	Resultados do teste	
80%GVL/0%Gli	75.65		a6
70%GVL/10%Gli	73.11	a5	a6
60%GVL/20%Gli	71.25	a5	a6
50%GVL/30%Gli	68.80	a4	a5
40%GVL/40%Gli	66.90	a3	a4
20%GVL/60%Gli	61.99	a3	
0%GVL/80%Gli	55.40	a2	
Não tratado	36.85	a1	

Em relação à xilose, oriunda da dissolução da hemicelulose, observa-se uma melhora de aproximadamente 46% pelo pior pré-tratamento, 0%GVL/80%Gli (somente com glicerol), quando comparado com o bagaço “Não tratado. Já o melhor resultado, 80%GVL/0%Gli

(somente GVL), quando comparado com o “Não tratado” a melhoria observada no resultado aproxima-se de 52%.

O pré-tratamento com 20% de GVL, apresentou uma piora no resultado de xilose de aproximadamente 12% quando comparado àquele com 0% de GVL. Isso permite observar que a adição de GVL ao sistema inicialmente prejudicou o pré-tratamento no que se refere à dissolução da hemicelulose. Nos pré-tratamentos com mistura de GVL e glicerol em diferentes proporções, os resultados de xilose foram bem semelhantes. No entanto, a condição de pré-tratamento, 80%GVL/0%Gli (somente GVL), apresentou melhoria de resultado em aproximadamente 9% quando comparado com o pior resultado dos pré-tratamentos, 0%GVL/80%Gli (somente glicerol).

Outra constatação foi de que individualmente o GVL teve um melhor efeito solvente do que o glicerol (7,66 contra 8,65%) no que se refere à dissolução da hemicelulose e consequente disponibilização da xilose. Observou-se também que não houve melhoria nos resultados de xilose proporcional ao aumento da porcentagem de GVL aos pré-tratamentos. Somado a isso, observa-se que a mistura dos dois solventes nas diferentes proporções não potencializou suas ações solventes, ou seja, não houve sinergia entre eles neste sentido.

Para os resultados de xilose, o Teste de Tukey mostrou que os pré-tratamentos com 20, 30, 40, 50, 60 e 70% de GVL não apresentaram diferenças significativas entre si. Isso significa que independente da porcentagem de GVL, os resultados seriam considerados estatisticamente iguais.

Teste Tukey para Xilose, %		
Pré-tratamentos	Médias	Resultados do teste
80%GVL/0%Gli	7.66	a1
70%GVL/10%Gli	9.33	a2
60%GVL/20%Gli	8.99	a2
50%GVL/30%Gli	9.18	a2
40%GVL/40%Gli	9.72	a2
20%GVL/60%Gli	9.67	a2
0%GVL/80%Gli	8.65	a1 a2
Não tratado	16.05	a3

Por fim, em relação à lignina, observa-se uma melhora de aproximadamente 20% do pré-tratamento 0%GVL/80%Gli (somente glicerol) quando comparado com o bagaço “Não

tratado”. Já o melhor resultado, 80%GVL/0%Gli (somente GVL), quando comparado com o “Não tratado”, a melhora do resultado aproxima-se de 65%.

O pré-tratamento com 20% de GVL, apresentou uma melhoria de aproximadamente 30% de lignina quando comparado àquele com 0% de GVL, ou seja, a adição de GVL ao pré-tratamento proporcionou melhor resultado no que se refere à dissolução da lignina. Do tratamento com 20 para 40% de GVL, também houve uma redução na lignina de aproximados 20%. O melhor resultado para lignina foi obtido com na condição de pré-tratamento utilizando somente GVL, 80%GVL/0%Gli, e este apresenta melhora de aproximadamente 60% quando comparado como pior resultado 0%GVL/80%Gli (somente glicerol).

Dessa forma, foi observado que individualmente, o GVL teve um melhor efeito solvente do que o glicerol (10,06 contra 24,66%) no que se refere à dissolução da lignina. Observou-se também que não houve melhora nos resultados de lignina proporcional ao aumento da porcentagem de GVL. Além disso, observa-se que a mistura dos dois solventes nas diferentes proporções inicialmente melhorou a dissolução da lignina, mas que a partir de 60% os resultados mostraram-se semelhantes.

Quando os resultados entre os pré-tratamentos são comparados entre si, essa melhora varia entre 1,02 e 1,36 vezes.

Estatisticamente, o Teste de Tukey mostrou que os resultados de lignina para os pré-tratamentos com 60, 70 e 80% de GVL não apresentaram diferenças significativas entre si. Isso significa que independente da porcentagem de GVL, os resultados seriam considerados estatisticamente iguais. Já os resultados com as demais porcentagens apresentaram diferenças entre si.

Teste Tukey para Lignina, %		
Pré-tratamentos	Médias	Resultados do teste
80%GVL/0%Gli	10.06	a1
70%GVL/10%Gli	10.28	a1
60%GVL/20%Gli	10.13	a1
50%GVL/30%Gli	11.55	a2
40%GVL/40%Gli	13.69	a3
20%GVL/60%Gli	17.3	a4
0%GVL/80%Gli	24.66	a5
Não tratado	30.98	a6

No que se refere à literatura, PYE et al. (2008) mostraram que o pré-tratamento com solvente orgânico aumentou os rendimentos e as taxas de conversão de sacarificação de celulose em comparação com a sacarificação catalisada por ácido. Além disso, a temperatura, a pressão de pré-tratamento e uma condição de pH neutro reduzem a degradação de carboidratos em furfural e HMF indesejáveis (KIM; PAN, 2010).

A literatura cita que o uso de solvente orgânico no pré-tratamento melhora o rendimento na sacarificação, sendo que concentrações superiores a 50% são observadas em diferentes trabalhos. NOVO et al. (2011) estudando a deslignificação do bagaço de cana utilizando glicerol como solvente observaram melhores resultados com 80% de glicerol.

4.2 Hidrólise ou Sacarificação Enzimática

A Tabela 6 apresenta os resultados da digestibilidade de glicose das biomassas submetidas às diferentes condições de pré-tratamentos. Conforme já descrito no capítulo anterior, item 3.3, e resumidamente lembrado aqui, a biomassa depois de submetida às diferentes condições de pré-tratamento, foi separada por filtração, lavada e seca em estufa. Posterior a isso, uma porção dessa massa seca foi utilizada para realizar a hidrólise enzimática, análise que viabilizou os resultados mostrados a seguir:

Tabela 6 – Digestibilidade da glicose

Tempo, h	Digestibilidade da glicose, %							
	80% GVL/ 0%Gli	70%GVL /10%Gli	60%GVL/ 20%Gli	50%GVL /30%Gli	40%GVL/ 40%Gli	20%GVL /60%Gli	0%GVL/ 80%Gli	Não tratado
0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
6	36.9	38.2	41.8	42.3	39.2	32.9	26.6	6.9
12	47.1	53.0	59.9	54.0	49.4	41.7	31.3	7.6
24	59.8	68.7	79.3	74.1	65.2	54.9	39.4	11.0
48	72.4	82.6	95.7	88.3	81.1	63.3	45.8	11.5
72	76.9	86.5	93.6	87.9	84.5	65.5	45.2	6.6

A Figura 22 expressa esses mesmos resultados de digestibilidade da glicose mostrados na Tabela 6, mas em formato de gráfico, o que facilita uma melhor visão do comportamento dos resultados obtidos para esta análise ao longo do tempo de reação:

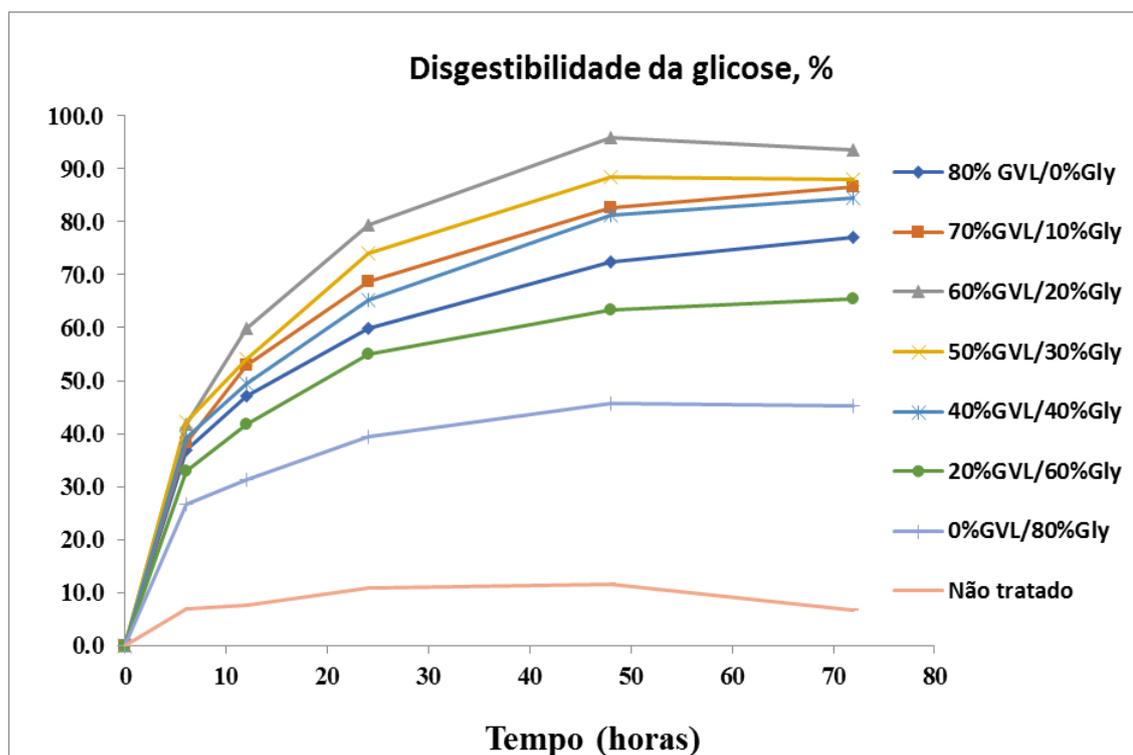


Figura 22 – Digestibilidade da glicose

Como pode ser observado na tabela e no gráfico anteriormente apresentados, a digestibilidade da glicose apresentou variações de resultados de acordo com cada condição de pré-tratamento à que a biomassa foi submetida. As discussões a seguir discorridas foram baseadas nos resultados da última amostra coletada, ou seja, 72h.

Comparando o bagaço “Não tratado” com os pré-tratamentos extremos, 0%GVL/80%Gli (somente glicerol) e 80%GVL/0%Gli (somente GVL), observa-se uma melhoria na digestibilidade da glicose que aumenta de 6,6 para 45,2% e de 6,6 para 76,9%, respectivamente. Ressalta-se que ao contrário do resultado da glicose na composição da biomassa, o pré-tratamento 80%GVL/0%Gli (somente GVL) não apresentou o melhor resultado de digestibilidade, mas o 0%GVL/80%Gli (somente glicerol), apresentou o pior resultado, coincidindo com o resultado da composição da biomassa em termos de glicose. Neste caso, pode-se dizer que o melhor resultado em termos de glicose na composição da biomassa não significa melhor resultado de digestibilidade da mesma.

O pré-tratamento com 20% de GVL, apresentou uma melhoria de aproximadamente 30% de digestibilidade de glicose quando comparado àquele com 0% de GVL. Dessa forma, percebe-se que a adição de GVL ao pré-tratamento proporcionou melhor resultado. Do

tratamento com 20 para 40% de GVL, também houve uma melhoria aproximada de 20%. Os resultados para os pré-tratamentos com 40, 50 e 70% de GVL apresentaram resultados próximos entre si, com 84.5, 87.9 e 86.5% de digestibilidade. Já o pré-tratamento com 80% de GVL mostrou uma piora no resultado quando comparado com os anteriormente descritos, diminuindo a digestibilidade para 76.9%. O melhor resultado para a digestibilidade da glicose foi obtido com na condição de pré-tratamento 60%GVL/20%Gli que alcançou 93,6%. Com isso, pode-se perceber que a digestibilidade da glicose não está vinculada diretamente ao aumento da porcentagem de GVL no pré-tratamento. Percebeu-se também que a maioria dos pré-tratamentos com os dois solventes misturados apresentaram melhores resultados de digestibilidade quando comparados com aqueles realizados com um dos solventes individualmente. Isso demonstra que a mistura potencializou os resultados.

Observou-se individualmente, que o pré-tratamento 80%GVL/0%Gli (somente GVL) resultou em uma maior digestibilidade da glicose do que o 0%GVL/80%Gli (somente glicerol), 76,9 contra 45,2%. Observou-se também que houve melhoria crescente nos resultados de digestibilidade da glicose até o pré-tratamento com 60%, quando atingiu o ápice de 93,6% de digestibilidade. Nas condições de pré-tratamentos seguintes, com 70 e 80% de GVL, os resultados decaíram para 86,5 e 76,9%, respectivamente. Isso indica que a mistura dos dois solventes entre 40 e 70% de GVL potencializou suas ações solventes, pois apresentaram resultados melhores que os dos solventes sem mistura um com o outro.

Aplicando o Teste de Tukey nos resultados da digestibilidade da glicose, pôde-se perceber que os pré-tratamentos com 50, 60 e 70% de GVL não apresentaram diferenças significativas entre si. Isso significa que independente da porcentagem de GVL, os resultados seriam considerados estatisticamente iguais. Já os resultados com as demais porcentagens apresentaram diferenças entre si.

Teste Tukey para Digestibilidade da glicose 72h, %		
Pré-tratamentos	Médias	Resultados do teste
80%GVL/0%Gli	76.9	a4
70%GVL/10%Gli	86.5	a5
60%GVL/20%Gli	93.6	a5
50%GVL/30%Gli	87.9	a5
40%GVL/40%Gli	84.5	a4 a5
20%GVL/60%Gli	65.5	a3
0%GVL/80%Gli	45.2	a2
Não tratado	6.6	a1

4.3 Rendimento da biomassa, recuperação de componentes e rendimento da glicose

O rendimento da biomassa, nada mais é do que a quantidade de biomassa seca que restou depois do pré-tratamento em relação a quantidade inicial que foi utilizada, expresso em porcentagem. Ressalta-se que resultados com maiores valores de rendimento de biomassa não significam melhor resultado, uma vez que uma menor quantidade de biomassa foi dissolvida pelos organosolventes e conseqüentemente restou maior quantidade após o pré-tratamento.

