



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Julieth Orduña Ortega

Pré-tratamento de palha de cana-de-açúcar empregando ozonólise, em meio aquoso alcalino e em solventes de baixo ponto eutético para a obtenção de açúcares fermentáveis

São José do Rio Preto
2021

Julieth Orduña Ortega

Pré-tratamento de palha de cana-de-açúcar empregando ozonólise, em meio aquoso alcalino e em solventes de baixo ponto eutético para a obtenção de açúcares fermentáveis

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: Universidad Santiago de Cali,
Cali, Colombia.

Orientador: Prof. Dr. Mauricio Boscolo
Coorientador: Prof. Dr. Jesús Larrahondo

São José do Rio Preto
2021

O77p

Ortega, Julieth Orduña

Pré-tratamento de palha de cana-de-açúcar empregando ozonólise, em meio aquoso alcalino e em solventes de baixo ponto eutético para a obtenção de açúcares fermentáveis / Julieth Orduña Ortega. -- São José do Rio Preto, 2021

137 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientador: Mauricio Boscolo

Coorientador: Jesús Larrahondo

1. Bioenergia. 2. Cana-de-açúcar. 3. Açúcares fermentáveis. 4. Etanol de segunda geração. 5. Ozônio. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Julieth Orduña Ortega

Pré-tratamento de palha de cana-de-açúcar empregando ozonólise, em meio aquoso alcalino e em solventes de baixo ponto eutético para a obtenção de açúcares fermentáveis

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: Universidad Santiago de Cali, Cali, Colombia

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Mauricio Boscolo
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Jaime Restrepo
UNIVALLE - CALI - COLOMBIA

Prof. Dr. Celso Caldas
IFAL – Alagoas

Prof. Dr. Walter Torres
UNIVALLE - CALI - COLOMBIA

Prof. Dr. George Jackson de Moraes Rocha
Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM)

São José do Rio Preto
03 de novembro de 2021

AGRADECIMENTOS

À Universidad Santiago de Cali pela concessão da bolsa de doutorado.

A meu orientador professor Mauricio, por ter me aceito em seu grupo e por ter me dado a oportunidade de conhecer um país lindo e pessoas extraordinárias.

Ao professor Dr. Jesus Larrahondo, pelo seu conselho e apoio nesta fase da minha vida.

Aos meus pais por sempre confiarem nas decisões que tomei e por todo seu amor.

Aos meus novos amigos do Brasil, tive o prazer de conhecer muitas pessoas boas e lindas, que nunca me fizeram sentir estrangeira.

À pessoa que sempre esteve ao meu lado com seu amor, paciência e apoio.

RESUMO

Existe atualmente uma tendência mundial no uso de fontes renováveis para processos de obtenção de biocombustíveis, bioenergia e biocompostos. A biomassa lignocelulósica é considerada uma fonte de grande valor, entretanto para alcançar maior valoração é preciso realizar a desconstrução da sua estrutura, a fim de diminuir sua recalcitrância. Existem diferentes metodologias que levam à extração dos biocompostos, sendo eles a celulose, hemicelulose e a lignina, ou derivado desses. Porém, estes métodos ainda se encontram em pesquisa, pois em sua maioria, são ineficientes, envolvem um elevado número de passos, são economicamente inviáveis e/ou precisam de altos consumos energéticos. Nas últimas décadas, adicionalmente, procura-se que sejam realizados em condições de reação condizentes com a química verde. No estudo presente, foi estudado o uso de palha da cana-de-açúcar como fonte de biomassa para a obtenção de açúcares fermentáveis, empregando ozônio com hidratação alcalina e ozônio com hidratação em meio de solventes de baixo ponto eutético (DES). Para a ozonólise foi estudado o efeito do reator (coluna estática e/ou rotatório), tempo e temperatura do tratamento, teor de umidade da biomassa e concentração do ozônio. Para o tratamento de hidratação foram estudados o meio, tempo e a temperatura do processo. Os resultados obtidos demonstraram que não houve perdas de holocelulose, pelo contrário, a celulose e hemicelulose aumentaram seu conteúdo em 75 e 42%, respectivamente com a remoção da lignina de até 49%. O tratamento alcalino foi responsável pelas principais mudanças na estrutura química da biomassa, entretanto, o tratamento com ozônio, teve seu efeito principal na hidrólise enzimática, atingindo rendimentos de conversão de 64 e 78% para glicose e xilose, respectivamente. A combinação destes tratamentos deu como resultado a produção de 450 mg g⁻¹ e 150 mg g⁻¹ de glicose e xilose, respectivamente. Além disso, foi encontrado que é possível usar ciclos de ozônio, os quais permitiram atingir a mesma eficiência, mas com uma redução em 80% no consumo. Finalmente, foi estudado o efeito da ozonólise após o tratamento da palha com diferentes misturas de DES. Foram sintetizados e caracterizados DES a partir de cloreto de colina e glicerina como compostos aceptores de hidrogênio e diferentes tipos de ácidos orgânicos (succínico, cítrico, levulínico, láctico, oxálico, málico), poliálcoois (sorbitol, glicerina) e ureia como compostos doadores de hidrogênio. Todas as misturas foram sintetizadas pelo método de aquecimento, determinadas suas densidades, viscosidades e caracterizadas por espectroscopia infravermelha e termogravimetria. Para o processo de hidratação foi estudado o efeito do tempo

e temperatura. Para os DES que apresentaram os melhores resultados em extração dos açúcares fermentáveis foi realizada a aplicação de ozônio.

Palavras-chave: Bioenergia. Açúcares fermentáveis. Ozônio e tratamento alcalino. Etanol de segunda geração. solventes eutéticos.

ABSTRACT

There is currently a worldwide trend towards using renewable sources in different processes such as bioenergy, biofuels and bio-compounds. One of the renewable sources with better projection is the lignocellulosic biomass. However, to increase its value it is necessary to carry out the deconstruction of its structure, leading to a diminution of its recalcitrant nature, which can be performed by different methods that enable the extraction of any of its three main components: cellulose, hemicellulose and lignin. Those methods are still under investigation because they are inefficient, with many steps, are economically unfeasible, and/or require high energy consumption. In the last decades, it is also sought that they can be carried out according to the principles of green chemistry. In the present study, the use of sugar cane leaf as biomass source in the obtention of fermentable sugars was investigated, employing ozone coupled with hydration alkaline and ozone coupled to hydration with solvents of low eutectic point (DES). For ozonolysis, the reactor effect (fixed bed reactor and/or rotatory), treatment time and temperature, biomass moisture content and ozone concentration were studied. For the hydration treatment the time, temperature of the process and the means were evaluated. The results obtained showed that there was no loss of holocellulose, unlike the cellulose and hemicellulose, which increased their content by 75 and 42 %, respectively, with lignin removal of 49 %. The alkaline treatment was the responsible for the main changes in the chemical structure of lignocellulosic material (LCM), however, the treatment with ozone presented its primary effect on the enzymatic hydrolysis, obtained conversion yields of 64 and 78 % for glucose and xylose, respectively. The combination of both treatments leads to the liberation of 450 mg g⁻¹ and 150 mg g⁻¹ of glucose and xylose, respectively. Additionally, it was found that it is possible to use ozone cycles with the same efficiency, but with an approximately 80% reduction in ozone consumption. Finally, the use of ozone was studied after the pretreatment of the sugar cane leaf with different mixtures of DES. These solvents were synthesized by heating method and choline chloride and glycerin were used as hydrogen acceptor compounds and different types of organic acids (succinic, citric, levulinic, lactic, oxalic, malic), polyalcohols (sorbitol, glycerin) and urea were used as hydrogen donors. The DES were characterized by infrared spectroscopy, thermogravimetry and their density and viscosity were studied. For the hydration process, variations on reaction time and temperature were evaluated and ozone application was performed for the eutectic mixture that presented the best result of lignin extraction.

Keywords: Bioenergy. Fermentable sugars. Ozonolysis e Alkaline treatment. Second generation ethanol. Deep eutectic solvents.

LISTA DE FIGURAS

2. CAPÍTULO 1: PRÉ-TRATAMENTO DE IMERSÃO E OZONÓLISE

Figura 1. Estrutura química dos monossacarídeos presentes como unidades monoméricas na hemicelulose -----	20
Figura 2. Ligações características na estrutura da lignina -----	21
Figura 3. Fluxograma para o desenvolvimento dos pré-tratamentos individuais -----	46
Figura 4. Fluxograma para o desenvolvimento do pré-tratamento combinados imersão-ozonólise -----	47
Figura 5. Efeito do tipo de reator, concentração de ozônio e tempo da ozonólise, sobre a quantidade de glicose e xilose liberados após da hidrólise enzimática -----	53
Figura 6. Efeito do teor de umidade da biomassa nos açúcares liberados -----	54
Figura 7. Efeito do meio de imersão e tempo do tratamento na BLC -----	55
Figura 8. Análise da composição química da biomassa para cada etapa do tratamento -----	68
Figura 9. Hidrólise enzimática da BLC e rendimento de conversão para cada etapa do processo -----	69
Figura 10. Espectros FTIR para a BLC, sem tratamento (linha preta), com imersão (linha cinza), imersão e com ozonólise (linha verde) -----	71
Figura 11. Açúcares liberados e rendimentos de conversão para BLC tratada com ciclos de ozônio -----	72
Figura 12. Caracterização química de biomassa tratada pelo método de controle e por ciclos -----	73
Figura 13. Variação na quantidade de BLC tratada pelo método de ciclos. -----	75
Figura 14. Variação na concentração do ozônio inserido ao reator pelo método de ciclos ---	76
Figura 15. Variação no tempo de exposição da BLC ao ozônio -----	77
Figura 16. Variação no tempo de reação da ozonólise -----	78

3. CAPÍTULO 2: PRÉ-TRATAMENTO EMPREGANDO SOLVENTES EUTÉTICOS (DES) E OZONÓLISE

Figura 1. Representação da diferença no ponto de fusão, ΔT_f , entre um DES e os constituintes iniciais. -----	91
Figura 2. Esquema da formação de um DES. Deformação da estrutura cristalina. -----	93