Os componentes recuperados relacionam os componentes da biomassa após o pré-tratamento com o rendimento da biomassa em relação à composição da biomassa sem pré-tratamento, ou seja, do bagaço bruto. O raciocínio sobre como interpretar os resultados como mais ou menos promissores segue o mesmo da composição da biomassa, já explicado no item 4.1.

Por fim, o rendimento da glicose está relacionado com o componente recuperado da biomassa e com a digestibilidade da glicose para cada condição de pré-tratamento. Nesse sentido, os resultados mais promissores são aqueles de maior valor numérico e os menos promissores, os de menor.

A Tabela 7 mostra os resultados de todos esses conceitos acima descritos, assim como a forma com que cada um deles foi calculado. Nessa mesma tabela são encontrados dados dos “componentes da biomassa” e de “digestibilidade da glicose”. Ambos conceitos e resultados já foram apresentados e discutidos anteriormente. No entanto eles se encontram nesta tabela a fim de auxiliar o entendimento.

Tabela 7 – Rendimento, composição e componentes recuperados da biomassa; digestibilidade e rendimento da glicose.

Pré-tratamento	Rendimento da biomassa (%) ^a	Composição da biomassa (%) ^b			Componentes recuperados (%) ^c			Digestibilidade da glicose 72h (%) ^d	Rendimento da glicose 72h (%) ^e
		Glicose	Xilose	Lignina	Glicose	Xilose	Lignina		
80% GVL/0%Gli	40.49	75.65	7.66	10.06	83.12	19.34	13.15	76.94	63.95
70%GVL/10%Gli	40.50	73.11	9.33	10.28	80.35	23.56	13.44	86.54	69.54
60%GVL/20%Gli	40.54	71.25	8.99	10.13	78.38	22.72	13.26	93.55	73.33
50%GVL/30%Gli	43.01	68.80	9.18	11.55	80.30	24.62	16.04	87.89	70.58
40%GVL/40%Gli	46.45	66.09	9.72	13.69	83.31	28.15	20.53	84.52	70.41
20%GVL/60%Gli	48.81	61.99	9.67	17.30	82.11	29.43	27.26	65.53	53.81
0%GVL/80%Gli	53.09	55.40	8.65	24.66	79.82	28.63	42.26	45.24	36.11
Não tratado	100.00	36.85	16.04	30.98	100.00	100.00	100.00	6.62	6.62

^aRendimento da biomassa (%) = quantidade de biomassa depois do pré-tratamento (g) / quantidade de biomassa usado no pré-tratamento (g) × 100%. ^bComponentes foi calculado baseado na biomassa seca. ^cComponente recuperado (%) = componente da biomassa depois do pré-tratamento (%) × rendimento da biomassa (%) / componente da biomassa antes do pré-tratamento (%) ^dDigestibilidade da glicose (%) = quantidade total de glicose depois da hidrólise enzimática (g) / (quantidade total de glicose na biomassa depois do pré-tratamento (glicose contente (%) × quantidade de biomassa (g)) × 1.11) × 100%. ^eRendimento da glicose (%) = glicose recuperada (%) × digestibilidade da glicose (%) / 100.

No que se refere ao rendimento de biomassa, pode-se observar que o pré-tratamento menos promissor foi aquele sem GVL, 0%GVL/80%Gli, e o resultado mais promissor ficou entre os pré-tratamentos com 60, 70 e 80% de GVL (60%GVL/20%Gli, 70%GVL/10%Gli e 80%GVL/00%Gli), dada a proximidade de seus valores. Observa-se que o pré-tratamento com a menor quantidade de GVL, 20%GVL/60%Gli, melhorou o resultado em aproximadamente 8% em relação àquele com zero de GVL, 0%GVL/80%Gli. Os resultados foram melhorando gradativamente com o aumento da porcentagem de GVL até o pré-tratamento 50%GVL/30%Gli. A partir dessa porcentagem, os resultados obtidos foram muito próximos. Isso demonstra que os resultados foram melhorados com a adição do GVL no sistema, mas após atingir a proporção ótima, estes permaneceram constantes.

Estatisticamente, o Teste de Tukey revelou que os resultados para rendimento da biomassa nos pré-tratamentos com 50, 60, 70 e 80% de GVL não apresentaram diferenças significativas entre si. Os pré-tratamentos com 20 e 40% de GLV também não apresentaram diferenças entre si. Isso significa que independente da porcentagem de GVL, os resultados seriam considerados estatisticamente iguais. Já os resultados com as demais porcentagens apresentaram diferenças entre si.

Teste Tukey para Rendimento da biomassa, %		
Pré-tratamentos	Médias	Resultados do teste
80%GVL/0%Gli	40.49	a1
70%GVL/10%Gli	40.50	a1
60%GVL/20%Gli	40.54	a1
50%GVL/30%Gli	43.01	a1
40%GVL/40%Gli	46.45	a2
20%GVL/60%Gli	48.81	a2
0%GVL/80%Gli	53.09	a3
Não tratado	100.00	a4

Em relação aos componentes recuperados da biomassa, observa-se que para o componente glicose, o melhor resultado encontrado foi para a condição de 60%GVL/20%Gli, 78,38%. No entanto, este resultado é somente 6% melhor que o pior entre eles, 40%GVL/40%Gli, com 83,31% de recuperação. Neste caso, valores mais baixos de glicose significam que após o pré-tratamento houve a extração e/ou recuperação de menor quantidade de glicose, uma vez que, provavelmente, maior quantidade foi extraída durante o pré-

tratamento. As outras condições de pré-tratamento provavelmente foram menos eficientes na extração de glicose e por isso apresentaram resultados com maiores porcentagens de glicose.

O Teste de Tukey revelou que todos resultados dos pré-tratamentos para recuperação da glicose são estatisticamente iguais. Somente o resultado para o bagaço não tratado é que apresentou diferença estatística.

Teste Tukey para Recuperação da glicose, %		
Pré-tratamentos	Médias	Resultados do teste
80%GVL/0%Gli	83.12	a1
70%GVL/10%Gli	80.35	a1
60%GVL/20%Gli	78.38	a1
50%GVL/30%Gli	80.30	a1
40%GVL/40%Gli	83.31	a1
20%GVL/60%Gli	82.11	a1
0%GVL/80%Gli	79.82	a1
Não tratado	100.00	a2

O mesmo raciocínio para a “composição da biomassa” deve ser seguido para os componentes xilose e lignina. Para a xilose, verifica-se que o melhor resultado foi para o pré-tratamento 80%GVL/0%Gli, com 19,34% de xilose. Esse valor representa resultado em torno de 53% melhor quando comparado com o pior resultado, neste caso o pré-tratamento 20%GVL/60%Gli, cujo resultado foi de 29,43%.

Estatisticamente, o Teste de Tukey mostrou que os resultados para recuperação da xilose nos pré-tratamentos com 50, 60 e 70 de GVL não apresentaram diferenças significativas entre si. Os pré-tratamentos com 0, 20 e 40% de GLV também não apresentaram diferentes entre si. Isso significa que independente da porcentagem de GVL, os resultados seriam considerados estatisticamente iguais. Já os resultados com 08% de GVL e o “Não tratado” apresentaram diferenças estatísticas.

Teste Tukey para Recuperação da xilose, %		
Pré-tratamentos	Médias	Resultados do teste
80%GVL/0%Gli	19.34	a1
70%GVL/10%Gli	23.56	a2
60%GVL/20%Gli	22.72	a2
50%GVL/30%Gli	24.62	a2
40%GVL/40%Gli	28.15	a3
20%GVL/60%Gli	29.43	a3
0%GVL/80%Gli	28.63	a3
Não tratado	100.00	a4

Para a recuperação da lignina, os três maiores percentuais, 60, 70 e 80% de GVL apresentaram valores bem próximos uns dos outros, 13.26, 13.44 e 13.15% respectivamente. Isso mostrou que o aumento na porcentagem de GVL de 50 para 80% não resultou em aumento proporcional na deslignificação. No entanto, quando comparamos os resultados destes três melhores pré-tratamentos com o pior deles, 0%GVL/80%Gli com 42.26%, verifica-se um melhor resultado cerca de 3.3 vezes.

Aplicando o Teste de Tukey, verificou-se que os resultados para recuperação de lignina nos pré-tratamentos com 50, 60, 70 e 80% de GVL não apresentaram diferenças significativas entre si. Isso significa que independente da porcentagem de GVL, os resultados foram considerados estatisticamente iguais. Já os resultados com as demais porcentagens apresentaram diferenças.

Teste Tukey para Recuperação da lignina, %		
Pré-tratamentos	Médias	Resultados do teste
80%GVL/0%Gli	13.15	a1
70%GVL/10%Gli	13.44	a1
60%GVL/20%Gli	13.26	a1
50%GVL/30%Gli	16.04	a1
40%GVL/40%Gli	20.53	a2
20%GVL/60%Gli	27.26	a3
0%GVL/80%Gli	42.26	a4
Não tratado	100.00	a5

No que se refere ao rendimento da glicose após as 72h de sacarificação enzimática, pode-se observar que o pré-tratamento de pior resultado, 0%GVL/80%Gli, melhorou o rendimento em aproximadamente 5,5 vezes quando comparado com o bagaço “Não tratado”.

Quando este é comparado com o melhor resultado, 60%GVL/20%Gli, a melhoria no resultado chega a 11 vezes.

Comparando os pré-tratamentos extremos, 0%GVL/80%Gli (somente glicerol) e 80%GVL/0%Gli (somente GVL), observa-se que este último apresentou resultado 1,77 melhor do que aquele. No entanto, ressalta-se que assim como no resultado da digestibilidade da glicose, o pré-tratamento 80%GVL/0%Gli (somente GVL) não apresentou o melhor resultado, mas o 0%GVL/80%Gli (somente glicerol), apresentou o pior resultado.

O pré-tratamento com 20% de GVL, apresentou uma melhoria de aproximadamente 1,5 no rendimento da glicose quando comparado àquele com 0% de GVL. Dessa forma, percebe-se que a adição de GVL ao pré-tratamento proporcionou melhoria no resultado. O resultado dos pré-tratamentos com 40 e 50% de GVL foram bem próximos, mas atingiu o ápice com 60%. Com 70 e 80% de GVL verificou-se uma piora no resultado de 5 e 13% quando comparado com o melhor resultado, 60%GVL/20%Gli. Percebeu-se também que todos pré-tratamentos com os dois solventes misturados apresentaram melhores resultados de rendimento quando comparados com aqueles realizados com os solventes individuais. Isso demonstra que a mistura potencializou os resultados.

Estatisticamente, o Teste Tukey revelou que os resultados para rendimento da glicose nos pré-tratamentos com 40, 50, 60, 70% de GVL não apresentaram diferenças significativas entre si. Isso significa que independente da porcentagem de GVL, os resultados seriam considerados estatisticamente iguais. Já os resultados com as demais porcentagens apresentaram diferenças entre si.

Teste Tukey para Rendimento da glicose 72h, %			
Pré-tratamentos	Médias	Resultados do teste	
80%GVL/0%Gli	63.95	a3	a4
70%GVL/10%Gli	69.54		a4
60%GVL/20%Gli	73.33		a4
50%GVL/30%Gli	70.58		a4
40%GVL/40%Gli	70.41		a4
20%GVL/60%Gli	53.81	a3	
0%GVL/80%Gli	36.11	a2	
Não tratado	6.62	a1	

Os gráficos da Figura 23, Figura 24 e Figura 25 expressam os mesmos resultados da Tabela 7 em formato de gráfico, o que facilita uma melhor visão do comportamento dos resultados obtidos para essas análises e/ou com esses cálculos:

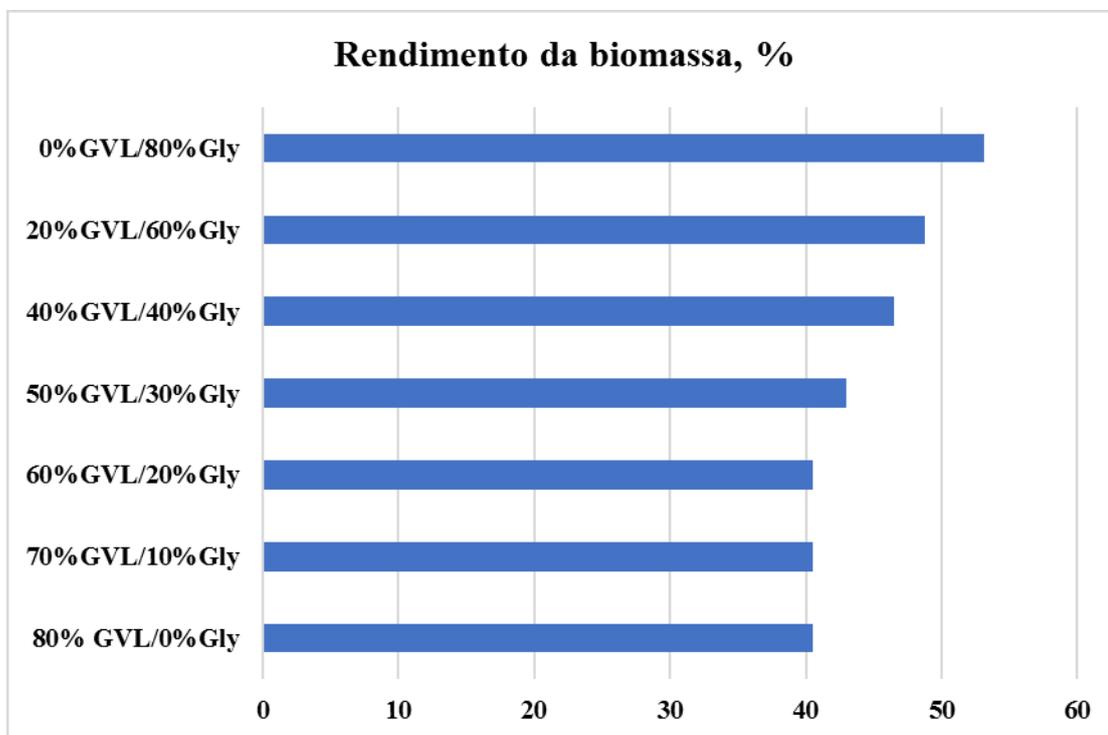


Figura 23 – Rendimento da biomassa

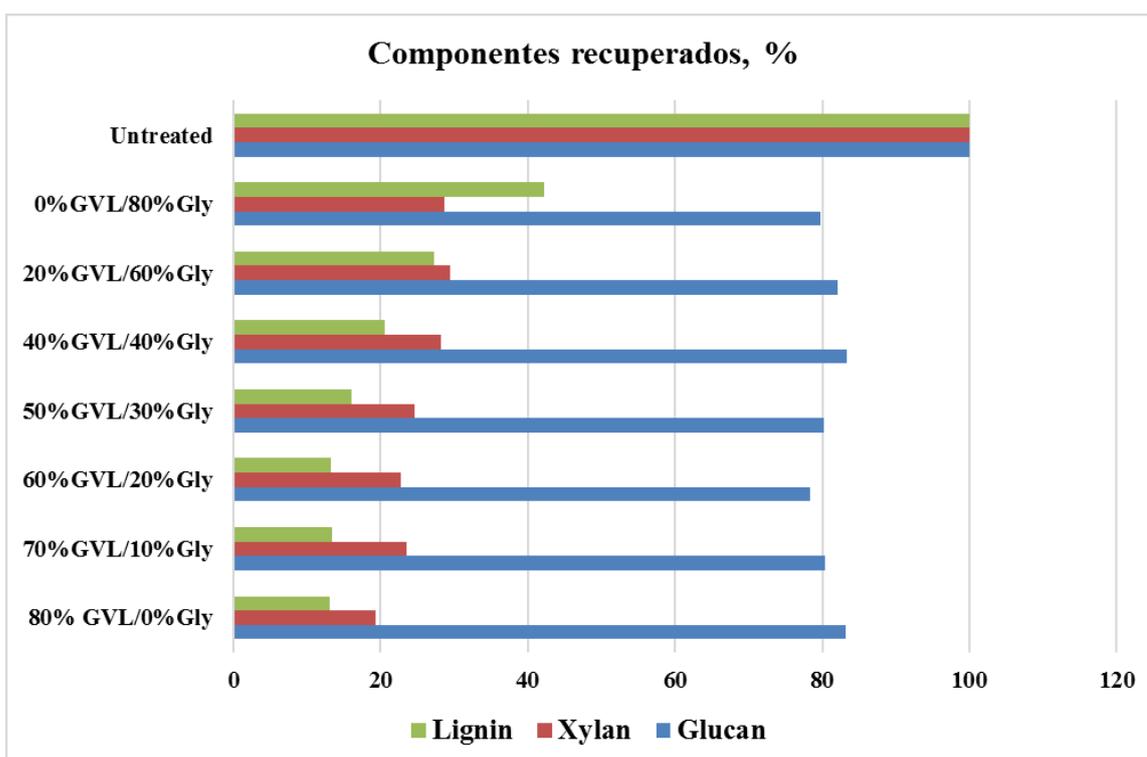


Figura 24 – Componentes recuperados

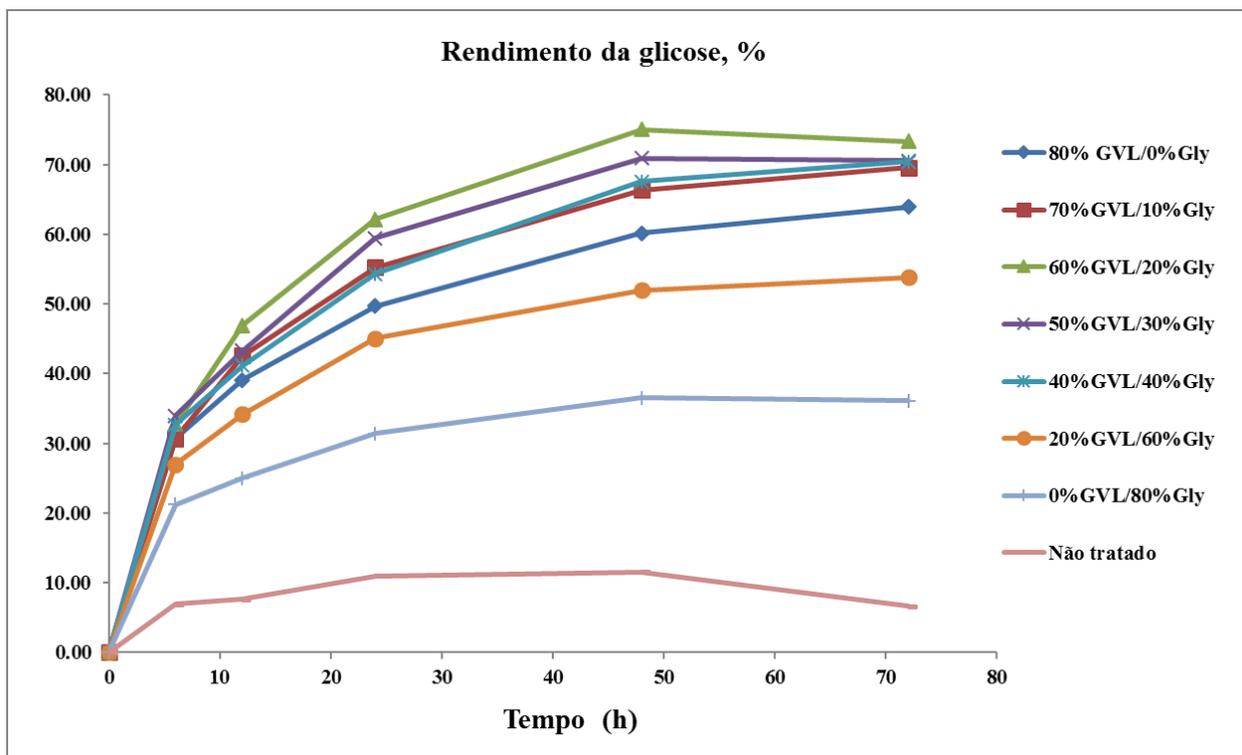


Figura 25 – Rendimento da glicose

4.4 Recuperação de solvente, carboidratos e subprodutos

A Tabela 8 mostra os resultados da concentração e distribuição do solvente GVL associado ao sistema bifásico formado, conforme já elucidado no capítulo 3. Além dos resultados, é mostrado no rodapé da mesma tabela, como cada um destes resultados foram calculados.

Tabela 8 – Concentração e distribuição de GVL

Pré-tratamento ^a	D ^b	Concentração de GVL, g/kg		Distribuição de massa de GVL (%) ^c	
		Fase solvente ^c	Fase aquosa ^d	Fase solvente	Fase aquosa
80% GVL/0%Gli	3.35	35.24	10.53	76.99	23.00
70%GVL/10%Gli	2.90	34.81	11.98	74.39	25.60
60%GVL/20%Gli	2.94	33.94	11.52	74.65	25.34
50%GVL/30%Gli	2.75	33.29	12.10	73.34	26.65
40%GVL/40%Gli	2.52	32.31	12.83	71.57	28.42
20%GVL/60%Gli	-	4.23	0	100	0
0%GVL/80%Gli	-	0	0	-	-

^aConcentração inicial dos solventes antes da indução de separação de fase. ^bCoefficiente de distribuição: concentração do componente (g/kg) na fase solvente / concentração do componente (g/kg) na fase aquosa. ^cValores calculados: (quantidade total do componente (g) – quantidade do componente na fase aquosa (g, concentração do componente na fase aquosa (g/kg) × quantidade da fase aquosa (kg)) / quantidade total da fase solvente (kg)) ^dResultados determinados por análise de HPLC. ^eDistribuição da massa de GVL: quantidade total de GVL em cada fase (g) / quantidade total de GVL nas duas fases (g) × 100%

A primeira observação que pode ser feita, é que a concentração de GVL é maior na fase solvente para todos as condições de pré-tratamentos, exceto para o 0%GVL/80%Gli, que não possui GVL em sua composição. Pode-se observar também que tanto a concentração quanto a distribuição deste solvente não varia muito de uma condição para outra. No entanto, nota-se que maiores proporções de GVL proporcionam um melhor resultado de recuperação, que vai decaindo conforme diminui a porcentagem de GVL. Estes números mostram que o uso do GVL no pré-tratamento tem grande viabilidade de recuperação ao final do pré-tratamento, com resultados superiores a 74% para a maioria dos casos estudados neste trabalho.

Pelo Teste de Tukey verificou-se que os resultados da concentração do GVL na fase solvente foram estatisticamente iguais entre os pré-tratamentos com 50 e 60% de GVL e também entre os com 70 e 80%. Os resultados dos outros pré-tratamentos foram considerados diferentes entre si. Para o GVL na fase aquosa, houve igualdade estatística entre os pré-tratamentos com 50, 60 e 70% de GVL. Os demais apresentaram diferenças estatísticas.

Teste Tukey para Concentração de GVL na fase solvente, g/kg		
Pré-tratamentos	Médias	Resultados do teste
80%GVL/0%Gli	35.24	a4
70%GVL/10%Gli	34.81	a4
60%GVL/20%Gli	33.94	a3
50%GVL/30%Gli	33.29	a3
40%GVL/40%Gli	32.31	a2
20%GVL/60%Gli	4.23	a1
0%GVL/80%Gli	0	

Teste Tukey para Concentração de GVL na fase aquosa, g/kg		
Pré-tratamentos	Médias	Resultados do teste
80%GVL/0%Gli	10.53	a1
70%GVL/10%Gli	11.98	a2
60%GVL/20%Gli	11.52	a2
50%GVL/30%Gli	12.10	a2
40%GVL/40%Gli	12.83	a3
20%GVL/60%Gli	0	
0%GVL/80%Gli	0	

A Figura 26 e a Figura 27 expressam esses mesmos resultados de concentração e distribuição de GVL mostrados na Tabela 8, mas em formato de gráfico, o que facilita uma melhor visão do comportamento dos resultados obtidos:

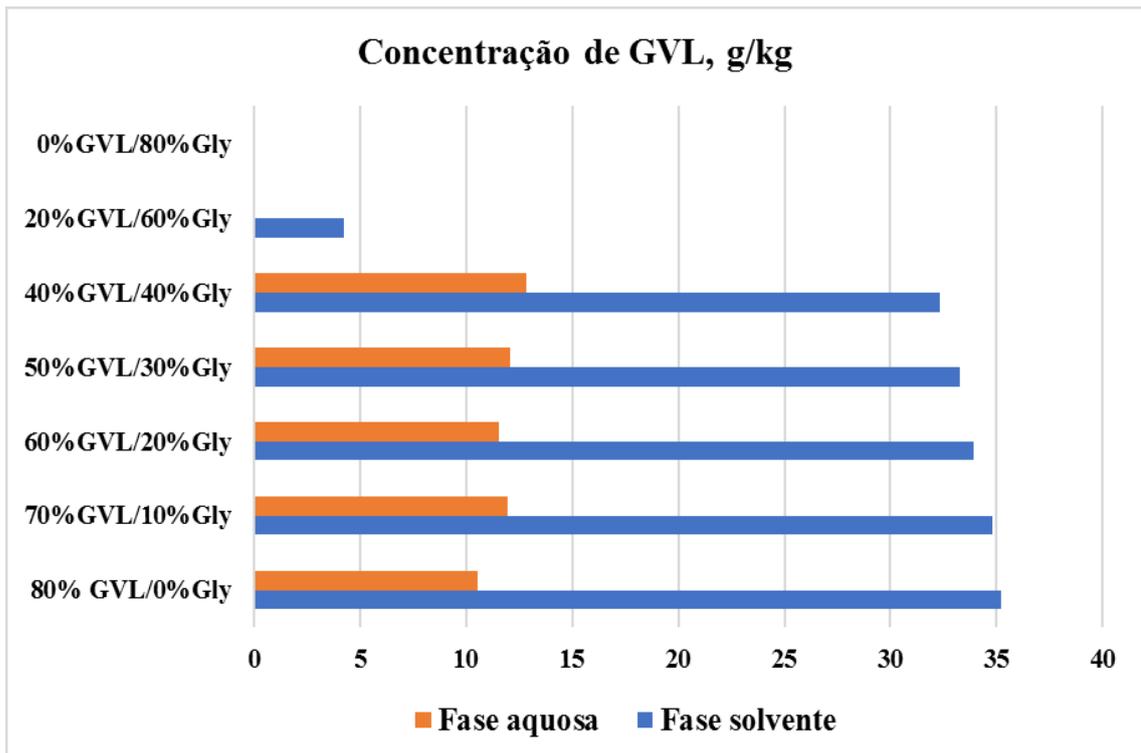


Figura 26 – Concentração de GVL

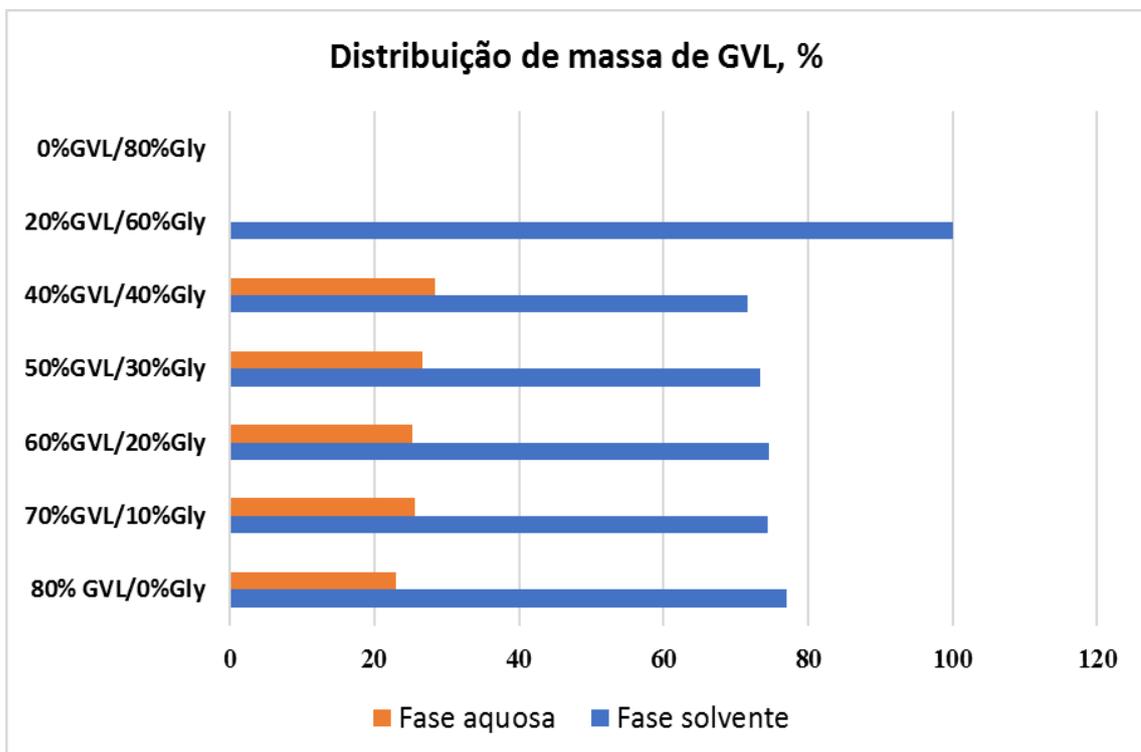


Figura 27 – Distribuição de massa de GVL

Em sequência, a Tabela 9 mostra os resultados da concentração e distribuição de glicose, carboidrato oriundo da dissolução da celulose. No rodapé da mesma, também é mostrado como cada um destes resultados foram calculados.

Tabela 9 – Concentração e distribuição de glicose

Pré-tratamento ^a	D ^b	Concentração de glicose, g/kg		Distribuição de massa de glicose (%) ^c	
		Fase solvente ^c	Fase aquosa ^d	Fase solvente	Fase aquosa
80% GVL/0%Gli	0	0	0.25	0	100
70%GVL/10%Gli	0	0	0.20	0	100
60%GVL/20%Gli	0	0	0.19	0	100
50%GVL/30%Gli	0	0	0.19	0	100
40%GVL/40%Gli	0	0	0.18	0	100
20%GVL/60%Gli	-	0	0	-	-
0%GVL/80%Gli	-	0	0	-	-

^aConcentração inicial dos solventes antes da indução de separação de fase. ^bCoefficiente de distribuição: concentração do componente (g/kg) na fase solvente / concentração do componente (g/kg) na fase aquosa. ^cValores calculados: (quantidade total do componente (g) – quantidade do componente na fase aquosa (g, concentração do componente na fase aquosa (g/kg) × quantidade da fase aquosa (kg)) / quantidade total da fase solvente (kg)). ^dResultados determinados por análise de HPLC. ^eDistribuição da massa de GVL: quantidade total de GVL em cada fase (g) / quantidade total de GVL nas duas fases (g) × 100%

Verifica-se, pelos resultados anteriormente mostrados, que não foi encontrada glicose na fase solvente e que o pouco dela detectada, encontra-se na fase aquosa. Ressalta-se ainda que, os pré-tratamentos 20%GVL/60%Gli e 0%GVL/80%Gli não formaram fase aquosa devido a alta concentração de glicerol. Com isso, pode-se deduzir que pouca quantidade de glicose foi retida no hidrolisado e que ela é pouco solúvel nos organosolventes em questão.

Verifica-se pelo Teste de Tukey que os resultados para a concentração da glicose na fase aquosa foram estatisticamente iguais para os pré-tratamentos com 60 e 70% de GVL. Os outros resultados apresentaram diferenças entre si.

Teste Tukey para Concentração de glicose na fase aquosa, %		
Pré-tratamentos	Médias	Resultados do teste
80%GVL/0%Gli	0.25	a3
70%GVL/10%Gli	0.20	a2
60%GVL/20%Gli	0.19	a2
50%GVL/30%Gli	0.19	a1 a2
40%GVL/40%Gli	0.18	a1
20%GVL/60%Gli	0	
0%GVL/80%Gli	0	

A Tabela 10 mostra os resultados da concentração e distribuição da xilose, que é o principal carboidrato oriundo da dissolução da hemicelulose. Logo abaixo dessa tabela, no rodapé, foi descrito como cada um destes resultados foram calculados.

Tabela 10 – Concentração e distribuição de xilose

Pré-tratamento ^a	Concentração de xilose, g/kg			Distribuição de massa da xilose (%) ^e	
	D ^b	Fase solvente ^c	Fase aquosa ^d	Fase solvente	Fase aquosa
80% GVL/0%Gli	0.14	0.20	1.37	12.79	87.2
70%GVL/10%Gli	0.22	0.17	0.77	18.41	81.58
60%GVL/20%Gli	0.28	0.17	0.60	21.94	78.05
50%GVL/30%Gli	0.34	0.16	0.47	25.39	74.60
40%GVL/40%Gli	0.44	0.16	0.36	30.54	69.45
20%GVL/60%Gli	-	0.28	0	100	0
0%GVL/80%Gli	-	0.26	0	100	0

^aConcentração inicial dos solventes antes da indução de separação de fase. ^bCoefficiente de distribuição: concentração do componente (g/kg) na fase solvente / concentração do componente (g/kg) na fase aquosa. ^cValores calculados: (quantidade total do componente (g) – quantidade do componente na fase aquosa (g, concentração do componente na fase aquosa (g/kg) × quantidade da fase aquosa (kg)) / quantidade total da fase solvente (kg)). ^dResultados determinados por análise de HPLC. ^eDistribuição da massa de GVL: quantidade total de GVL em cada fase (g) / quantidade total de GVL nas duas fases (g) × 100%

A partir dos dados desta tabela, observa-se que a concentração e conseqüentemente a distribuição de xilose está concentrada na fase aquosa em todas as condições de pré-tratamentos, exceto para o 20%GVL/60%Gli e 0%GVL/80%Gli, que não formaram fase aquosa devido a alta concentração de glicerol.

Observa-se também que tanto a concentração quanto a distribuição deste solvente não varia muito de uma condição para outra. No entanto, nota-se que nos pré-tratamentos com maiores proporções de GVL, maiores valores de xilose foram encontrados na fase aquosa. Em comparação com a glicose, pode-se observar que a xilose foi encontrada em maior concentração e que ela tem mais afinidade como os solventes utilizados neste estudo.

Pelo Teste de Tukey verificou-se que nenhum dos resultados da concentração de xilose na fase aquosa foram considerados estatisticamente iguais. Por outro lado, na fase solvente os pré-tratamentos com 40, 50, 60 e 70% de GVL apresentaram resultados estatisticamente iguais. Os demais apresentaram diferenças estatísticas.

Teste Tukey para Concentração de xilose na fase aquosa, g/kg		
Pré-tratamentos	Médias	Resultados do teste
80%GVL/0%Gli	1.37	a5
70%GVL/10%Gli	0.77	a4
60%GVL/20%Gli	0.60	a3
50%GVL/30%Gli	0.47	a2
40%GVL/40%Gli	0.36	a1
20%GVL/60%Gli	0	
0%GVL/80%Gli	0	

Teste Tukey para Concentração de xilose na fase solvente, g/kg		
Pré-tratamentos	Médias	Resultados do teste
80%GVL/0%Gli	0.20	a2
70%GVL/10%Gli	0.17	a1
60%GVL/20%Gli	0.17	a1
50%GVL/30%Gli	0.16	a1
40%GVL/40%Gli	0.16	a1
20%GVL/60%Gli	0.28	a4
0%GVL/80%Gli	0.26	a3

A Figura 28 e a Figura 29, a seguir, expressam esses mesmos resultados de concentração e distribuição da xilose mostrados na Tabela 10, no entanto, em formato de gráfico, o que facilita uma melhor visualização do comportamento dos resultados obtidos:

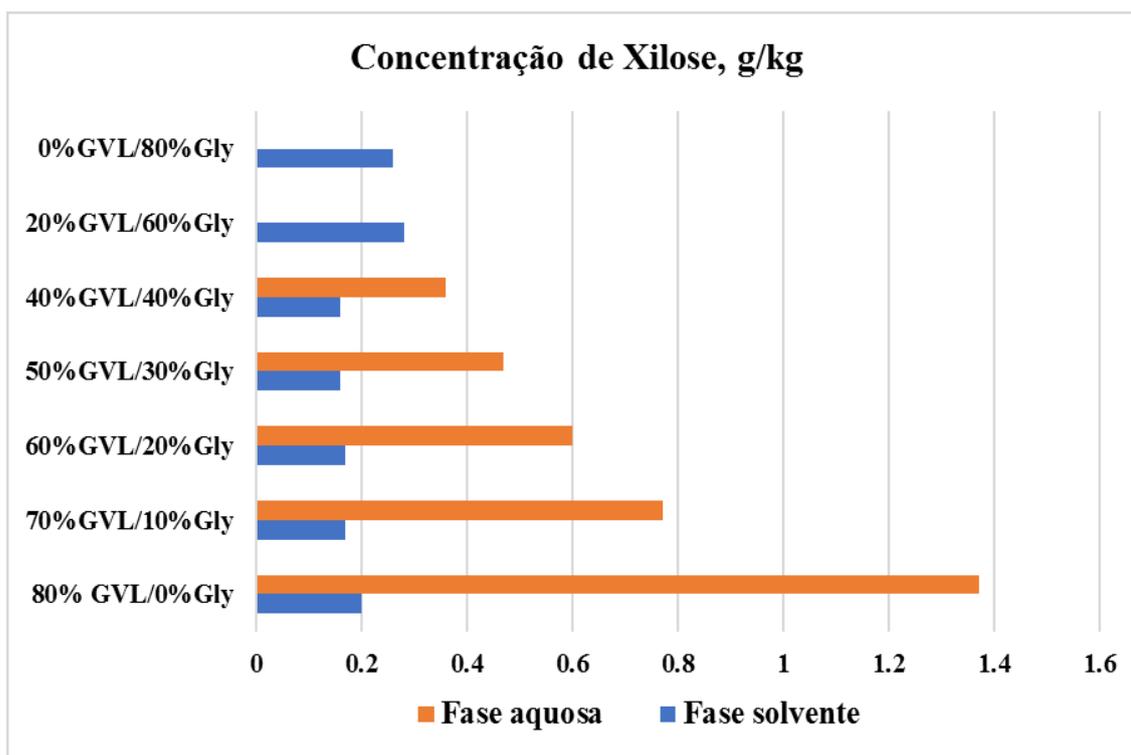


Figura 28 – Concentração de xilose

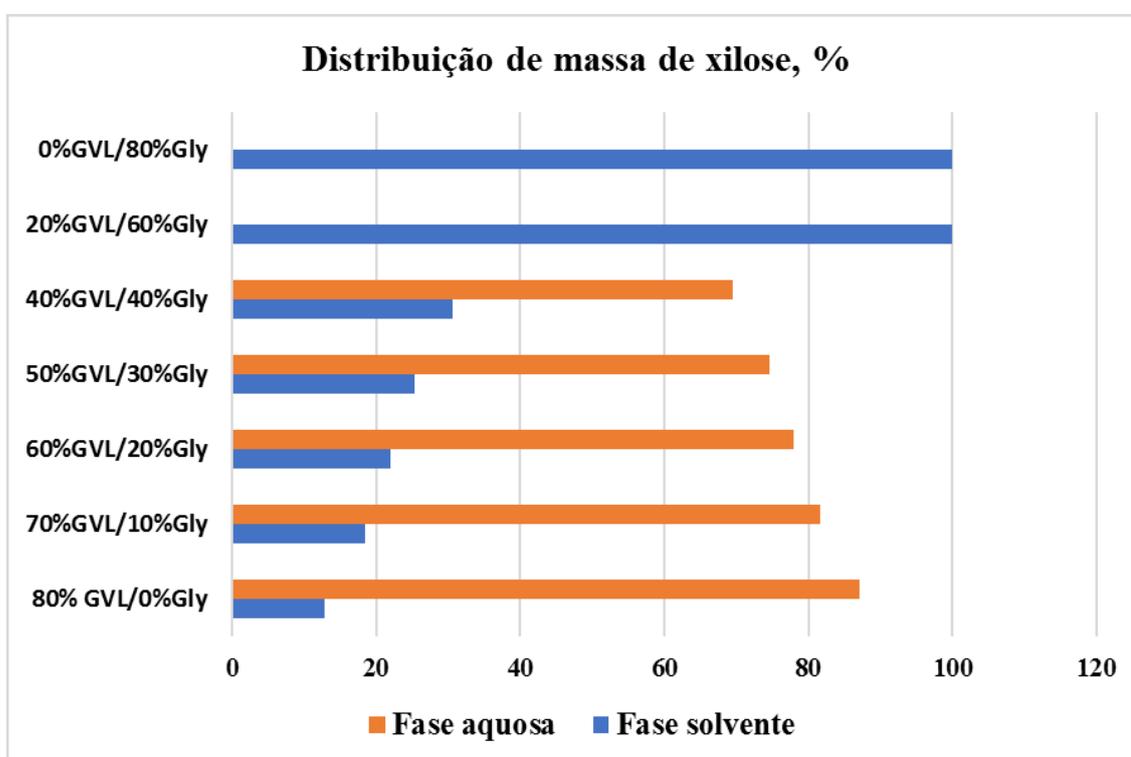


Figura 29 – Distribuição de massa de xilose

Nas análises realizadas, não foram encontrados resultados para os subprodutos da degradação dos carboidratos, principalmente no que se refere ao furfural e HMF, que, como já explanado anteriormente, são inibidores do processo de fermentação. Olhando pela ótica da produção de etanol pela fermentação, isso é uma vantagem pois evita-se preocupações neste sentido. Porém, o furfural e o HMF são compostos precursores para a produção de outros produtos de grande interesse e valor econômico.

Sendo assim, de uma forma geral, ressalta-se que a baixa concentração glicose e xilose na fase solvente e a ausência de subprodutos, favorece a recuperação do mesmo em alto grau de pureza.

Nesse sentido, MELLMER et al. (2014) relataram que o pré-tratamento em temperaturas mais baixas é favorável para a desconstrução da biomassa no solvente GVL para produzir açúcares C5 e C6 sem conversão para os produtos de açúcar aos componentes furânicos correspondentes. É importante ressaltar que a operação no solvente GVL leva a taxas mais altas de reações catalisadas por ácido em comparação com reações em água, permitindo assim altas taxas de conversão de biomassa a baixas temperaturas que são favoráveis à produção seletiva de monossacarídeos versus subsequente formação de compostos furânicos. Esse comportamento previsto explica os resultados encontrados em que altos rendimentos de açúcares foram produzidos pela desconstrução de biomassa em GVL em temperaturas amenas (por exemplo, 430-490 K) utilizando concentrações diluídas de ácidos minerais (por exemplo, 0,005 M)

4.5 Caracterização da biomassa sólida após o pré-tratamento

Conforme já explanado em item apropriado no capítulo 3, foram realizadas três diferentes técnicas para verificar quais foram as alterações que o pré-tratamento provocou na biomassa. São elas a relembrar: Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier - FT-IR, Microscópio eletrônico de varredura – MEV e Difração de Raio X - DRX.