Figura 3. Reator usado no pré-tratamento de BLC com ozônio-----	102
Figura 4. Fluxograma para o desenvolvimento do pré-tratamento DES / Ozonólise-----	103
Figura 5. Estrutura química dos reagentes empregados para a síntese dos DES-----	106
Figura 6. Curvas termogravimétricas e as respectivas curvas da primeira derivada negativa dos DES a base de Cloreto de Colina -----	110
Figura 7. Curvas termogravimétricas e as respectivas curvas da primeira derivada negativa dos DES a base de Glicerina -----	113
Figura 8. Espectros vibracionais dos reagentes de partida na síntese dos DES -----	116
Figura 9. Espectros vibracionais dos DES a base de CC -----	117
Figura 10. Espectros vibracionais dos DES a base de Gli-----	118
Figura 11. Efeito da temperatura do pré-tratamento de BLC tratada com DES de CC na liberação de açúcares (Glicose e Xilose).-----	120
Figura 12. Efeito da temperatura do pré-tratamento de BLC tratada com DES de Gli na liberação de açúcares (Glicose e Xilose) -----	121
Figura 13. Efeito do tempo do pré-tratamento de BLC tratada com DES de CC na liberação de açúcares (Glicose e Xilose)-----	122
Figura 14. Efeito do tempo do pré-tratamento de BLC tratada com DES de Gli na liberação de açúcares (Glicose e Xilose)-----	123
Figura 15. Efeito da concentração do DES no pré-tratamento de BLC com DES de CC sobre a liberação de açúcares (Glicose e Xilose) -----	124
Figura 16. Efeito da concentração do DES no pré-tratamento de BLC com DES de Gli sobre a liberação de açúcares (Glicose e Xilose) -----	125

LISTA DE ESQUEMAS

2. CAPÍTULO 1: PRÉ-TRATAMENTO DE IMERSÃO E OZONÓLISE

Esquema 1. Reação inicial de unidades fenil propanol em meio alcalino -----	39
Esquema 2. Quebra de ligações β aril éter ou alquil éter em meio alcalino -----	39
Esquema 3. Reação para compostos não fenólicos β -aril éter em meio alcalino -----	40
Esquema 4. Reação de eliminação de formaldeído da lignina-----	40
Esquema 5. Reação geral de descamação de carboidratos em meio alcalino. -----	42
Esquema 6. Reação de ozônio com compostos aromáticos -----	43
Esquema 7. Reação entre ozônio e duplas ligações. A) alifáticas, B) aromáticas -----	44
Esquema 8. Inserção do ozônio na ligação A) aldeído e B) acetal de carboidratos -----	44
Esquema 9. Reação de espécies derivadas de ozônio com carboidratos -----	45

3. CAPÍTULO 2: PRÉ-TRATAMENTO EMPREGANDO SOLVENTES EUTÉTICOS (DES) E OZONÓLISE

Esquema 1. Mecanismo proposto para a quebra da ligação éter na lignina usando DES-----	96
Esquema 2. Mecanismo proposto para a clivagem das ligações metoxi em lignina por efeito do DES baseados em Zn -----	96
Esquema 3. Mecanismo proposto pelo grupo de Shen para a despolimerização da lignina--	97

LISTA DE TABELAS

2. CAPÍTULO 1: PRÉ-TRATAMENTO DE IMERSÃO E OZONÓLISE

Tabela 1. Composição química da palha de cana-de-açúcar sem tratamento. -----	52
Tabela 2. Otimização dos parâmetros de imersão. Rendimentos na hidrólise de palha de cana-de-açúcar tratada por imersão e ozonólise. -----	57
Tabela 3. Otimização dos parâmetros da ozonólise. Rendimentos da hidrólise enzimática de palha de cana-de-açúcar tratada por imersão e ozonólise. -----	58
Tabela 4. Efeito sobre os açúcares liberados da quantidade e tipo de solução de lavagem após a imersão alcalina e ozonólise de palha de cana-de-açúcar. -----	60
Tabela 5. Açúcares redutores e compostos fenólicos totais nos hidrolisados e soluções de lavagem. -----	62
Tabela 6. Quantificação de ácidos orgânicos de baixo peso molecular em licor, soluções de lavagem e hidrolisado. -----	64
Tabela 7. Efeito dos pré-tratamentos e etapas de lavagem na composição química, rendimentos de conversão de açúcares e rendimentos de sólidos. -----	65

3. CAPÍTULO 2: PRÉ-TRATAMENTO EMPREGANDO SOLVENTES EUTÉTICOS (DES) E OZONÓLISE

Tabela 1. Condições de síntese para os DES.....	101
Tabela 2. Densidade, Viscosidade e Temperatura de degradação dos DES sintetizados.....	108
Tabela 3. Condições escolhidas para o tratamento com DES.	126
Tabela 4. Metodologias de lavagem testadas para biomassa tratada com DES.	127
Tabela 5. Resultados de caracterização e de hidrólise enzimática, obtidos para a biomassa tratada com CC-Cit, CC-Ox, Gli-Cit e Gli-Ox e com as seis metodologias de lavagem.....	128
Tabela 6. Efeito dos pré-tratamentos com DES e ozônio na composição química, rendimentos de conversão de açúcares e rendimentos de sólidos.....	129
Tabela 7. Efeito dos pré-tratamentos com DES e ozônio na perda de celulose, hemicelulose e remoção de lignina. Composição dos constituintes no licor de tratamento com DES.....	131

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2G - Segunda geração

ART - Açúcares redutores totais

BLC - Biomassa lignocelulósica

BOR- Ácido bórico

CC - Cloreto de Colina

CFT - Compostos fenólicos totais

CIT – Ácido cítrico

DES - *Deep Eutectic Solvents*

DNP - 2,4 dinitrofenilhidrazina

DNS - Ácido 3,5 dinitrosalicílico

FTIR - ATR - Espectroscopia vibracional infravermelha com transformada de Fourier e com reflexão total atenuada

GLI - Glicina

HMF – Hidroximetilfurfural

LAC- Ácido láctico

LEV – Ácido levulínico

MAL – Ácido málico

OX – Ácido oxálico

SOR - Sorbitol

S.T. - Sem tratamento

SUC – Ácido succínico

TGA – Análise termogravimétrico

Ur – Ureia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
REFERÊNCIAS	28
2. <u>CAPÍTULO 1: PRÉ-TRATAMENTO DE IMERSÃO E OZONÓLISE.</u>	35
2.1 INTRODUÇÃO	36
2.2 REVISÃO DA LITERATURA	37
2.2.1 Pré-tratamento alcalino em condições brandas: imersão alcalina	37
2.2.1.1 Principais reações da lignina em condições alcalinas	38
2.2.1.2 Principais reações dos carboidratos em meio alcalino	40
2.2.2 Ozonólise	42
2.2.2.1 Principais reações do ozônio com a BLC	43
2.3. METODOLOGIA	45
2.3.1 Preparação da biomassa	45
2.3.2 Pré-tratamento da biomassa	45
2.3.2.1 Pré-tratamento de imersão (meio ácido, alcalino e neutro)	47
2.3.2.2 Pré-tratamento com ozônio.	47
2.3.3 Caracterização química da biomassa	49
2.3.4 Hidrólise enzimática da biomassa	49
2.3.5 Caracterização por espectroscopia vibracional infravermelha com transformada de Fourier e com reflexão total atenuada (FTIR-ATR) da biomassa	50
2.3.6 Métodos analíticos	50
2.3.6.1 Quantificação de glicose e xilose por cromatografia de troca iônica	50
2.3.6.2 Quantificação de açúcares redutores totais	50
2.3.6.3 Quantificação de compostos fenólicos totais	51
2.3.6.4 Análise cromatográfico de ácidos orgânicos de baixo peso molecular, furfural e Hidroximetilfurfural (HMF)	51
2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
2.4.1 Composição química da palha de cana-de-açúcar	51

2.4.2 Estudo do efeito do reator, teor de umidade, tempo de exposição e concentração de ozônio-----	52
2.4.3 Estudo das condições para o pré-tratamento de imersão -----	55
2.4.4 Estudo das condições para o pré-tratamento de ozonólise-----	58
2.4.5 Efeito da etapa de lavagem como método de detoxificação-----	59
2.4.5.1 Açúcares redutores e Compostos fenólicos totais-----	60
2.4.5.2 Ácidos orgânicos de baixo peso molecular, furfural e HMF -----	63
2.4.6 Estudo da composição química da biomassa após dos pré-tratamentos-----	64
2.4.7 Análises da composição química e digestibilidade enzimática da BLC para cada etapa dos pré-tratamentos -----	67
2.4.7.1 Caraterização química. Teores de carboidratos e de lignina na BLC -----	67
2.4.7.2 Hidrólise enzimática da biomassa-----	68
2.4.8 Estudo de mudanças estruturais da BLC por espectrofotometria vibracional (FTIR-ATR) -----	70
2.4.9 Metodologia a base de ciclos de ozônio-----	71
2.4.9.1 Relação entre a quantidade de biomassa tratada e ozônio inserido no reator -----	74
2.4.9.2 Variação na quantidade de ozônio inserido ao reator -----	75
2.4.9.3 Variação no tempo de reação na ozonólise-----	77
2.5. Conclusões -----	78
REFERÊNCIAS -----	79
3. <u>CAPÍTULO 2: PRÉ-TRATAMENTO EMPREGANDO SOLVENTES EUTÉTICOS (DES) E OZONÓLISE</u> -----	87
3.1 INTRODUÇÃO-----	88
3.2. REVISÃO DA LITERATURA -----	89
3.2.1 Caraterísticas gerais dos solventes eutéticos (DES) -----	89
3.2.2 Uso dos DES em deslignificação de biomassa lignocelulósica -----	94
3.2.2.1 Efeito do tipo de biomassa no pré-tratamento como DES-----	94
3.2.2.2 Efeito das caraterísticas dos DES no tratamento da BLC-----	98
3.2.2.3 Efeito das condições da reação DES-BLC-----	99

3.3. METODOLOGIA -----	100
3.3.1 Preparação da biomassa -----	100
3.3.2 Síntese dos DES -----	100
3.3.3 Pré-tratamento da biomassa -----	101
3.3.3.1 Pré-tratamento usando DES -----	101
3.3.3.2 Pré-tratamento com ozônio. -----	102
3.3.4 Caracterização química da biomassa -----	104
3.3.5 Hidrólise enzimática da biomassa -----	104
3.3.6 Caracterização por espectroscopia vibracional infravermelha com transformada de Fourier e com reflexão total atenuada (FTIR-ATR) dos DES -----	104
3.3.7 Caraterização termogravimétrica da biomassa e DES -----	105
3.3.8 Determinação da densidade e viscosidade dos DES -----	105
3.3.9 Métodos analíticos -----	105
3.3.9.1 Quantificação de glicose e xilose por cromatografia de troca iônica -----	105
3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	106
3.4.1 Caraterização dos DES sintetizados: Densidade e viscosidade -----	106
3.4.2 Caraterização dos DES sintetizados: Termogravimetria -----	107
3.4.3 Caraterização dos DES sintetizados: Espectroscopia vibracional -----	115
3.4.4 Uso dos DES no pré-tratamento de BLC -----	119
3.4.4.1 Efeito da temperatura no tratamento com DES -----	119
3.4.4.2 Efeito do tempo do tratamento com DES -----	121
3.4.4.3 Efeito da concentração dos DES no tratamento -----	123
3.4.5 Uso dos DES e ozonólise no pré-tratamento de BLC -----	126
3.5. CONCLUSÕES -----	132
REFERÊNCIAS -----	132

1. INTRODUÇÃO

Na atualidade, têm sido feitas extensas discussões em torno dos problemas ambientais, sociais e econômicos que estão associadas com a energia obtida de fontes fósseis. Algumas das conclusões dessas discussões estão relacionadas à necessidade de encontrar fontes energéticas alternativas, em especial, combustíveis que se encaixam com processos ecológicos e de fontes renováveis com balanço energético favorável e que garanta sua viabilidade econômica. O desenvolvimento dos biocombustíveis está sendo promovido por políticas governamentais que buscam garantir a segurança energética e gerar processos que atenuem seus efeitos nas mudanças climáticas (LONGATI et al., 2018).

Uma das fontes com maior potencial e que desperta grande interesse na produção de biocombustíveis é a biomassa lignocelulósica (BLC), porque está disponível em grandes quantidades e com baixos custos de obtenção. O bagaço e resíduos de pós-colheita da cana-de-açúcar são fontes importantes de material lignocelulósico, especialmente para países como Brasil, Índia e China que representam aproximadamente o 75% da produção mundial de cana-de-açúcar e por tanto têm elevada geração desta biomassa (MILANEZ et al., 2015).

De acordo com os dados calculados de geração de biomassa, estima-se que por cada tonelada de cana-de-açúcar processada, são gerados 140 kg de bagaço e 140 kg de resíduos de pós-colheita em base seca (CELENTE, 2017; PIPPO et al., 2011). A conversão dos resíduos da colheita da cana-de-açúcar poderia aumentar a produção de etanol em até 50 % com a mesma área plantada (JUNQUEIRA et al., 2017). Se o conteúdo médio de celulose na biomassa de cana-de-açúcar é 40%, é possível a obtenção de 40 L de etanol por tonelada de cana-de-açúcar, isto considerando um rendimento teórico de 1,11 g g⁻¹ de glicose a partir de celulose e de 0,51 g g⁻¹ de etanol a partir da glicose (GULATI et al., 1996). Assim, no Brasil, a produção média de cana-de-açúcar está calculada em 70 Ton Ha⁻¹, portanto, 7 x 10³ L de etanol Ha⁻¹ poderiam ser produzidos. Na safra do período 2020/2021 foi produzido aproximadamente 6,54 x 10⁸ Ton de cana-de-açúcar, o que significa que poderia ser obtido 2,62 x 10⁷ m³ de etanol celulósico (POL; AGR, 2020). Infelizmente, a tecnologia associada com a produção de bioetanol lignocelulósico, também chamado de segunda geração (2G), ainda não está desenvolvida em comparação com a tecnologia 1G, principalmente porque não é viável economicamente. Por isto, nos últimos anos, os estudos técnico-econômicos recomendam a integração com os processos 1G.

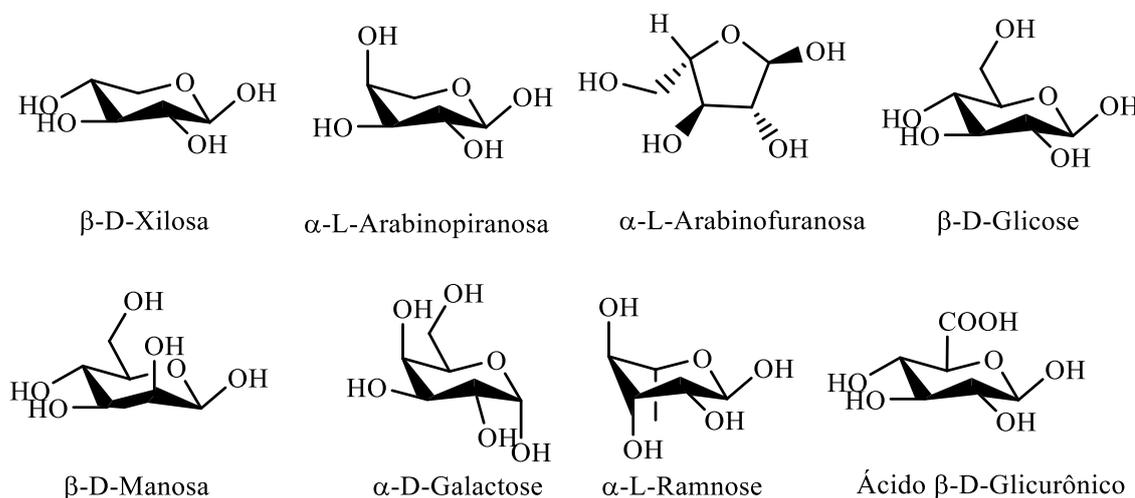
Por outro lado, durante a colheita da cana-de-açúcar, a porção do colmo é transportada até as usinas para seu processamento, no entanto, os restos das folhas de cana-de-açúcar são deixadas no campo para sua queima convertendo-se num problema ambiental (OLIVEIRA et al., 2020). Este material está constituído principalmente por folhas verdes, secas, ponteiros e bainha. Como biomassa lignocelulósica, a parede celular da palha de cana-de-açúcar está formada por celulose (35-45%), hemicelulose (27-32%), lignina (19-24%) e outros (extrativos, cinzas, proteínas, ácido acético, entre outros). As diferenças na composição bioquímica da palha de cana-de-açúcar poderiam ser devido a diversos fatores, tais como, variedade da cana, condições ambientais, posição geográfica, método de crescimento, uso de fertilizantes e composição do solo (JUTAKANOKI et al., 2017; KRISHNAN et al., 2010; MOODLEY; GUEGUIM KANA, 2017a; SANTOS et al., 2012).

A celulose é o componente majoritário, é um homopolissacarídeo lineal conformado por unidades de D-anidroglicopiranosose, unidas mediante ligações β -(1,4)-glicosídicas. O grau de polimerização das moléculas de celulose varia desde 5000 até 10000 unidades glicosídicas. As moléculas de glicose fazem ligações de hidrogênio inter- e intramoleculares, fazendo com que as cadeias poliméricas sejam organizadas em uma rede rígida de microfibrilas, que por sua vez, se juntam para formar fibrilas, que finalmente se unem para formar as fibras da celulose. Essas estruturas são organizadas de duas maneiras, a primeira é uma estrutura cristalina com maior grau de organização, maior resistência aos processos químicos e biológicos e tem pouca solubilidade em uma ampla faixa de solventes. Pelo contrário, a estrutura amorfa da celulose carece dessas características (RUN-CANG SUN, 2010).

Por outro lado, a hemicelulose é o segundo polímero mais abundante na biomassa de cana-de-açúcar, é um heteropolissacarídeo com uma estrutura ramificada complexa, que contém as pentoses D-xilose e L-arabinose e as hexoses D-glicose, D-manose, D-galactose, L-fructose, L-ramnose e ácido D-glicurônico, que pode estar acetilado ou metilado, sendo que a proporção de cada unidade varia de acordo com o tipo de biomassa (Figura 1). Normalmente, a hemicelulose contém uma cadeia principal formada por D-xilose e L-arabinose, sendo que as cadeias laterais curtas estão formadas por grupos arabinosilo, ácido glicurônico e acetila, além de vários oligossacarídeos que se ligam à cadeia principal nos dois grupos OH livres dos carbonos C-2 e C-3 da xilose. Ao contrário da celulose, a hemicelulose tem uma estrutura amorfa e variável pelas ramificações, apresenta menor grau de polimerização que varia entre 100 e 200 unidades de açúcares, e, portanto, é mais sensível às reações com espécies químicas,

microbiológicas e enzimáticas. A hemicelulose liga-se às microfibrilas de celulose mediante ligação de hidrogênio e à lignina por ligações covalentes (CHANDEL et al., 2017).