Ressalta-se que essas técnicas não foram realizadas para a biomassa em todas as condições de pré-tratamentos. Para tal, foi selecionado aquele que apresentou melhor resultado de digestibilidade de glicose, melhor rendimento de biomassa e glicose, que foi o pré-tratamento com 60%GVL/20%Gli. Para fins comparativos, foram escolhidos também a biomassa submetida ao pré-tratamento sem a presença de GVL, 0%GVL/80%Gli, aquela sem

a presença de glicerol, 80%GVL/0%Gli e aquela denominada “Não tratada”. Os itens a seguir mostram e discutem os resultados obtidos para essas análises em cada um dos materiais analisados.

4.5.1 Caracterização por FT-IR

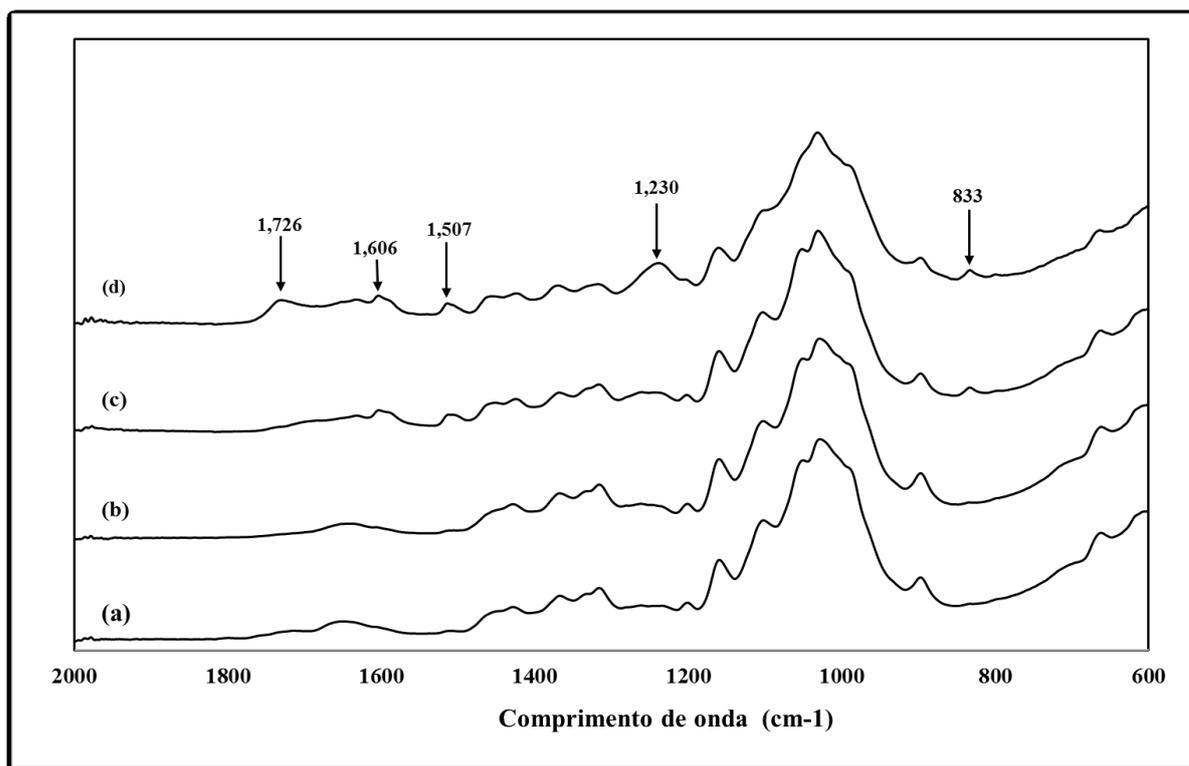
A análise espectroscópica de infravermelho por transformada de Fourier é uma técnica rápida e não destrutiva para a determinação qualitativa e quantitativa de componentes de biomassa na região média do infravermelho (TUCKER et al., 2001).

A alta absorvância de fundo infra vermelho da água é um obstáculo quando o FTIR é empregado na análise da biomassa sólida úmida, mas o ATR-FTIR permite a atenuação da radiação incidente e fornece espectros infra vermelho sem a absorvância do fundo da água. A preparação da amostra é um ponto crítico, porque o FTIR funciona bem com componentes individuais extraídos da parede celular da planta (SMITH-MORITZ et al., 2011).

O FT-IR fornece informações sobre certos componentes na parede celular da planta através de bandas de absorvância e tem sido amplamente empregado para estudar os componentes individuais ou a estrutura da biomassa (MOUILLE; ROBIN, 2003).

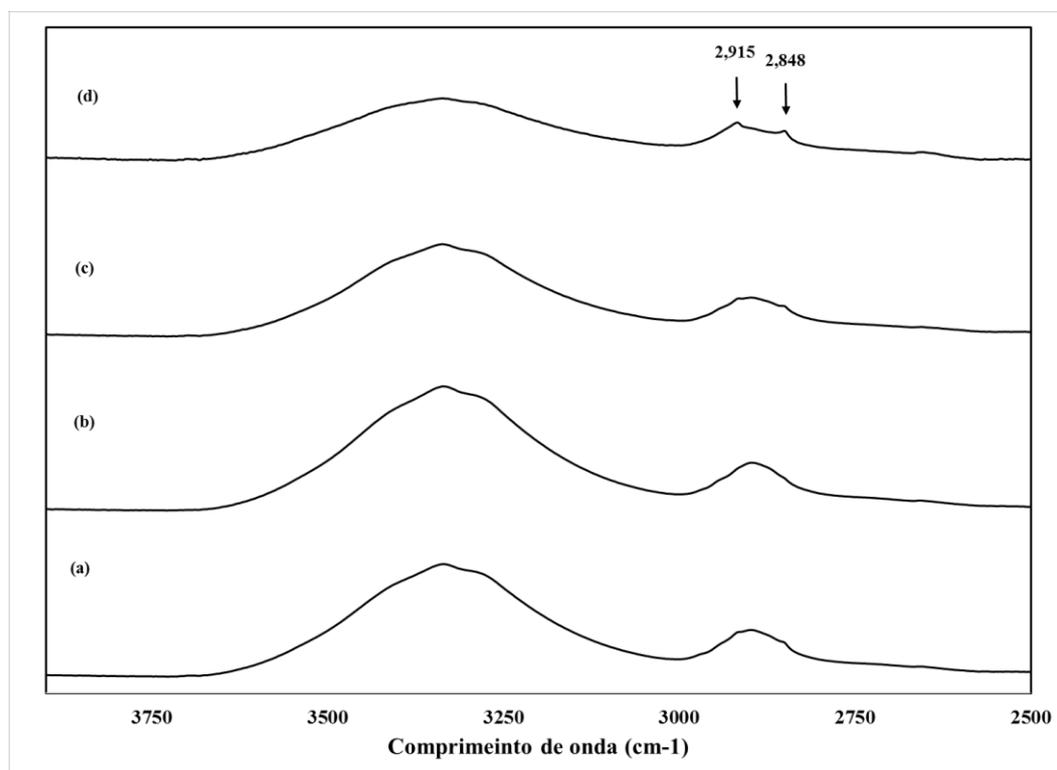
Neste trabalho, a espectroscopia FT-IR foi realizada para detectar as alterações químicas dos grupos funcionais da biomassa sem e com os pré-tratamentos na região de $4000\text{--}600\text{ cm}^{-1}$. Números de picos característicos foram usados para analisar as mudanças químicas que ocorreram na lignina e carboidratos.

A posição e intensidade dos picos nos espectros obtidos das amostras analisadas são semelhantes, porém foram verificadas alterações nos espectros da biomassa tratada quando comparada com a não tratada, conforme pode ser visualizado na Figura 30 e Figura 31. As atribuições da intensidade de cada um dos picos foram conduzidas de acordo com a literatura.



(a) 80%GVL/0%Gli; (b) 60% GVL/20% Gli; (c) 0%GVL/80%Gli; (d) Não tratado

Figura 30 – Espectros do FT-IR



(a) 80%GVL/0%Gli; (b) 60% GVL 20% Gli; (c) 0%GVL/80%Gli; (d) Não tratado

Figura 31 – Espectros do FT-IR (continuação)

Foram observadas variações nos espectros quando comparada a biomassa não tratada com a tratada e também entre as biomassas pré-tratadas. Comparado com a biomassa não tratada (d), os picos associados à lignina 1726 cm^{-1} , 1606 cm^{-1} , 1507 cm^{-1} , 1230 cm^{-1} e 833 cm^{-1} desapareceram ou atenuaram-se nos espectros da biomassa pré-tratada ((a), (b) e (c)), indicando a remoção parcial deste componente na biomassa pré-tratada.

A banda a 1726 cm^{-1} foi atribuída a ligações de éster de ácido urônico entre os grupos ácido carboxílico na hemicelulose e os grupos hidroxilas fenólicas na lignina e/ou entre os grupos ácidos carboxílicos a partir do ácido hidroxicinâmico da lignina e os grupos hidroxila da unidade de arabinofuranose (WANG et al., 2016). Verifica-se nos espectros que essa banda está presente somente na biomassa não tratada (d) e ausente em todas as outras que passaram pelo pré-tratamento ((a), (b) e (c)). Isso induz a crer que todos os pré-tratamentos foram eficazes no rompimento dessas ligações.

As bandas em 1606 cm^{-1} e 1507 cm^{-1} são atribuídas a vibrações aromáticas esquelética da lignina (LIU et al., 2009). Checando os espectros, verifica-se que essas duas bandas estão presentes na biomassa não tratada (d) e na biomassa (c), que foi pré-tratada com 0%GVL/80%Gli. Nas demais essa banda encontra-se ausente. Isso pode indicar que o pré-tratamento sem o GVL não foi eficaz na ruptura destas ligações.

A banda a 1230 cm^{-1} está associada com ligações β -éter na lignina e entre a lignina e carboidratos (LIU et al., 2009), e a banda a 833 cm^{-1} está relacionada com a vibração do plano em lignina siringil (LI et al., 2016). Analisando os espectros, verifica-se que a banda 1230 cm^{-1} aparece na biomassa não tratada, mas naquelas pré-tratadas aparece de forma bem branda. Isso é um indício de que todos os pré-tratamentos foram eficazes no rompimento dessas ligações.

Por fim, as bandas a 2848 e 2915 cm^{-1} , foram atribuídas à estiramento de ligações C-H e à vibrações também de ligações C – H; respectivamente. A primeira está associada à lignina e a segunda, à celulose e/ou hemicelulose (MA et al., 2015). Pode-se verificar nos espectros que essa banda está presente na biomassa não tratada (d) de forma mais acentuada e e nas outras que passaram pelo pré-tratamento ((a), (b) e (c)) apresentam-se de forma bem mais branda e/ou inexistem, indicando que os pré-tratamentos se mostraram eficazes no rompimento dessas ligações.

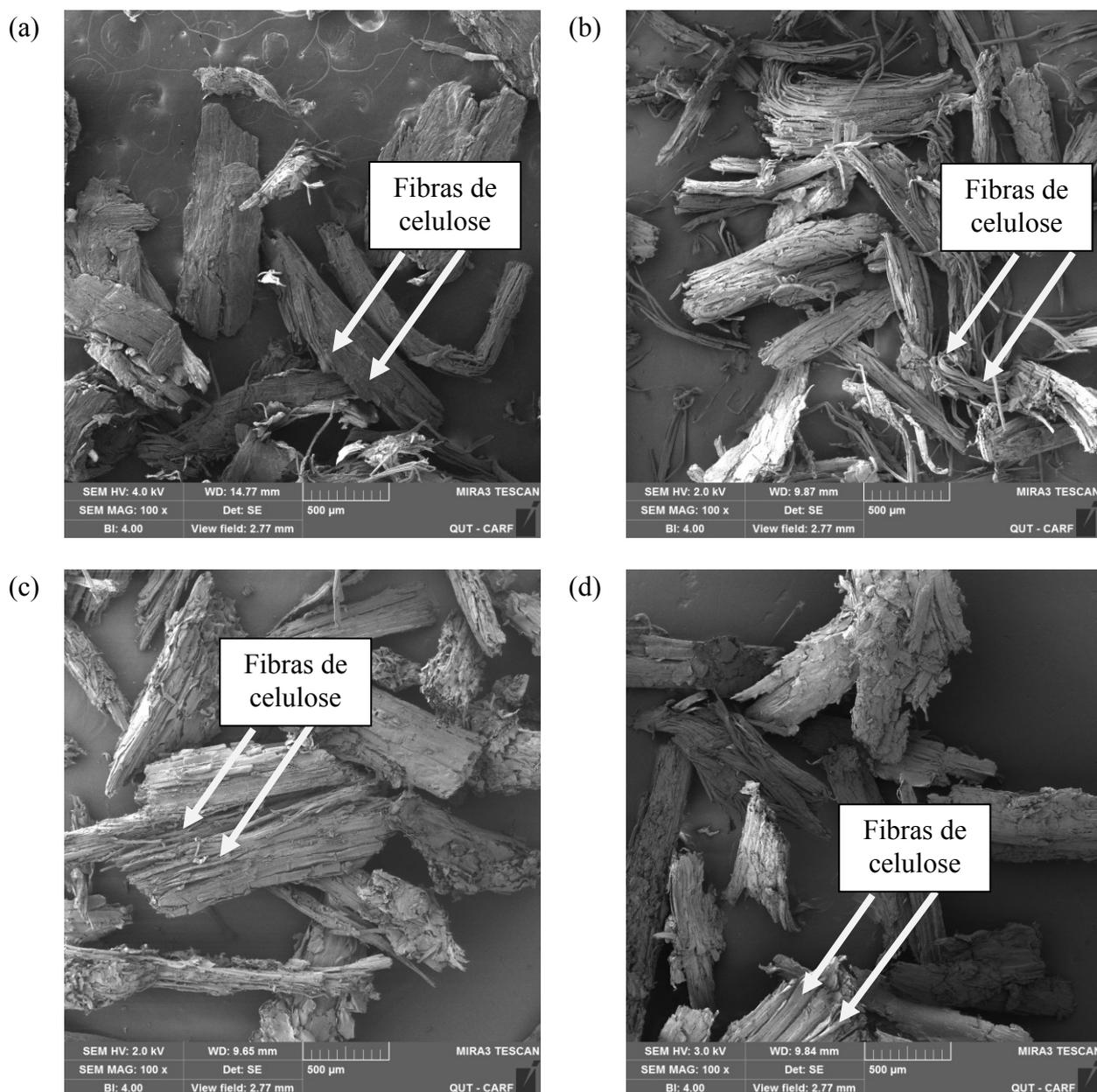
A Tabela 11 resume as bandas de absorvência correspondentes aos grupos funcionais apresentadas acima.