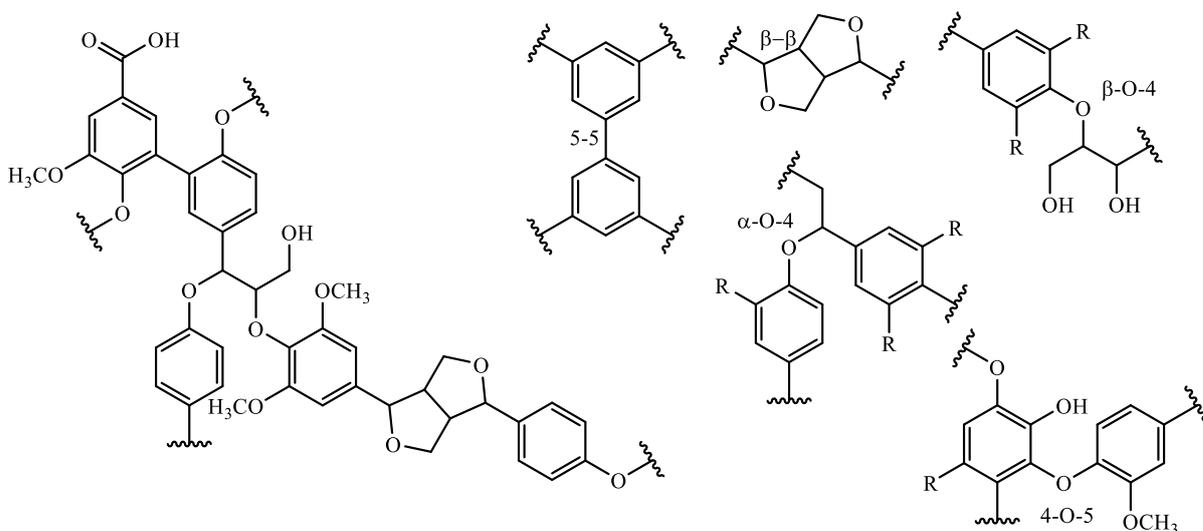
Figura 1. Estrutura química dos monossacarídeos presentes como unidades monoméricas na hemicelulose



Adaptado de (CHUNDAWAT et al., 2010)

O terceiro componente é a lignina, um heteropolímero fenólico complexo com uma ampla variedade em composição e tipos de ligações que dependem da biomassa. Sua estrutura não está definida de maneira precisa, pois está associada com a natureza de suas variadas unidades estruturais, que normalmente não estão repetidas em forma regular, além disso, também dependem de sua origem e método de extração o de isolamento. Na sua estrutura básica, tem unidades derivadas de fenilpropanol (álcoois coniferílico, sinapílico e *p*-cumarílico) chamados de monolignóis, com vários grupos metoxilos que se unem por ligações tipo éter α -*O*-4-arileter, β -*O*-4-arileter e α -hidroxi- β -*O*-4, além de ligações carbono-carbono, entre outras (Figura 2). Tem sido proposto que existem quatro tipos de ligações entre a lignina e os carboidratos: a) glicosídicas, b) tipo éster, c) tipo aril éter e d) tipo hemiacetal, sendo mais comum a ligação entre a lignina e a hemicelulose (ligações éster e éter) e com menor proporção as ligações de hidrogênio com a celulose. A lignina é o polímero responsável pela recalcitrância da parede celular e sua estrutura dá rigidez e resistência física, é altamente insolúvel em grande quantidade de solventes (RUN-CANG SUN, 2010; ZHAO et al., 2020).

Figura 2. Ligações características na estrutura da lignina.



Adaptado de (RUN-CANG SUN, 2010)

Devido ao seu alto conteúdo de carboidratos, produção em quantidades elevadas e baixo preço, o BLC é uma matéria-prima atraente para sua conversão em biocombustíveis. Geralmente, o processo inclui cinco etapas principais: preparação de matéria prima, pré-tratamento, hidrólise enzimática, fermentação e purificação do produto (separação e/ou destilação). Em alguns processos a hidrólise enzimática e a fermentação podem ser integradas, metodologia conhecida como sacarificação e fermentação simultânea (SSF, por suas siglas em inglês *simultaneous saccharification and fermentation*)(AYODELE; ALSAFFAR; MUSTAPA, 2020; CHUNDAWAT et al., 2010; COOPER et al., 2020; MUSSATTO, 2016).

Além da relativa baixa eficiência de hidrólise enzimática, o principal problema da bioconversão é o pré-tratamento, etapa necessária devido que os polissacarídeos presentes na biomassa nativa não estão disponíveis para sua conversão em etanol. As interações, ligações e complexidade da estrutura lignina-carboidratos geram um material altamente recalcitrante, propriedade que depende de fatores como o teor de lignina, hemicelulose, cristalinidade da celulose, complexos lignina-carboidratos, grau de polimerização, área superficial, entre outros, tornando necessária a implementação de um pré-tratamento que permita o aproveitamento da celulose e hemicelulose como fonte de açúcares fermentáveis (HALDAR; PURKAIT, 2021; MUSSATTO, 2016; PHAN et al., 2020; SUN et al., 2016). O principal objetivo de um pré-tratamento é quebrar a barreira protetora exercida pela hemicelulose e lignina sobre a celulose,

isto permite melhorar o acesso das enzimas até as fibrilas de celulose e, portanto, aumentar a eficiência na etapa de hidrólise.

O pré-tratamento é de grande interesse na atualidade devido ao seu alto custo no processo global de conversão de BLC em etanol. Embora os estudos sobre a otimização do processo de produção de bioetanol terem levado a uma redução significativa nos custos de pré-tratamento, fermentação, produção de enzimas e hidrólise enzimática, tem sido calculado que podem representar o 20% dos custos do processo global (YANG; WYMAN, 2008). Para que o tratamento seja efetivo e viável economicamente, deveria atender às seguintes requisitos (MUSSATTO, 2016):

- desconstrução da estrutura tridimensional da BLC, com efetiva deslignificação,
- redução do grau de polimerização e cristalinidade da celulose,
- aumento da área superficial e da porosidade da biomassa,
- geração de uma fração sólida suscetível à hidrólise enzimática, com altos rendimentos em açúcares fermentáveis e com baixa perda por degradação,
- geração de mínima quantidade de inibidores,
- requerimento de poucas etapas posteriores ao pré-tratamento (detoxificação),
- recuperação de hemicelulose e lignina,
- baixo consumo energético, mínima quantidade de reagentes e água e reatores de baixo custo.

Os pré-tratamentos podem ser classificados em físicos, químicos, físico-químicos e biológicos, sendo que comumente é necessário fazer combinações entre eles para aumentar a eficiência do processo. Os tratamentos físicos são caracterizados pela redução do tamanho da partícula, aumentando assim a área superficial, além de diminuir o grau de polimerização da celulose, sua aplicação individual resulta ser economicamente inviável com altos consumos de energia (BHATIA et al., 2020; KUMAR et al., 2019). Os tratamentos químicos focam na remoção da lignina e o inchamento da celulose cristalina. Entre os tratamentos mais estudados encontra-se: explosão por vapor, uso de água quente, fluídos supercríticos, hidrólise ácida e alcalina, oxidação, organosolv, líquidos iônicos, entre outros (MUSSATTO, 2016). Geralmente, os pré-tratamentos químicos levam a custos elevados devido as características do material usado nos reatores, além da maior produção de inibidores e geração de resíduos que

devem ser descartados apropriadamente (XU; LI; MU, 2016). Os tratamentos biológicos, implicam no uso diretamente de microrganismos (comumente fungos) ou enzimas, que são responsáveis principalmente pela quebra da estrutura da lignina com alta eficiência e seletividade, eles apresentam geralmente custos baixos em comparação com os químicos, mas precisam de tempo longos de residência, espaços maiores e cuidadosas condições de crescimento (YU et al., 2009).

Assim, com toda a variedade de tratamentos e combinações que têm sido pesquisadas, e as vantagens e desvantagens identificadas para sua implementação e viabilidade econômica, ainda não existe um procedimento único que seja suficientemente eficiente para todos os tipos de biomassa lignocelulósica, sendo assim, tem uma grande oportunidade de continuar as pesquisas nesta área (BHATIA et al., 2020; REZANIA et al., 2020).

No caso da hidrólise alcalina ou pré-tratamento alcalino, pode ser classificada em dois grupos, baseado no catalisador metálico (Na, K, Ca) e baseado em amônia. Tem sido amplamente usado nos processos Kraft e Soda para a polpa de madeira, como pré-tratamento de BLC tem demonstrado ser eficiente na remoção de hemicelulose e dos grupos acetil substituintes, assim como na solubilização de lignina e de ésteres urônicos (CARVALHO; QUEIROZ; COLODETTE, 2016; PENG et al., 2009). O uso de NaOH causa inchamento modificando a composição química e a estrutura da biomassa, como consequência, aumenta a área superficial interna, diminui o grau de polimerização e a cristalinidade da celulose. Durante o pré-tratamento alcalino, tem sido observadas reações iniciais de solvatação e saponificação o que leva ao estado de inchamento (VAN DER POL et al., 2015). Quando são usadas condições fortes de reação, chamado de pré-tratamento severo, com baixa concentração do álcali, mas com alta temperatura ou pressão, além de tempos longos, é observado dissolução, "descamação" de grupos terminais, hidrólise alcalina, degradação e decomposição de polissacarídeos dissolvidos (WEN et al., 2011). A eficiência do pré-tratamento depende da biomassa e tem sido observado que é mais eficiente para aquela com baixo teor de lignina, o que gera o rompimento das ligações aril éter que constitui aproximadamente um 60% das ligações totais da lignina, levando à liberação de fenolatos de sódio solúveis, e a quebra destas ligações aumenta a hidrofiliabilidade da lignina. Por sua parte, as ligações diaril éter e carbono-carbono são mais estáveis, permanecendo sem reagir por tempos maiores (GUPTA; LEE, 2010).

Nas últimas décadas, estão sendo estudadas condições moderadas de hidrólise alcalina, nas quais normalmente são usadas concentrações elevadas de base (6 até 20%), mas com reatores não pressurizados e com baixas temperaturas, sendo observado que ocorre dissolução de celulose, por isto, os estudos almejam diminuir a severidade do tratamento, mantendo a eficiência na remoção da lignina e com pouca perda de carboidratos (WU et al., 2011; YUAN et al., 2021).

Nos pré-tratamentos químicos oxidativos, tem sido estudado amplamente o uso de ozônio no branqueamento de polpa celulósica, entretanto, recentemente essa metodologia tem gerado interesse como pré-tratamento de BLC. O ozônio é muito reativo para compostos com grupos funcionais que tem alta densidade eletrônica, como são os compostos aromáticos substituídos por grupos doadores de elétrons (hidroxilas) que estão presentes no complexo de lignina, ele é considerado como um oxidante seletivo, com poucas perdas de carboidratos. Além disso, o pré-tratamento com ozônio é realizado a pressão e temperatura ambiente (ROBERTO et al., 2021; TRAVAINI; BARRADO; BOLADO-RODRÍGUEZ, 2016). Em geral, a ozonólise inclui baixa geração de compostos inibidores e pouca formação de ácidos carboxílicos fracos. Entretanto, a principal desvantagem é a alta quantidade de ozônio que pode ser requerido para um pré-tratamento eficiente, portanto, hoje são realizados estudos em novas tecnologias de geração de ozônio e para encontrar condições ótimas de custo-benefício (aproximadamente 70% dos custos energéticos na ozonólise, são causados pela geração do ozônio). Comumente, durante a ozonólise são estudados parâmetros como o tempo de exposição da biomassa, concentração e fluxo de ozônio, umidade do material, tamanho de partícula e tipo de reator (BEN'KO; CHUKHCHIN; LUNIN, 2020; BULE et al., 2013; OSUNA-LAVEAGA et al., 2020; SOUZA-CORREIA et al., 2013).

Adicionalmente, o ozônio apresenta alta reatividade para as duplas ligações conjugadas, por isto sua maior velocidade de reação com os grupos funcionais de lignina, causando a abertura dos anéis aromáticos, gerando ácidos carboxílicos alifáticos de baixo peso molecular (TRAVAINI et al., 2014). A reação com a lignina acontece facilmente ao início do tratamento, porém, sempre permanece uma fração de lignina que dificilmente reage, fenômeno que tem sido explicado pela localização desta em posições que não ficam expostas ao ozônio e pela formação de novas ligações carbono-carbono que são mais resistentes (BHATTARAI et al., 2015; MAMLEEVA et al., 2009). Com a degradação da lignina, tem sido observado a reação com os polissacarídeos da biomassa, embora em menor grau, especialmente com a

hemicelulose, levando para a formação de grupos carbonila e carboxila como consequência da introdução do ozônio na ligação do oxigênio acetal e o carbono anomérico do açúcar (TRAVAINI et al., 2014). Em alguns estudos tem sido relatado o incremento do volume total dos poros, bem como a área superficial, o que permite aumentar o acesso da enzima até as fibras da celulose (BARROS et al., 2013).

A ozonólise é um pré-tratamento que pode ser facilmente acoplado com outras metodologias para aumentar a eficiência na liberação de açúcares fermentáveis. Tem sido reportado seu uso com métodos físicos como moenda com disco úmido, com bolas, com ultrassom (BARROS et al., 2013; MORETTI et al., 2014; SHI; XIANG; LI, 2015), com tratamentos ácidos e básicos (BAIG et al., 2015; FERNÁNDEZ-DELGADO et al., 2019; GITIFAR; ESLAMLOUEYAN; SARSHAR, 2013), e com tratamentos biológicos (MULAKHUDAIR; HANOTU; ZIMMERMAN, 2017).

Nos anos recentes, outro aspecto que demarcou a via de desenvolvimento dos pré-tratamentos é que podem ser feitos utilizando condições de reação, solventes e reagentes verdes, que não precisam de processos complexos de descarte (CLARK, 2007; KUMAR et al., 2019; TANG et al., 2017). Sob esse conceito surgem metodologias baseadas nos princípios da química verde e a biorrefinaria, o uso dos líquidos iônicos e seus homólogos: os DES (“*Deep eutectic solvent*”, solventes de baixo ponto eutético) os quais são compostos promissores nesta nova tendência de solventes verdes. Os líquidos iônicos tem sido usados por suas propriedades (baixa pressão de vapor, não inflamabilidade, condutividade iônica, atividade catalítica, estabilidade térmica e química) como dissolventes de polissacarídeos, porém, o caráter “verde” têm sido questionado, devido à sua toxicidade no ambiente e pouca biodegradabilidade, além dos custos de produção, e da aplicação industrial limitada (ZDANOWICZ; WILPISZEWSKA; SPYCHAJ, 2018).

O desenvolvimento de novos solventes que poderiam resolver essas limitações foi o início dos estudos dos DES como solventes verdes no processamento de biomassa, seu estudo tem incluído separações, deslignificação, biocatálise, biorrefinaria, extração e fracionamento (CHEN; WAN, 2018; DEL MONTE et al., 2014; SHISHOV et al., 2017; SMITH; ABBOTT; RYDER, 2014; ZDANOWICZ; WILPISZEWSKA; SPYCHAJ, 2018). Os DES são sistemas baseados na mistura de dois tipos de compostos: um doador de hidrogênio (HBD, *Hydrogen bond donor*) e outro acceptor de hidrogênio (HBA, *Hydrogen bond acceptor*) (ABBOTT et al.,

2003). Os DES são econômicos, de fácil obtenção, não requerem processos de purificação, neutros em água, com baixa ou nenhuma toxicidade e com frequência biodegradáveis, transformando-os em solventes atraentes do ponto de vista da química verde (KUMAR et al., 2018). Uma das propriedades mais importantes dos DES é a depleção da temperatura de fusão, atribuída a uma baixa energia de rede, que provavelmente resulta no deslocamento ou auto associação de cargas que ocorrem através das interações geradas. A fase líquida em temperatura baixa é causada pela formação de ligações de hidrogênio (interação mais importante), interações de Van der Waals e forças eletrostáticas (dependendo dos reagentes de partida), todas estas interações interferem na capacidade dos reagentes para cristalizar (MBOUS et al., 2017). Adicionalmente, tem sido observado que algumas combinações de HBA e HBD mostram uma baixa temperatura de transição (sólido líquido) em vez de um ponto de fusão, nestes casos os DES são conhecidos como misturas de baixa temperatura de transição (LTTM) (TANG et al., 2017). A determinação das propriedades físico-químicas dos DES é muito importante devido a que estas variam dependendo da natureza e relação molar dos componentes iniciais. Algumas das propriedades macroscópicas mais importantes para avaliar o possível uso dos DES como pré-tratamento são: temperatura de fusão, estabilidade térmica, viscosidade, densidade, polaridade, condutividade e pressão de vapor (ZDANOWICZ; WILPISZEWSKA; SPYCHAJ, 2018).

Embora existam estudos da solubilização dos polissacarídeos da biomassa em diferentes tipos de DES, estudos recentes focam na procura de um processo eficiente e não destrutivo para o fracionamento de BLC, com a solubilização da lignina e liberação dos carboidratos (VAN OSCH et al., 2017). Um dos sistemas mais estudados são os DES baseados em um sal quaternário de amônio, tal como o cloreto de colina (CC) empregado como HBA, enquanto, sais metálicos, compostos neutros, ácidos carboxílicos e poliálcoois podem ser usados como HBD. Do mesmo jeito como acontece com outros tipos de pré-tratamentos, no caso dos DES, diferentes pesquisadores têm relatado a complexa relação nos métodos de fracionamento baseados em DES e o tipo de biomassa tratada (CHEN; WAN, 2018; FRANCISCO; VAN DEN BRUINHORST; KROON, 2012). Pelo anterior, existe uma ampla área de pesquisa para os diferentes tipos de misturas HBA-HBD, proporções molares, condições de pré-tratamento e tipo de biomassa.

No presente estudo foi avaliada a eficiência na liberação de açúcares fermentáveis usando como fonte de BLC palha de cana-de-açúcar pré-tratada por duas metodologias:

- Pré-tratamento alcalino em condições brandas (imersão da biomassa) acoplado a ozonólise
- Uso de DES acoplado a ozonólise

Para o primeiro pré-tratamento foram avaliados parâmetros associados com a imersão da biomassa na solução de tratamento: tipo e concentração da solução de imersão (ácida, básica e neutra), tempo e temperatura do tratamento, tipos de soluções para lavagem da biomassa tratada. No caso da ozonólise, foram estudados tempo de exposição, tipo de reator (coluna e rotatório), metodologia de exposição da biomassa ao ozônio.

Para o segundo pré-tratamento foram escolhidos dois tipos de DES, baseados em cloreto de colina e glicerina como HBA e compostos ácidos, neutros e poliálcoois como HBD. Os DES foram sintetizados usando o método de aquecimento e determinada sua viscosidade, densidade, decomposição térmica e espectroscopia infravermelha. Foi investigado o tempo e a temperatura do tratamento, concentração do DES e carga de sólidos. Finalmente, foi estudado o efeito do ozônio nas amostras pré-tratadas com DES na liberação de açúcares fermentescíveis por hidrólise enzimática.

Dos dois pré-tratamentos foram escolhidas as melhores condições, aquelas em que foi obtida a maior quantidade de açúcares fermentáveis (glicose e xilose). Para estas amostras, foi realizada a determinação dos conteúdos de celulose, hemicelulose e lignina, para assim determinar os rendimentos na liberação dos açúcares, remoção de lignina e perda de açúcares.

Neste estudo, o ozônio foi aplicado em ciclos, no quais inicialmente o reator foi saturado com ozônio, seguindo uma etapa de reação com a biomassa no reator fechado, este procedimento foi repetido a cada ciclo. Com esta metodologia, foi possível reduzir a quantidade do agente oxidante necessária.

Organização Da Tese:

A tese está organizada em 3 seções, a partir da seguinte estrutura:

Introdução: é uma breve descrição dos tópicos que serão abordados no documento e os objetivos do estudo.