Tabela 11 – Grupos funcionais encontrados na biomassa

Comprimento de onda (cm-1)	Grupo Funcional	Polímero
833	Vibração na lignina siringil	Lignina
1,230	estiramento de ligações C-O + C-O	Lignina
1,507	vibração em anel aromático C-H	Lignina
1,606	vibração em anel aromático C-H	Lignina
1,726	Ligações	Lignina
2,848	estiramento de ligações C-H	Lignina
2,915	vibração em anel aromático C-H	Celulose e/ou hemicelulose

4.5.2 Caracterização por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Esta técnica foi utilizada com o intuito de verificar as alterações estruturais causadas na biomassa nas três diferentes condições de pré-tratamentos pré-determinadas e no bagaço não tratado. As fotos da Figura 32 e Figura 33 mostram em diferentes magnitudes, essas alterações comparando-as com a não tratada.



(a) 80%GVL/0%Gli; (b) 60%GVL/20%Gli; (c) 0%GVL/80%Gli; (d) Biomassa “Não tratada”
Fonte: autor

Figura 32 – Alterações estruturais na biomassa (magnitude de 100x e 500µm)

Nas fotos da (a) 80%GVL/0%Gli; (b) 60%GVL/20%Gli; (c) 0%GVL/80%Gli; (d) Biomassa “Não tratada”

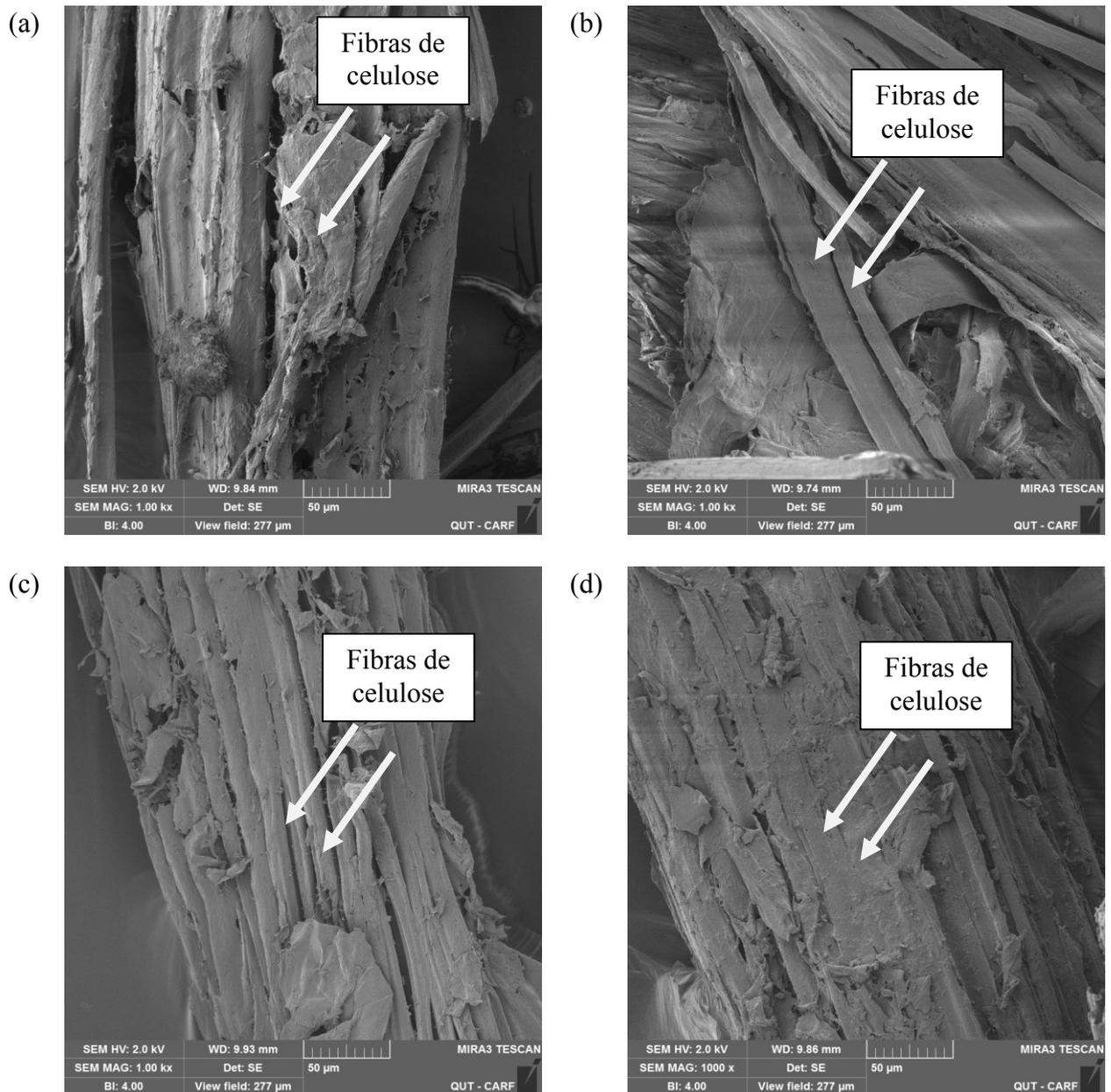
Fonte: autor

Figura 32 é possível observar as alterações estruturais que os pré-tratamentos provocaram nas fibras lignocelulósicas das biomassas. A foto identificada como (a) representa a biomassa submetida à condição de pré-tratamento com 80%GVL/0%Gli, a foto (b) a condição 60%GVL/20%Gli, a foto (c) a condição 0%GVL/20%Gli e a foto (d) a condição da biomassa “Não tratada”.

Por elas, observa-se que a biomassa “Não tratada” apresenta estruturas rígidas com fibras ordenadas. Sua superfície compacta e pouco porosa dificulta o acesso às enzimas. Após o pré-tratamento, foi possível observar mudanças estruturais no material tratado que se apresentou mais desestruturado em relação à sua morfologia original. A quantidade de ranhuras e a rugosidade das biomassas se tornaram mais proeminentes demonstrando a separação da compacta estrutura lignocelulósica.

Por meio dessas fotos foi possível perceber diferenças significativas no nível de desestruturação da morfologia entre as três biomassas pré-tratadas e a não tratada. Nota-se que na biomassa submetida ao tratamento 60%GVL/20%Gli (foto (b)), apresenta um nível de desestruturação bem maior que as demais, seguida por aquela submetida ao tratamento 80%GVL/0%Gli (foto (a)), 0%GVL/80%Gli (foto (c)) e “Não tratado” (foto (d)), em ordem decrescente de desestruturação.

As fotos da Figura 33 representam as mesmas imagens acima identificadas, porém com um nível maior de detalhamento. As primeiras foram capturadas com magnitude de 100x e 500 μ m e estas, com magnitude de 1000x e 50 μ m. A esse nível de detalhamento, é possível observar que o revestimento de lignina e hemicelulose nas fibras de celulose foram removidas em maior proporção na foto (b) que retrata o pré-tratamento com 60%GVL/20%Gli, onde é possível os feixos de fibra com maior nitidez.



(a) 80%GVL/0%Gli; (b) 60%GVL/20%Gli; (c) 0%GVL/80%Gli; (d) Biomassa “Não tratada”
Fonte: autor

Figura 33 – Alterações estruturais na biomassa

4.5.3 Avaliação da cristalinidade por Difração de Raio X – DRX e FT-IR

A cristalinidade foi calculada por dois métodos diferentes para fins de comparação dos resultados entre si. O primeiro deles a ser apresentado foi por Difração de Raio X - DRX e posteriormente, por Espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier - FT-IR.

O gráfico da Figura 34 apresenta os espectros resultantes da análise de difração de raio – X para os pré-tratamentos 80%GVL/0%Gli, 60%GVL/20%Gli, 0%GVL/80%Gli e “Não tratado”, representados pelos espectros (a), (b), (c) e (d), respectivamente.

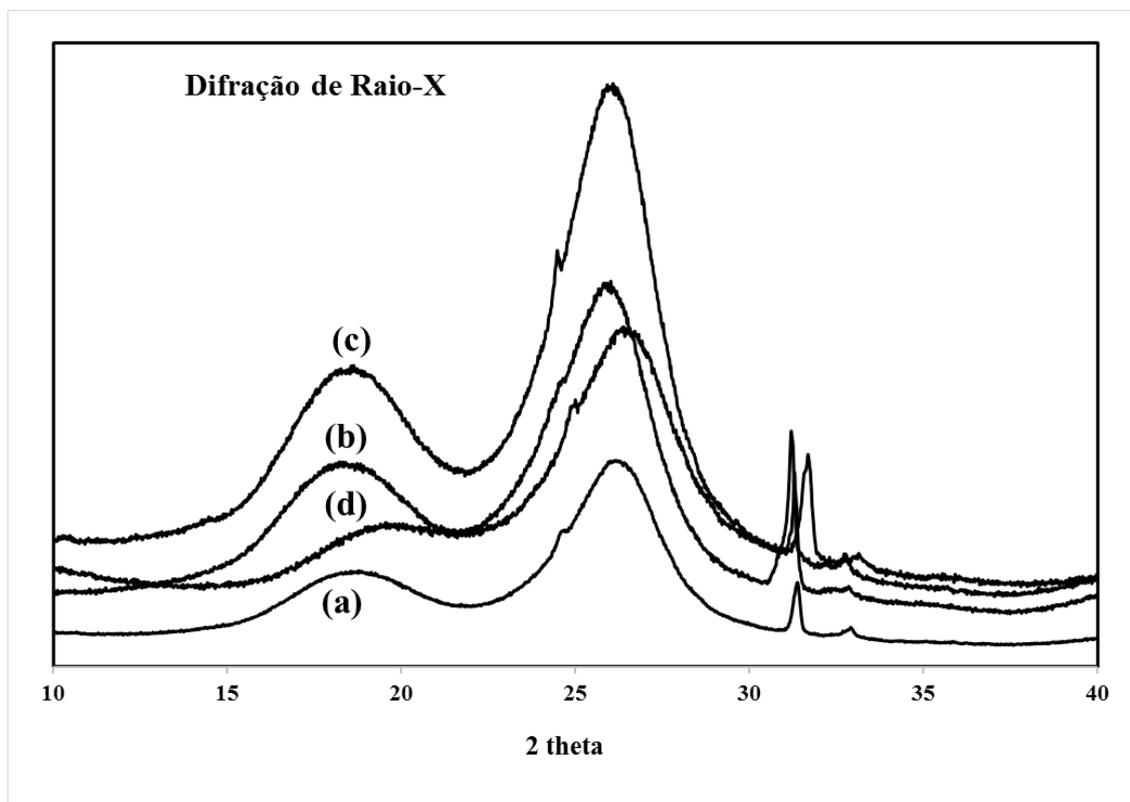


Figura 34 – Espectros de Difração de raio-X - DRX

A partir dos dados numéricos que originaram estes espectros, foi calculado o índice de cristalinidade - CrI de cada uma das biomassas. Estes resultados podem ser visualizados na Tabela 12:

Tabela 12 – Cálculo do índice de cristalinidade

	Índice de Cristalinidade			
	80%GVL/ 0%Gli	60% GVL/ 20% Gli	0%GVL/ 80%Gli	Não tratado
I_{002}^1	39704	32646.9	63427	43332.8
I_{sm}^2	17410	16756.3	31671.9	15462.75
Índice de cristalinidade³	56.151	48.674	50.066	64.316

¹ I_{002} = intensidade no pico cristalino 2 Θ (representa o maior valor da coluna). ² I_{am} = intensidade da parte representativa à região amorfa 18° (representa o valor para o angulo 2theta=18 graus). ³CrI= $(I_{002} - I_{sm}) / I_{002} * 100$

A Figura 35 expressa esses mesmos resultados do cálculo do índice de cristalinidade mostrados na Tabela 12, mas em formato de gráfico, o que facilita uma melhor visão do comportamento dos resultados obtidos:

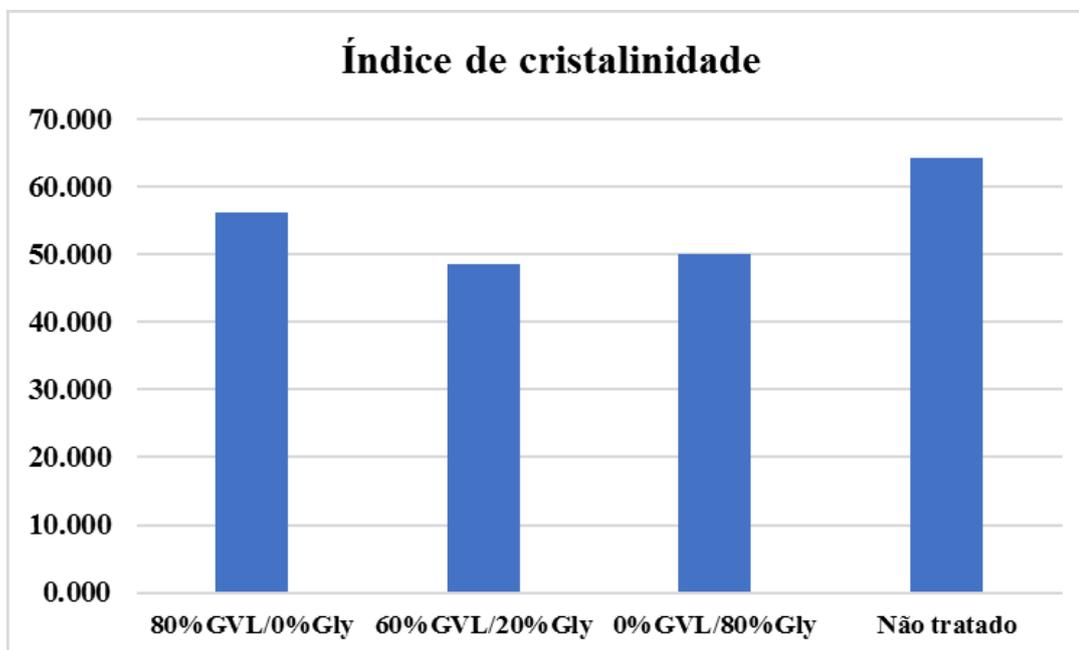


Figura 35 – Índice de cristalinidade

Observando os resultados apresentados, verifica-se que a biomassa pós pré-tratamento sofreu uma redução na cristalinidade em comparação com o bagaço não tratado. Comparando entre si a biomassa que foi tratada, constata-se que o pré-tratamento com 60%GVL/20%Gli apresentou o menor resultado, seguido do pré-tratamento 0%GVL/80%Gli e por ultimo o 80%GVL/0%Gli.

CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES E SUGESTOES

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, verificou-se que o pré-tratamento de bagaço de cana pela associação do γ -valerolactona e glicerol visando a digestibilidade da glicose presente na biomassa é uma estratégia promissora em biorrefinarias. Além disso, pode-se concluir que:

- ✓ O uso de GVL/Gli favoreceu o aumento da digestibilidade do bagaço em até 8,3 vezes quando comparado com o bagaço sem pré-tratamento, o que mostra que além de ampliar a disponibilidade de glicose, o uso do mesmo amplia o acesso das enzimas à celulose insolúvel de difícil acesso pela presença de lignina e hemicelulose.
- ✓ As técnicas de microscopia eletrônica, infravermelho e difratometria de raio-x foram capazes de mostrar que o pré-tratamento GVL/Gli gerou alterações nas fibras e no estado cristalino do bagaço.
- ✓ O GVL pode ser recuperado em proporções superiores à 74% sem a destilação do mesmo na fase aquosa, o que sugere que a saturação salina ser uma forma importante na recuperação do mesmo.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Avaliar a recuperação do GVL na fase aquosa por destilação e outras técnicas promissoras;
- ✓ Avaliar a economia de recuperação do GVL;
- ✓ Simular o processo de produção de etanol 2G com GVL em escala piloto e/ou industrial considerando os aspectos técnicos e econômicos.

CAPÍTULO 6 - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEN, A.; FOUST, T. An economic and environmental comparison of a biochemical and a thermochemical lignocellulosic ethanol conversion processes. *Cellulose Hydrolysis*, v. 16, p. 535-545, 2009.

<https://doi.org/10.1007/s10570-009-9317-x>

ALONSO, D. M. et al. Direct conversion of cellulose to levulinic acid and gamma-valerolactone using solid acid catalysts. *Catal. Sci. Technol*, v. 3, p. 927-931, 2013.

<https://doi.org/10.1039/C2CY20689G>

ALONSO, D. M.; BOND, J. Q.; DUMESIC, J. A. Catalytic conversion of biomass to biofuels. *Green Chemistry*, v. 12, n. 9, p. 1493, 2010.

<https://doi.org/10.1039/c004654j>

ALONSO, D. M.; WETTSTEIN, S. G.; DUMESIC, J. A. Gamma-valerolactone, a sustainable platform molecule derived from lignocellulosic biomass. *Green Chem.*, v. 15, p. 584-595, 2013.

<https://doi.org/10.1039/c3gc37065h>

ARAQUE, E. et al. Evaluation of organosolv pretreatment for the conversion of *Pinus radiata* D. Don to ethanol. *Enzyme Microbiological*, v. 43, p. 214-219, 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.08.006>

ARATO, C.; PYE, E. K.; GJENNESTAD, G. The lignol approach to biorefining of woody biomass to produce ethanol and chemicals. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 123, p. 871-882, 2005.

https://doi.org/10.1007/978-1-59259-991-2_74

BONAWITZ, N. D.; CHAPPLE, C. The genetics of lignin biosynthesis: connecting genotype to phenotype. *Annual Review of Genetics*, v. 44, n. 10.1146/annurev-genet-102209-163, p. 337-363, 2010.

<https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102209-163508>

BROWN, R. M. Cellulose structure and biosynthesis: What is in store for the 21st century? *Journal of Polymer Science*, v. 42, p. 487-495, 2004.

<https://doi.org/10.1002/pola.10877>

CALVO-FLORES, F. G.; DOBADO, J. A. Lignin as renewable raw material. *ChemSusChem*, v. 3, n. 10.1002/cssc.201000157, p. 27-35, 2010.

<https://doi.org/10.1002/cssc.201000157>

CATETO, C.; HU, G.; RAGAUSKAS, A. J. Enzymatic hydrolysis of organosolv *Kanlow* switchgrass and its impact on cellulose crystallinity and degree of polymerization. *Energy Environ. Sci.*, v. 4, p. 1516–1521, 2011.

<https://doi.org/10.1039/c0ee00827c>

CONSULTANT, E. P. S. Economic Study of Solvent Recycling and Treatment. [s.l: s.n.].
CONSULTANT, T. H. W. Solvent recovery: Regulatory requirements, technology and economics. [s.l: s.n.].

DEL RIO, L. F.; CHANDRA, R. P.; SADDLER, J. N. The effect of varying organosolv pretreatment chemicals on the physicochemical properties and cellulolytic hydrolysis of mountain pine beetle-killed lodgepole pine. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 161, p. 1-21, 2010.

<https://doi.org/10.1007/s12010-009-8786-6>

DING, S. Y.; HIMMEL, M. E. The maize primary cell wall microfibril: a new model derived from direct visualization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, p. 597-606, 2006.

<https://doi.org/10.1021/jf051851z>

DURAND, M. et al. Classification of organic solvents revisited by using the COSMO-RS approach. *Chem-Eur*, v. 17, p. 5155-5164, 2011.

<https://doi.org/10.1002/chem.201001743>

EBRINGEROVA, A.; HROMADKOVA, Z.; HEINZE, T. Hemicellulose. *Advanced Polymer Science*, v. 186, p. 1-67, 2005.

<https://doi.org/10.1007/b136816>

ESPINOZA-ACOSTA, J. L. et al. Ionic liquids and organic solvents for recovering lignin from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v. 9, p. 3660-3687, 2014.

<https://doi.org/10.15376/biores.9.2.3660-3687>

EWALD, P. P. *The Principles of X-ray Diffraction*. Disponível em: . Acesso em: 11 abr. 2018.
FANG, W.

SIXTA, H. Advanced biorefinery based on the fractionation of biomass in ??- valerolactone and water. *ChemSusChem*, v. 8, n. 1, p. 73-76, 2015.

<https://doi.org/10.1002/cssc.201402821>

FERRER, A. et al. Acetosolv pulping for the fractionation of empty fruit bunches from palm oil industry. *Bioresource Technology*, v. 132, p. 115-120, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.189>

GAVRILESCU, M. Biomass Potential for Sustainable Environment, Biorefinery Products and Energy. In: *Sustainable Energy in the Built Environment - Steps Towards nZEB*. [s.l: s.n.]. p. 169-194.

https://doi.org/10.1007/978-3-319-09707-7_13

GEBOERS, J. A. et al. Chemocatalytic conversion of cellulose: opportunities, advances and pitfalls. *Catalysis Science & Technology*, v. 1, n. 5, p. 714, 2011.

<https://doi.org/10.1039/c1cy00093d>

GHOZATLOO, A.; MOHAMMADI-ROVSHANDEH, J.; HASHEMI, S. Optimization of pulp properties by dimethyl formamide pulping of rice straw. *Cellul. Chem. Technol.*, v. 40, p. 659-667, 2006.

GOH, C. S. et al. Evaluation and optimization of organosolv pretreatment using combined severity factors and response surface methodology. *Biomass and Bioenergy*, v. 35, p. 4025-4033, 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.06.034>

GRIFFITHS, P.; DE HASSETH, J. A. *Fourier Transform Infrared Spectrometry*. WileyBlackwell, n. ISBN 0-471-19404-2., 2007.

<https://doi.org/10.1002/047010631X>

GURBUZ, E. I. et al. Conversion of hemicellulose into furfural using solid acid catalysts in γ -valerolactone. *Angew. Chem. Int. Ed.*, v. 52, p. 1270-1274, 2013.

<https://doi.org/10.1002/anie.201207334>

HAGE, R. E. et al. Characterization of Milled Wood Lignin and Ethanol Organosolv Lignin from *Miscanthus*. *Polymer Degradation and Stability*, v. 94, p. 1632-1638, 2009.

<https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2009.07.007>

HAGE, R. E. et al. Effect of Process on the Chemical Structure of *Miscanthus* Ethanol Organosolv Lignin. *Polymer Degradation and Stability*, v. 95, p. 997-1003, 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2010.03.012>

HALLAC, B. B. et al. Effect of ethanol organosolv pretreatment on enzymatic hydrolysis of *Buddleja davidii* stem biomass. *Ind. Eng. Chem.*, v. 49, p. 1467-1472, 2010.

<https://doi.org/10.1021/ie900683q>

HALLAC, B.; PU, Y.; RAGAUSKAS, A. Chemical Transformations of *Buddleja davidii* Lignin during Ethanol Organosolv Pretreatment. *Energy & Fuels*, v. 24, p. 2723-2732, 2010.

<https://doi.org/10.1021/ef901556u>

HAMES, B. et al. Preparation of Samples for Compositional Analysis Laboratory Analytical Procedure (LAP) Issue Date : 8 / 06 / 2008 Preparation of Samples for Compositional Analysis Laboratory Analytical Procedure (LAP). National Renewable Energy Laboratory, n. August, p. 1-9, 2008.

HARRIS, P. J.; TRETHERWAY, J. A. K. The distribution of ester-linked ferulic acid in the cell walls of angiosperms. *Phytochem Rev*, v. 9, p. 19-33, 2009.

<https://doi.org/10.1007/s11101-009-9146-4>

HAUSSER, N.; MARINKOVIC, S.; ESTRINE, B. New method for lignocellulosic biomass polysaccharides conversion in butanol, an efficient route for the production of butyl glycosides from wheat straw or poplar wood. *Cellulose*, v. 20, p. 2179-2184, 2013.

<https://doi.org/10.1007/s10570-013-9990-7>

HORVÁTH, I. T. et al. Valerolactone-a sustainable liquid for energy and carbon-based chemicals. *Green Chem.*, v. 10, p. 238-242, 2008.

<https://doi.org/10.1039/B712863K>

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

<https://doi.org/10.1021/sc300172v>

HUANG, Y.-B.; FU, Y. Hydrolysis of cellulose to glucose by solid acid catalysts. *Green Chemistry*, v. 15, n. 5, p. 1095, 2013.

<https://doi.org/10.1039/c3gc40136g>

HUNDT, M.; SCHNITZLEIN K.; SCHNITZLEIN M. Alkaline polyol pulping and enzymatic hydrolysis of hardwood: effect of pulping severity and pulp composition on cellulase activity and overall sugar yield. *Bioresource Technology*, v. 136, p. 672-679, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.02.084>

HUNDT, M.; SCHNITZLEIN, K.; SCHNITZLEIN, M. G. Alkaline polyol pulping and enzymatic hydrolysis of softwood: effect of pulping severity and pulp properties on cellulase activity and overall sugar yield. *Bioresource Technology*, v. 134, p. 307-315, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.02.018>

ISMAIL, T. N. M. T. et al. Synthesis and thermal properties of ester-type crosslinked epoxy resins derived from lignosulfonate and glycerol. *Polym. Int.*, v. 59, p. 181-187, 2010.

<https://doi.org/10.1002/pi.2705>

JESSOP, P. G. et al. Solvatochromic parameters for solvents of interest in green chemistry. *Green Chemistry*, v. 14, p. 1245-1259, 2012.

<https://doi.org/10.1039/c2gc16670d>

JOHN, M. J.; THOMAS, S. Biofibres and Biocomposites. *Carbohydrate Polymers*, v. 71, p. 343-364, 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.05.040>

JORDAN, D. B. et al. Plant cell walls to ethanol. *Biochemical Engineering Journal*, v. 2, p. 241-252, 2012.

<https://doi.org/10.1042/BJ20111922>

KARATZOS, S. K.; EDYE, L. A.; DOHERTY, W. O. S. Sugarcane bagasse pretreatment using three imidazolium-based ionic liquids; mass balances and enzyme kinetics. *Biotechnol. Biofuels*, v. 5, p. 62, 2012.

<https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-62>

KIM, D.; PAN, X. Preliminary study on converting hybrid poplar to high-value chemicals and lignin using organosolv ethanol process. *Ind. Eng. Chem.*, v. 49, p. 12156-12163, 2010. KIM, Y. et al. Ethanosolv pretreatment of barley straw with iron(III) chloride for enzymatic saccharification. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 85, p. 1494-1498, 2010.

<https://doi.org/10.1021/ie101671r>

KLEMM, D. et al. Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angewandte Chemie - International Edition*, v. 44, n. 22, p. 3358-3393, 2005.

<https://doi.org/10.1002/anie.200460587>

KOO, B. et al. Organosolv pretreatment of *Liriodendron tulipifera* and simultaneous saccharification and fermentation for bioethanol production. *Biomass Bioenergy*, v. 35, p. 1833-1840, 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.01.014>

LI, M. et al. Organosolv fractionation of lignocelluloses for fuels, chemicals and materials: a biorefinery processing perspective. In: *Biomass Conversion*. [s.l: s.n.]. p. 341-379.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-28418-2_11

LI, P. et al. Effect of acid pretreatment on different parts of corn stalk for second generation ethanol production. *Bioresour. Technol.*, v. 206, p. 86-92, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.01.077>

LIU, J. et al. Microwave-assisted pretreatment of recalcitrant softwood in aqueous glycerol. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 9355-9360, 2010.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.07.023>

LIU, L. et al. Enhanced enzymatic hydrolysis and structural features of corn stover by FeCl₃ pretreatment. *Bioresour. Technol.*, v. 100, p. 5853-5858, 2009.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.06.040>

LOPES, V. DOS S. Prospecção de biomassas lignocelulósicas para co-produção de etanol de segunda geração e biossurfactante empregando processos químicos e enzimáticos. p. 91, 2017.