- **Capítulo 1:** apresenta a revisão de literatura, metodologia, discussão de resultados e conclusões, para o tratamento de imersão, seguido da ozonólise. O foco deste capítulo concentra-se no estudo das condições ótimas para a imersão, as quais foram o efeito do meio, tempo, concentração e temperatura do tratamento. Como resultado das análises foi encontrado que o melhor meio de imersão foi o alcalino em condições brandas. As condições ótimas estudadas para a ozonólise foram, tempo de reação, teor de umidade, concentração do ozônio e condições de lavagem. Adicionalmente, foram estudadas as perdas de açúcares e a formação de possíveis compostos inibidores. Finalmente, foi estudada a metodologia de ciclos de ozônio, para qual foi otimizada a quantidade de BLC tratada, a quantidade de ozônio inserido no reator, tempo de exposição e tempo de reação.
- **Capítulo 2:** apresenta a revisão de literatura, metodologia, discussão de resultados e conclusões, para o tratamento da BLC com solventes eutéticos, seguido da ozonólise. Neste capítulo, foram caracterizadas 19 misturas de DES a base de cloreto de colina e glicerina como HBA e compostos ácidos, neutros e poliálcoois como HBD. Para cada solvente foi determinada sua viscosidade, densidade, temperatura de degradação, espectro vibracional e curva termogravimétrica. A análise destes parâmetros permitiu determinar se tinha sido formado o solvente eutético. O principal objetivo deste capítulo foi encontrar as misturas com os melhores resultados na obtenção de açúcares fermentáveis, além de estudar a remoção de lignina e a perda de açúcares.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, A. P.; CAPPER, G.; DAVIES, D. L.; RASHEED, R. K.; TAMBYRAJAH, V. Novel Solvent Properties of Choline Chloride /Urea Mixtures_Supplementaryinfo. Chemical Communication, [s. l.], v. 0, n. 1, p. 70–71, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1039/B210714G>>

AYODELE, B. V.; ALSAFFAR, M. A.; MUSTAPA, S. I. An overview of integration opportunities for sustainable bioethanol production from first- and second-generation sugar-based feedstocks. Journal of Cleaner Production, [s. l.], v. 245, p. 118857, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.118857>>

BAIG, K. S.; WU, J.; TURCOTTE, G.; DOAN, H. D. Novel ozonation technique to delignify wheat straw for biofuel production. Energy and Environment, [s. l.], v. 26, n. 3, p. 303–318, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1260/0958-305X.26.3.303>>

BARROS, R. da R. O. De; PAREDES, R. de S.; ENDO, T.; DA SILVA BON, E. P.; LEE, S. H. Association of wet disk milling and ozonolysis as pretreatment for enzymatic

saccharification of sugarcane bagasse and straw. *Bioresource Technology*, [s. l.], v. 136, p. 288–294, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.009>>

BEN'KO, E. M.; CHUKHCHIN, D. G.; LUNIN, V. V. Changes in wheat straw cell walls during ozone pretreatment. *Holzforschung*, [s. l.], v. 74, n. 12, p. 1157–1167, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1515/hf-2019-0168>>

BHATIA, S. K.; JAGTAP, S. S.; BEDEKAR, A. A.; BHATIA, R. K.; PATEL, A. K.; PANT, D.; RAJESH BANU, J.; RAO, C. V.; KIM, Y. G.; YANG, Y. H. Recent developments in pretreatment technologies on lignocellulosic biomass: Effect of key parameters, technological improvements, and challenges. *Bioresource Technology*, [s. l.], v. 300, n. January, p. 122724, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122724>>

BHATTARAI, S.; BOTTENUS, D.; IVORY, C. F.; GAO, A. H.; BULE, M.; GARCIA-PEREZ, M.; CHEN, S. Simulation of the ozone pretreatment of wheat straw. *Bioresource Technology*, [s. l.], v. 196, p. 78–87, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.022>>

BULE, M. V.; GAO, A. H.; HISCOX, B.; CHEN, S. Structural modification of lignin and characterization of pretreated wheat straw by ozonation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, [s. l.], v. 61, n. 16, p. 3916–3925, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/jf4001988>>

CARVALHO, D. M. De; QUEIROZ, J. H. De; COLODETTE, J. L. Assessment of alkaline pretreatment for the production of bioethanol from eucalyptus, sugarcane bagasse and sugarcane straw. *Industrial Crops and Products*, [s. l.], v. 94, p. 932–941, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.09.069>>

CELENTE, V. Eletricidade gerada a partir da palha de cana-de-açúcar pode suprir 27% do consumo residencial no Brasil. 2017. Disponível em: <<https://www.udop.com.br/index.php?item=noticias&cod=1155733>>. Acesso em: 18 maio. 2018.

CHANDEL, A. K.; ANTUNES, F. A. F.; TERÁN-HILARES, R.; COTA, J.; ELLILÄ, S.; SILVEIRA, M. H. L.; DOS SANTOS, J. C.; DA SILVA, S. S. Bioconversion of Hemicellulose Into Ethanol and Value-Added Products: Commercialization, Trends, and Future Opportunities. In: CHANDEL, A. K.; LUCIANO SILVEIRA, M. H. (Eds.). *Advances in Sugarcane Biorefinery: Technologies, Commercialization, Policy Issues and Paradigm Shift for Bioethanol and By-Products*. [s.l.] : Elsevier, 2017. p. 97–134.

CHEN, Z.; WAN, C. Ultrafast fractionation of lignocellulosic biomass by microwave-assisted deep eutectic solvent pretreatment. *Bioresource Technology*, [s. l.], v. 250, p. 532–537, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.11.066>>

CHUNDAWAT, S. P. S.; BALAN, V.; DA COSTA SOUSA, L.; DALE, B. E. Bioalcohol production: Biochemical conversion of lignocellulosic biomass. In: WALDRON, K. (Ed.). *Bioalcohol Production: Biochemical Conversion of Lignocellulosic Biomass*. Oxford: Woodhead Publishing Limited, 2010. p. 24–28.

CLARK, J. H. Perspective Green chemistry for the second generation biorefinery - sustainable chemical manufacturing based on biomass. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, [s. l.], v. 82, n. February, p. 603–609, 2007. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1002/jctb.1710>>

COOPER, J.; KAVANAGH, J.; RAZMJOU, A.; CHEN, V.; LESLIE, G. Treatment and resource recovery options for first and second generation bioethanol spentwash – A review. *Chemosphere*, [s. l.], v. 241, p. 124975, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124975>>

DEL MONTE, F.; CARRIAZO, D.; SERRANO, M. C.; GUTIÉRREZ, M. C.; FERRER, M. L. Deep eutectic solvents in polymerizations: A greener alternative to conventional syntheses. *ChemSusChem*, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 999–1009, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/cssc.201300864>>

FERNÁNDEZ-DELGADO, M.; PLAZA, P. E.; COCA, M.; GARCÍA-CUBERO, M. T.; GONZÁLEZ-BENITO, G.; LUCAS, S. Comparison of mild alkaline and oxidative pretreatment methods for biobutanol production from brewer's spent grains. *Industrial Crops and Products*, [s. l.], v. 130, p. 409–419, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.12.087>>

FRANCISCO, M.; VAN DEN BRUINHORST, A.; KROON, M. C. New natural and renewable low transition temperature mixtures (LTTMs): Screening as solvents for lignocellulosic biomass processing. *Green Chemistry*, [s. l.], v. 14, n. 8, p. 2153–2157, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1039/C2GC35660K>>

GITIFAR, V.; ESLAMLOUEYAN, R.; SARSHAR, M. Experimental study and neural network modeling of sugarcane bagasse pretreatment with H₂SO₄ and O₃ for cellulosic material conversion to sugar. *Bioresource Technology*, [s. l.], v. 148, p. 47–52, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.060>>

GULATI, M.; KOHLMANN, K.; LADISCH, M. R.; HESPELL, R.; BOTHAST, R. J. Assessment of ethanol production options for corn products. *Bioresource Technology*, [s. l.], v. 58, n. 3, p. 253–264, 1996. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(96\)00108-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(96)00108-3)>

GUPTA, R.; LEE, Y. Y. Pretreatment of corn stover and hybrid poplar by sodium hydroxide and hydrogen peroxide. *Biotechnology Progress*, [s. l.], v. 26, n. 4, p. 1180–1186, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/btpr.405>>

HALDAR, D.; PURKAIT, M. K. A review on the environment-friendly emerging techniques for pretreatment of lignocellulosic biomass: Mechanistic insight and advancements. *Chemosphere*, [s. l.], v. 264, p. 128523, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128523>>

JUNQUEIRA, T. L.; CHAGAS, M. F.; GOUVEIA, V. L. R.; REZENDE, M. C. A. F.; WATANABE, M. D. B.; JESUS, C. D. F.; CAVALETT, O.; MILANEZ, A. Y.; BONOMI, A. Techno-economic analysis and climate change impacts of sugarcane biorefineries considering different time horizons. *Biotechnology for Biofuels*, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–12, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13068-017-0722-3>>

JUTAKANOKI, R.; TOLIENG, V.; TANASUPAWAT, S.; AKARACHARANYA, A. Ethanol Production from Sugarcane Leaves by *Kluyveromyces marxianus* S1.17, a Genome-Shuffling Mediated Transformant. *BioResources*, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 1636–1646, 2017.

KRISHNAN, C.; DA COSTA SOUSA, L.; JIN, M.; CHANG, L.; DALE, B. E.; BALAN, V. Alkali-based AFEX pretreatment for the conversion of sugarcane bagasse and cane leaf residues to ethanol. *Biotechnology and Bioengineering*, [s. l.], v. 107, n. 3, p. 441–450, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/bit.22824>>

KUMAR, A. K.; SHAH, E.; PATEL, A.; SHARMA, S.; DIXIT, G. Physico-chemical characterization and evaluation of neat and aqueous mixtures of choline chloride + lactic acid for lignocellulosic biomass fractionation, enzymatic hydrolysis and fermentation. *Journal of Molecular Liquids*, [s. l.], v. 271, p. 540–549, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.09.032>>

KUMAR, G.; DHARMARAJA, J.; ARVINDNARAYAN, S.; SHOBAN, S.; BAKONYI, P.; SARATALE, G. D.; NEMESTÓTHY, N.; BÉLAFI-BAKÓ, K.; YOON, J. J.; KIM, S. H. A comprehensive review on thermochemical, biological, biochemical and hybrid conversion methods of bio-derived lignocellulosic molecules into renewable fuels. *Fuel*, [s. l.], v. 251, n. December 2018, p. 352–367, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.04.049>>

LONGATI, A. A.; LINO, A. R. A.; GIORDANO, R. C.; FELIPE, F.; CRUZ, A. J. G. Defining Research & Development process targets through retro-techno-economic analysis: the sugarcane biorefinery case. *Bioresource Technology*, [s. l.], 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.102>>

MAMLEEVA, N. A.; AUTLOV, S. A.; BAZARNOVA, N. G.; LUNIN, V. V. Delignification of softwood by ozonation. *Pure and Applied Chemistry*, [s. l.], v. 81, n. 11, p. 2081–2091, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1351/PAC-CON-08-10-11>>

MBOUS, Y. P.; HAYYAN, M.; HAYYAN, A.; WONG, W. F.; HASHIM, M. A.; LOOI, C. Y. Applications of deep eutectic solvents in biotechnology and bioengineering—Promises and challenges. *Biotechnology Advances*, [s. l.], v. 35, n. 2, p. 105–134, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.11.006>>

MILANEZ, A. Y.; BONOMI, A.; DAYAN, C.; JESUS, F. De. De promessa a realidade : como o etanol celulósico pode revolucionar a indústria da cana-de-açúcar - uma avaliação do potencial competitivo e sugestões de política pública. *Biocombustíveis BNDES setorial*, [s. l.], v. 41, n. Mdic, p. 237–294, 2015.