LUTERBACHER, J. S. et al. Nonenzymatic sugar production from biomass using biomass-derived γ -valerolactone. *Science*, v. 343, p. 277-280, 2014.
<https://doi.org/10.1126/science.1246748>

LUTERBACHER, J. S. et al. Solvent-enabled nonenzymatic sugar production from biomass for chemical and biological upgrading. *ChemSusChem*, v. 8, n. 8, p. 1317-1322, 2015a.
<https://doi.org/10.1002/cssc.201403418>

LUTERBACHER, J. S. et al. Lignin monomer production integrated into the γ -valerolactone sugar platform. *Energy Environ. Sci.*, v. 8, n. 9, p. 2657-2663, 2015b.
<https://doi.org/10.1039/C5EE01322D>

MA, L. et al. Optimization and evaluation of alkaline potassium permanganate pretreatment of corncob. *Bioresour. Technol.*, v. 180, p. 1-6, 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.078>

MÄKI-ARVELA, P. et al. Recent progress in synthesis of fine and specialty chemicals from wood and other biomass by heterogeneous catalytic processes. *Catalysis Reviews - Science and Engineering*, v. 49, n. 3, p. 197-340, 2007.
<https://doi.org/10.1080/01614940701313127>

MÄKI-ARVELA, P. et al. Selective extraction of hemicelluloses from spruce using switchable ionic liquids. *Industrial Crops and Products*, v. 32, p. 175-201, 2010.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.04.005>

MANSUR, D. et al. Conversion of ethanol fermentation stillage into aliphatic ketones by twostep process of hydrothermal treatment and catalytic reaction. *Fuel Processing Technology*, v. 108, p. 139-145, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2012.05.026>

MARCUS, Y. The properties of organic liquids that are relevant to their use as solvating solvents. *Chemical Society Reviews*, v. 22, p. 409-416, 1993.
<https://doi.org/10.1039/cs9932200409>

MARTÍN, C. et al. Effect of Glycerol Pretreatment on Component Recovery and Enzymatic Hydrolysis of Sugarcane Bagasse. *Cellulose Chem. Technol.*, v. 45, p. 7-8, 2011.

MATTHEWS, J. F. et al. Computer simulation studies of microcrystalline cellulose Ibeta. *Carbohydrate Polymers*, v. 34, p. 138-152, 2006.
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2005.09.028>

MEHDI, H. et al. Integration of homogeneous and heterogeneous catalytic processes for a multi-step conversion of biomass: from sucrose to levulinic acid, γ -valerolactone, 1, 4-pent. *Top. Catal.*, v. 48, p. 49-54, 2008.
<https://doi.org/10.1007/s11244-008-9047-6>

MELLMER, M. A. et al. Effects of γ -valerolactone in hydrolysis of lignocellulosic biomass to monosaccharides. *Green Chem.*, v. 16, n. 11, p. 4659-4662, 2014.
<https://doi.org/10.1039/C4GC01768D>

MENON, V.; RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Progress in Energy and Combustion Science*, v. 38, n. 4, p. 522-550, 2012.
<https://doi.org/10.1016/j.peccs.2012.02.002>

MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v. 96, 2005.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.06.025>

MOTAGAMWALA, A. H. et al. An engineered solvent system for sugar production from lignocellulosic biomass using biomass derived γ -valerolactone. *Green Chem.*, v. 18, n. 21, p. 5756-5763, 2016.
<https://doi.org/10.1039/C6GC02297A>

MOUILLE, Â.; ROBIN, Â. Classification and identification of Arabidopsis cell wall mutants using Fourier-Transform InfraRed (FT-IR) microspectroscopy. *Plant Journal*, v. 35, p. 393-404, 2003.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01807.x>

NI, Y. Q.; HU, J. Alcell Lignin Solubility in Ethanol-Water Mixtures. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 57, p. 1441-1446, 1995.
<https://doi.org/10.1002/app.1995.070571203>

NOVO, L. P. et al. Delignification of sugarcane bagasse using glycerol-water mixtures to produce pulps for saccharification. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 10040-10046, 2011.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.08.050>

PAN, X. et al. The bioconversion of mountain pine beetle-killed lodgepole pine to fuel ethanol using the organosolv process. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 101, p. 39-48, 2008.
<https://doi.org/10.1002/bit.21883>

PANDE, M.; BHASKARWAR, A. N. Biomass Conversion. In: *Biomass conversion to energy*. [s.l.: s.n.]. p. 1-90.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-28418-2_1

PARAWIRA, W.; TEKERE, M. Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production: review. *Biotechnol*, v. 31, p. 20-31, 2011.
<https://doi.org/10.3109/07388551003757816>

PAULY, M. et al. Hemicellulose biosynthesis. *Planta*, v. 4, p. 627-642, 2013.
<https://doi.org/10.1007/s00425-013-1921-1>

PERLACK, R. D. et al. Biomass as Feedstock for a Bioenergy and Bioproducts Industry: the Technical Feasibility of a Billion-ton annual Supply. [s.l.] DTIC Document., 2005.
<https://doi.org/10.2172/885984>

PICCOLO, C.; BEZZO, F. A techno-economic comparison between two technologies for bioethanol production from lignocellulose. *Biomass and Bioenergy*, v. 33, n. 3, p. 478-491, 2009.
<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2008.08.008>

PYE, E. K. et al. High yield biorefining using organosolv processing. The 2008 Annual Meeting. *Anais...*2008

QI, L. et al. Catalytic conversion of fructose, glucose, and sucrose to 5-(hydroxymethyl) furfural and levulinic and formic acids in valerolactone as a green solvent. *Acs Catal*, v. 4, p. 1470-1477, 2014a.
<https://doi.org/10.1021/cs401160y>

QI, L. et al. Catalytic conversion of fructose, glucose, and sucrose to 5-(hydroxymethyl)furfural and levulinic and formic acids in gamma-valerolactone as a green solvent. *ACS Catal.*, v. 4, p. 1470-1477, 2014b.
<https://doi.org/10.1021/cs401160y>

REGALBUTO JR. Cellulosic biofuels--got gasoline? *Science*, v. 325, p. 822-824, 2009.
<https://doi.org/10.1126/science.1174581>

ROLLIN, J. A. et al. Increasing cellulose accessibility is more important than removing lignin: a comparison of cellulose solvent-based lignocellulose fractionation and soaking in aqueous ammonia. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 108, p. 22-30, 2011.
<https://doi.org/10.1002/bit.22919>

ROMANI, H. A. et al. Fractionation of eucalyptus globulus wood by glycerol-water pretreatment: optimization and modeling. *Ind. Eng. Chem.*, v. 52, p. 14342-14352, 2013.
<https://doi.org/10.1021/ie402177f>

SALVADOR, A. C.; SANTOS, M. C.; SARAIVA, J. A. Effect of ionic liquid and high pressure on the activity of cellulase. *Green Chemistry*, v. 12, p. 632-635, 2010.
<https://doi.org/10.1039/b918879g>

SANNIGRAHI, P.; RAGAUSKAS, A.; MILLER, S. Lignin structural modifications resulting from ethanol organosolv treatment of loblolly pine. *Energy Fuels*, v. 24, p. 683-689, 2010.
<https://doi.org/10.1021/ef900845t>

SANTOS, F. A et al. Potencial da palha de cana-de-aucar para produção de etanol. *Quimica nova*, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.
<https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000500025>

SHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology*, v. 61, p. 263-289, 2010. SEGAL, L. et al. An Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometer. *Textile Research Journal*, v. 29, n. 10, p. 786- 794, 1959.
<https://doi.org/10.1177/004051755902901003>

SELIG, M. J. et al. Deposition of lignin droplets produced during dilute acid pretreatment of maize stems retards enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnol. Prog.*, v. 23, p. 1333-1339, 2007.
<https://doi.org/10.1021/bp0702018>

SELIG, M.; WEISS, N.; JI, Y. Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass. *National Renewable Energy Laboratory*, n. March, p. 1-5, 2008.

SERRANO-RUIZ, J. C.; LUQUE, R.; SEPÚLVEDA-ESCRIBANO, A. Transformations of biomass-derived platform molecules: from high added-value chemicals to fuels via aqueous phase processing. *Chemical Society Reviews*, v. 40, n. 11, p. 5266, 2011.
<https://doi.org/10.1039/c1cs15131b>

SHELDON, R. A. Green and sustainable manufacture of chemicals from biomass: state of the art. *Green Chem.*, v. 16, n. 3, p. 950-963, 2014.
<https://doi.org/10.1039/C3GC41935E>

SHOSEYOV, O.; SHANI, Z.; LEVY, I. Carbohydrate binding modules: biochemical properties and novel applications. *Microbiol Mol Biol*, v. 70, p. 283-295, 2006.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.00028-05>

SHUAI, L.; QUESTELL-SANTIAGO, Y. M.; LUTERBACHER, J. S. A mild biomass pretreatment using γ -valerolactone for concentrated sugar production. *Green Chem.*, v. 18, n. 4, p. 937-943, 2016.
<https://doi.org/10.1039/C5GC02489G>

SLUITER, A. et al. NREL/TP-510-42618 analytical procedure - Determination of structural carbohydrates and lignin in Biomass. *Laboratory Analytical Procedure (LAP)*, n. April 2008, p. 17, 2012.

SLUITER, A et al. Determination of total solids in biomass and total dissolved solids in liquid process samples. National Renewable Energy Laboratory (NREL), n. March, p. 9, 2008.

SMITH-MORITZ, A. et al. Combining multivariate analysis and monosaccharide composition modeling to identify plant cell wall variations by Fourier Transform Near Infrared spectroscopy. *Plant Methods*, v. 7, p. 26, 2011.
<https://doi.org/10.1186/1746-4811-7-26>

SNELDERS, J. et al. Biorefining of wheat straw using an acetic and formic acid based organosolv fractionation process. *Bioresource Technology*, v. 156, p. 275-282, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.069>

SONG, Q. et al. Lignin depolymerization (LDP) in alcohol over nickel-based catalysts via a fragmentation-hydrogenolysis process. *Energy & Environmental Science*, v. 6, n. 3, p. 994, 2013.
<https://doi.org/10.1039/c2ee23741e>

SUN, F.; CHEN, H. Enhanced enzymatic hydrolysis of wheat straw by aqueous glycerol pretreatment. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 6156-6161, 2008a.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.12.027>

SUN, F.; CHEN, H. Organosolv pretreatment by crude glycerol from oleochemicals industry for enzymatic hydrolysis of wheat straw. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 5474-5479, 2008b.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.11.001>

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, v. 83, p. 1-11, 2002.
[https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00212-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00212-7)

TERAMOTO, Y.; LEE, S.; ENDO, T. Cost reduction and feedstock diversity for sulfuric acid-free ethanol cooking of lignocellulosic biomass as a pretreatment to enzymatic saccharification. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 4783-4789, 2009.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.04.054>

TUCKER, M. P. et al. Fourier transform infrared quantitative analysis of sugars and lignin in pretreated softwood solid residues. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 91, p. 51- 61, 2001.
https://doi.org/10.1007/978-1-4612-0217-2_4

VANDERGHEM, C. et al. Optimization of formic/acetic acid delignification of miscanthus. × giganteus for enzymatic hydrolysis using response surface methodology. *Industrial Crops and Products*, v. 35, p. 280-286, 2012.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.07.014>

WAN, C. X.; LI, Y. B. Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass. *Biotechnol Adv*, v. 30, n. 10.1016, p. 1447-1457, 2012.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.03.003>

WANG, Y. et al. Genetic modification of plant cell walls to enhance biomass yield and biofuel production in bioenergy crops. *Biotechnol*, v. 34, p. 997-1017, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.06.001>

WEINGARTEN, R. et al. Kinetics of furfural production by dehydration of xylose in a biphasic reactor with microwave heating. *Green Chem.*, v. 12, p. 1423-1429, 2010.
<https://doi.org/10.1039/c003459b>

WEISS, M.; PATEL, M. On the Environmental Performance of Biobased. *Methodology*, 2007.

WU, M. et al. Integration of mild acid hydrolysis in γ-valerolactone/water system for enhancement of enzymatic saccharification from cotton stalk. *Bioresource Technology*, v. 200, p. 23-28, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.09.111>

WYMAN, C. E. et al. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresource Technology*, v. 96, p. 1959-1966, 2005.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.01.010>

YANG, B.; WYMAN, C. E. Pre-Treatment: The Key to Unlocking Low-Cost Cellulosic Ethanol, *Biofuels*. *Bioprod, Bioref*, v. Vol. 2, n. doi:10.1002, p. 26-40, 2008.
<https://doi.org/10.1002/bbb.49>

ZHANG, J. et al. Effect of phosphoric acid pretreatment on enzymatic hydrolysis of microcrystalline cellulose. *Biotechnol*, v. 28, p. 613-619, 2010.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.05.010>

ZHANG, K.; PEI, Z.; WANG, D. Organic solvent pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and biochemicals: A review. *Bioresource Technology*, v. 199, p. 21-33, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.102>

ZHANG, Z. et al. Laboratory and pilot scale pretreatment of sugarcane bagasse by acidified aqueous glycerol solutions. *Bioresource Technology*, v. 138, p. 14-21, 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.065>

ZHANG, Z. et al. Organosolv pretreatment of plant biomass for enhanced enzymatic saccharification. *Green Chem.*, v. 18, n. 2, p. 360-381, 2016.
<https://doi.org/10.1039/C5GC02034D>

ZHANG, Z.; DOHERTY, W. O. S.; O'HARA, I. M. Integration of Salt-Induced Phase Separation with Organosolv Pretreatment for Clean Fractionation of Lignocellulosic Biomass. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, v. 5, n. 6, p. 5284-5292, 2017.
<https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b00617>

ZHAO, X. et al. A novel kinetic model for polysaccharide dissolution during atmospheric acetic acid pretreatment of sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, v. 151, p. 128-136, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.036>

ZHAO, X. B.; CHENG, K. K.; LIU, D. H. Fractionating pretreatment of sugarcane bagasse by aqueous formic acid with direct recycle of spent liquor to increase cellulose digestibility - the formiline process. *Bioresource Technology*, v. 117, p. 25-32, 2012.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.04.062>

ZHAO, X. B.; WANG, L.; LIU, D. H. Peracetic acid pretreatment of sugarcane bagasse for enzymatic hydrolysis: a continued work. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 83, p. 950-956, 2008.
<https://doi.org/10.1002/jctb.1889>

ZHAO, X. B.; WU, R. C.; LIU, D. H. Production of pulp, ethanol and lignin from sugarcane bagasse by alkali-peracetic acid delignification. *Biomass and Bioenergy*, v. 35, p. 2874-2882, 2011.
<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.03.033>

ZHAO, X.; CHENG, K.; LIU, D. organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 82, p. 815-827, 2009.
<https://doi.org/10.1007/s00253-009-1883-1>