MOODLEY, P.; GUEGUIM KANA, E. B. Comparison of a two-stage and a combined single stage salt-acid based lignocellulosic pretreatment for enhancing enzymatic saccharification. *Industrial Crops and Products*, [s. l.], v. 108, n. June, p. 219–224, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.06.048>>

MORETTI, M. M. de S.; BOCCHINI-MARTINS, D. A.; NUNES, C. da C. C.; VILLENA, M. A.; PERRONE, O. M.; SILVA, R. Da; BOSCOLO, M.; GOMES, E. Pretreatment of sugarcane bagasse with microwaves irradiation and its effects on the structure and on enzymatic hydrolysis. *Applied Energy*, [s. l.], v. 122, p. 189–195, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2014.02.020>>

MULAKHUDAIR, A. R.; HANOTU, J.; ZIMMERMAN, W. Exploiting ozonolysis-microbe synergy for biomass processing: Application in lignocellulosic biomass pretreatment. *Biomass and Bioenergy*, [s. l.], v. 105, p. 147–154, 2017. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2017.06.018>>

MUSSATTO, S. I. Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery. [s.l.] : Elsevier, 2016.

OLIVEIRA, M. H. R.; SOUSA, A. E. C.; OLIVEIRA, R. S.; AGUAS, M. A.; SILVA ÁVILA, E. A.; SILVA, W. R.; PEREIRA, D. R. M.; COUTO, C. A. Gestão dos resíduos pós colheita da cana-de-açúcar no cerrado: uso da palhada versus contribuição econômica. *Brazilian Journal of Development*, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 3406–3421, 2020. Disponível em: <<http://doi.org/10.34117/bjdv6n1-246>>

OSUNA-LAVEAGA, D. R.; GARCÍA-DEPRAECT, O.; VALLEJO-RODRÍGUEZ, R.; LÓPEZ-LÓPEZ, A.; LEÓN-BECERRIL, E. Integrated ozonation-enzymatic hydrolysis pretreatment of sugarcane bagasse: Enhancement of sugars released to expended ozone ratio. *Processes*, [s. l.], v. 8, n. 10, p. 1–18, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/pr8101274>>

PENG, F.; REN, J. L.; XU, F.; BIAN, J.; PENG, P.; SUN, R. C. Comparative study of hemicelluloses obtained by graded ethanol precipitation from sugarcane bagasse. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, [s. l.], v. 57, n. 14, p. 6305–6317, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/jf900986b>>

PHAN, P. T.; NGUYEN, B. S.; NGUYEN, T. A.; KUMAR, A.; NGUYEN, V. H. Lignocellulose-derived monosugars: a review of biomass pre-treating techniques and post-methods to produce sustainable biohydrogen. *Biomass Conversion and Biorefinery*, [s. l.], 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13399-020-01161-7>>

PIPPO, W. A.; LUENGO, C. A.; ALBERTERIS, L. A. M.; GARZONE, P.; CORNACCHIA, G. Energy recovery from sugarcane-trash in the light of 2nd generation biofuels. Part 1: Current situation and environmental aspects. *Waste and Biomass Valorization*, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 1–16, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12649-010-9048-0>>

POL, S. D. E.; AGR, T. Produção Brasileira de Cana-de-açúcar , Açúcar e Etanol Sugarcane Industry , Sugar and Ethanol Production in Brazil Moagem de Cana-de-açúcar no Brasil (em toneladas) Sugarcane Milling in Brazil (tonnes) Evolução Brasileira da Produção de Açúcar (em t. [s. l.], p. 7–8, 2020.

REZANIA, S.; ORYANI, B.; CHO, J.; TALAIEKHOZANI, A.; SABBAGH, F.; HASHEMI, B.; RUPANI, P. F.; MOHAMMADI, A. A. Different pretreatment technologies of lignocellulosic biomass for bioethanol production: An overview. *Energy*, [s. l.], v. 199, p. 117457, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.energy.2020.117457>>

ROBERTO, D.; LIMA, S.; GOMES, A.; PARANHOS, D. O.; FERNANDO, O.; ADARME, H.; SILVA, S. D. Q.; AQUINO, S. F. De. Integrated production of second-generation ethanol and biogas from sugarcane bagasse pretreated with ozone. *Biomass Conversion and Biorefinery*, [s. l.], 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13399-020-01234-7>>

RUN-CANG SUN. *Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels*. 1. ed. Amsterdam: Elsevier, 2010.

SANTOS, F. a; QUEIRÓZ, J. H. De; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. a; GUIMARÃES, V. M. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. *Quimica*

nova, [s. l.], v. 35, n. 5, p. 1004–1010, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000500025>>

SHI, F.; XIANG, H.; LI, Y. Combined pretreatment using ozonolysis and ball milling to improve enzymatic saccharification of corn straw. *Bioresource Technology*, [s. l.], v. 179, p. 444–451, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.063>>

SHISHOV, A.; BULATOV, A.; LOCATELLI, M.; CARRADORI, S.; ANDRUCH, V. Application of deep eutectic solvents in analytical chemistry. A review. *Microchemical Journal*, [s. l.], v. 135, p. 33–38, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.07.015>>

SMITH, E. L.; ABBOTT, A. P.; RYDER, K. S. Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications. *Chemical Reviews*, [s. l.], v. 114, n. 21, p. 11060–11082, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/cr300162p>>

SOUZA-CORREIA, J. A.; RIDENTI, M. A.; OLIVEIRA, C.; ARAÚJO, S. R.; AMORIM, J. Decomposition of lignin from sugar cane bagasse during ozonation process monitored by optical and mass spectrometries. *Journal of Physical Chemistry B*, [s. l.], v. 117, n. 11, p. 3110–3119, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/jp3121879>>

SUN, S.; SUN, S.; CAO, X.; SUN, R. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. *Bioresource Technology*, [s. l.], v. 199, p. 49–58, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.061>>

TANG, X.; ZUO, M.; LI, Z.; LIU, H.; XIONG, C.; ZENG, X.; SUN, Y.; HU, L.; LIU, S.; LEI, T.; LIN, L. Green Processing of Lignocellulosic Biomass and Its Derivatives in Deep Eutectic Solvents. *ChemSusChem*, [s. l.], v. 10, n. 13, p. 2696–2706, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/cssc.201700457>>

TRAVAINI, R.; BARRADO, E.; BOLADO-RODRÍGUEZ, S. Effect of ozonolysis pretreatment parameters on the sugar release, ozone consumption and ethanol production from sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, [s. l.], v. 214, p. 150–158, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.102>>

TRAVAINI, R.; MARANGON-JARDIM, C.; COLODETTE, J. L.; MORALES-OTERO, M.; BOLADO-RODRÍGUEZ, S. Ozonolysis. In: *Pretreatment of Biomass: Processes and Technologies*. [s.l.: s.n.]. p. 105–135.

VAN DER POL, E.; BAKKER, R.; VAN ZEELAND, A.; SANCHEZ GARCIA, D.; PUNT, A.; EGGINK, G. Analysis of by-product formation and sugar monomerization in sugarcane bagasse pretreated at pilot plant scale: Differences between autohydrolysis, alkaline and acid pretreatment. *Bioresource Technology*, [s. l.], v. 181, p. 114–123, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.033>>

VAN OSCH, D. J. G. P.; KOLLAU, L. J. B. M.; VAN DEN BRUINHORST, A.; ASIKAINEN, S.; ROCHA, M. A. A.; KROON, M. C. Ionic liquids and deep eutectic solvents for lignocellulosic biomass fractionation. *Physical Chemistry Chemical Physics*, [s. l.], v. 19, n. 4, p. 2636–2665, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1039/C6CP07499E>>

WEN, J. L.; XIAO, L. P.; SUN, Y. C.; SUN, S. N.; XU, F.; SUN, R. C.; ZHANG, X. L. Comparative study of alkali-soluble hemicelluloses isolated from bamboo (*Bambusa rigida*).

Carbohydrate Research, [s. l.], v. 346, n. 1, p. 111–120, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.carres.2010.10.006>>

WU, L.; LI, Y.; ARAKANE, M.; IKE, M.; WADA, M.; TERAJIMA, Y.; ISHIKAWA, S.; TOKUYASU, K. Efficient conversion of sugarcane stalks into ethanol employing low temperature alkali pretreatment method. *Bioresource Technology*, [s. l.], v. 102, n. 24, p. 11183–11188, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.081>>

XU, H.; LI, B.; MU, X. Review of Alkali-Based Pretreatment to Enhance Enzymatic Saccharification for Lignocellulosic Biomass Conversion. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, [s. l.], v. 55, n. 32, p. 8691–8705, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acs.iecr.6b01907>>

YANG, B.; WYMAN, C. E. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 26–40, 2008.

YU, J.; ZHANG, J.; HE, J.; LIU, Z.; YU, Z. Combinations of mild physical or chemical pretreatment with biological pretreatment for enzymatic hydrolysis of rice hull. *Bioresource Technology*, [s. l.], v. 100, n. 2, p. 903–908, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2008.07.025>>

YUAN, Z.; KLINGER, G. E.; NIKAFSHAR, S.; CUI, Y.; FANG, Z.; ALHERECH, M.; GOES, S.; ANSON, C.; SINGH, S. K.; BALS, B.; HODGE, D. B.; NEJAD, M.; STAHL, S. S.; HEGG, E. L. Effective Biomass Fractionation through Oxygen-Enhanced Alkaline-Oxidative Pretreatment. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 1118–1127, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c06170>>

ZDANOWICZ, M.; WILPISZEWSKA, K.; SPYCHAJ, T. Deep eutectic solvents for polysaccharides processing. A review. *Carbohydrate Polymers*, [s. l.], v. 200, n. July, p. 361–380, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.07.078>>

ZHAO, C.; QIAO, X.; SHAO, Q.; HASSAN, M.; MA, Z. Evolution of the Lignin Chemical Structure during the Bioethanol Production Process and Its Inhibition to Enzymatic Hydrolysis. *Energy and Fuels*, [s. l.], v. 34, n. 5, p. 5938–5947, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.0c00293>>

2. CAPÍTULO 1: PRÉ-TRATAMENTO DE IMERSÃO E OZONÓLISE.

2.1 INTRODUÇÃO

Na atualidade a produção de cana-de-açúcar gera grandes quantidades de resíduos pós-colheita, sendo o bagaço e a palha os mais importantes. Os estudos têm sido focados na cogeração de energia, produção de álcool de segunda geração, suplemento nutricional para o solo, venda de créditos de carbono e plataforma química em biorrefinaria, entre outros (LARA-FLORES et al., 2018). Entretanto, sendo que a cogeração de energia é o uso mais vantajoso em retorno econômico, ainda não é possível encontrar processos que sejam eficientes e viáveis economicamente, porém, as pesquisas sobre como melhorar o aproveitamento das áreas destinadas a produção sucroalcooleira, ainda continuam.

A palha de cana-de-açúcar é um tipo de BLC abundante, considerada fonte renovável na produção de combustíveis líquidos, entretanto, sua estrutura rígida e complexa impede sua fácil conversão em outros produtos, sendo necessário o uso de uma etapa de tratamento para deslignificar a biomassa e aumentar a acessibilidade à celulose, e dessa forma, permitir a atuação de enzimas específicas na etapa da hidrólise enzimática, para aumentar a efetividade no rendimento de açúcares fermentáveis obtidos.

Existe uma grande variedade de tratamentos estudados, muitos precisam de altas temperaturas e pressões, levando altos custos do processo global de obtenção de açúcares fermentáveis. Todos os tratamentos têm vantagens e desvantagens que afetam sua implementação e viabilidade econômica. O uso de álcalis em condições brandas leva a mudanças na estrutura da BLC, uma vez que quebra as ligações entre carboidratos e lignina, gera a saponificação das ligações éster entre a celulose, hemicelulose e a lignina, levando ao inchamento da biomassa e em consequência deslignificação (ZHAO; ZHANG, 2020). O ozônio é um agente oxidante forte, altamente seletivo na deslignificação da biomassa, que por sua alta velocidade de reação com a lignina, apresenta valores baixos de degradação dos carboidratos, tem pouca geração de compostos inibidores, e usualmente é usado a pressão atmosférica e temperatura ambiente (LU, 2021; TRAVAINI et al., 2014).

Apesar das vantagens dos métodos com álcali e ozonólise, eles apresentam desvantagens como a geração de inibidores em o meio alcalino e no caso do tratamento com ozônio, tem baixa velocidade de transferência da interfase gás/líquido, alta relação de consumo de ozônio/biomassa tratada e alto custo de geração do gás, dificultando o uso de cada método

por separado (WANG et al., 2018). Trabalhos anteriores estudaram a combinação da ozonólise com outros tratamentos para melhorar o conteúdo de açúcares fermentáveis. Wang et al (2018), estudaram as mudanças estruturais na palha de milho combinando o tratamentos alcalino com ozônio. O tempo e temperatura do tratamento com álcali foram estudadas, além do pH da solução de reação e tempo da ozonólise, os resultados mostraram mudanças importantes na estrutura da biomassa, que permitiram melhorar a eficiência da hidrólise enzimática. Também tem sido estudado o reuso do licor obtido por tratamento com NaOH e ozônio (LU, 2021; ZHAO; ZHANG, 2020), mostrando que é possível reutilizar entre quatro e seis vezes essas soluções, embora possível perda da capacidade de deslignificação. Sonkar et al (2021), estudaram o tratamento de farelo de trigo para obtenção de xilooligosacarídeos primeiramente com ozônio seguido por autohidrólise. Os autores obtiveram baixa geração de inibidores observando um processo sinérgico. Lima et al (2021), reportaram que a ozonólise de bagaço de cana-de-açúcar combinada com extração alcalina, resulta em menor quantidade de ozônio requerido, concluindo que essa combinação proporcionou os melhores cenários energéticos e econômicos visando a integração da produção de etanol 2G e biogás.

No presente estudo, a eficácia dos açúcares fermentáveis liberados da BLC, usando a combinação do tratamento de imersão inicial em condições brandas com o processo de ozonólise, foi avaliada. O tratamento de imersão foi realizado em meio neutro, ácido e básico, em diferentes concentrações, tempos e temperaturas; já para a ozonólise, foram testados o tempo de exposição, a concentração de ozônio e a umidade da biomassa. Adicionalmente, é proposto um método de ozonólise em reator rotativo, que permite maior interação entre o gás e o BLC. Posteriormente, foi estudado o efeito de disponibilizar o ozônio em ciclos, tendo como objetivo determinar as melhores condições de ozonólise quanto à concentração de ozônio, as quantidades de BLC e o tempo de exposição ao ozônio, visando entender a relação entre a quantidade de biomassa e o ozônio disponível. O processo foi otimizado considerando a quantidade de açúcares fermentáveis liberados.

2.2 REVISÃO DA LITERATURA

2.2.1 Pré-tratamento alcalino em condições brandas: imersão alcalina

Quando é usado um tratamento químico geralmente o processo de interação com a biomassa está controlado por dois processos: **i)** penetração do solvente e **ii)** difusão. Nas

primeiras etapas do tratamento a penetração do solvente nos capilares da biomassa controla o processo. Os espaços vazios e os novos poros abertos são ocupados pelo licor de tratamento sob um efeito de pressão hidrostática, o inchaço da biomassa como consequência da penetração, faz um aceleração do processo. Uma vez atingido o final desta etapa, o processo é controlado por difusão, nesta etapa predominam as reações químicas com os componentes da parede celular, a dissolução e a liberação de novos compostos (SIXTA; POTTHAST; KROTSCHEK, 2006). Em meio alcalino as primeiras reações são de solvatação e saponificação das ligações éster entre os ácidos p-cumárico e ferúlico com a estrutura da lignina e entre a xilose e celulose com a lignina, dependendo da severidade do tratamento também são observadas reações de descamação e de hidrólise alcalina (XU; LI; MU, 2016).

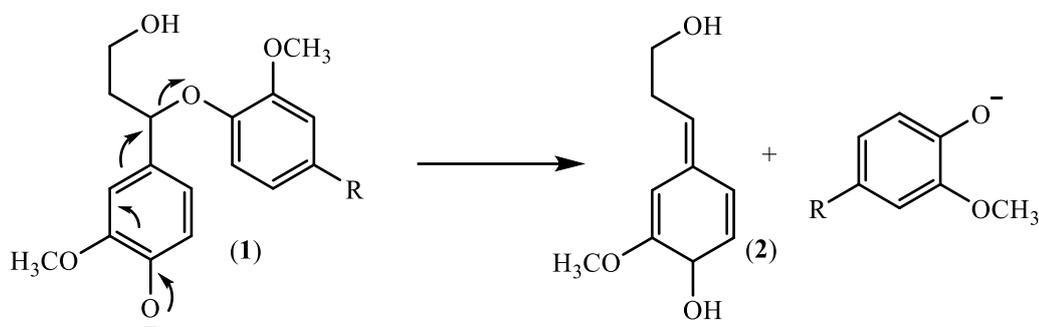
2.2.1.1 Principais reações da lignina em condições alcalinas

As reações na lignina podem acontecer principalmente nos anéis aromáticos e as cadeias laterais das unidades fenil propano, com a quebra das ligações éter, mas, também tem sido relatadas quebra de ligações C-C de maior estabilidade (XU; SUN, 2016). Geralmente, a dissolução de fragmentos da lignina é iniciada pelo rompimento das ligações éter e pelo aumento na hidrofiliabilidade da lignina, assim, a reatividade depende da presença das ligações éter, pois essas ligações nas posições α e β são os grupos funcionais mais abundantes na cadeia lateral dos fenil propanos da lignina. Adicionalmente, tem sido observado que primeiramente reage os grupos hidroxilos fenólicos devido a que são mais reativos e levam para a formação de íons solúveis fenolatos (**1**) (Esquema 1), o qual sofre rearranjos que facilitam o rompimento da ligação entre o carbono α da unidade fenil propanol e o oxigênio do éter (aryl éter ou alkyl éter), gerando um derivado de quinona (**2**) que sofre reações posteriores (adição, eliminação e transferência eletrônica) proporcionando a formação de diferentes produtos intermediários. Normalmente, as reações com alkyl éter são mais difíceis pela estabilidade da ligação (LIN; DENCE, 1992).

No caso que a ligação éter esteja presente no carbono β (β -aryl éter ou β -alkyl éter) tem sido relatado que a velocidade de deslignificação tem relação direta com o rompimento destas ligações (LIN; DENCE, 1992). No pretratamento básico, o grupo hidroxilo do composto (**3**) pode realizar o ataque nucleofílico no α -carbono proporcionando o epóxido (**4**) e realizando a clivagem do composto fenólico do tipo β -aryl éter. Adicionalmente, o epóxido formado (**4**) pode sofrer um segundo rearranjo proporcionando o intermediário quinona (**5**), o qual, seguido por diversas reações de desidratação e rearranjos fornece os produtos (**6 e 7**) (Esquema 2). Estas

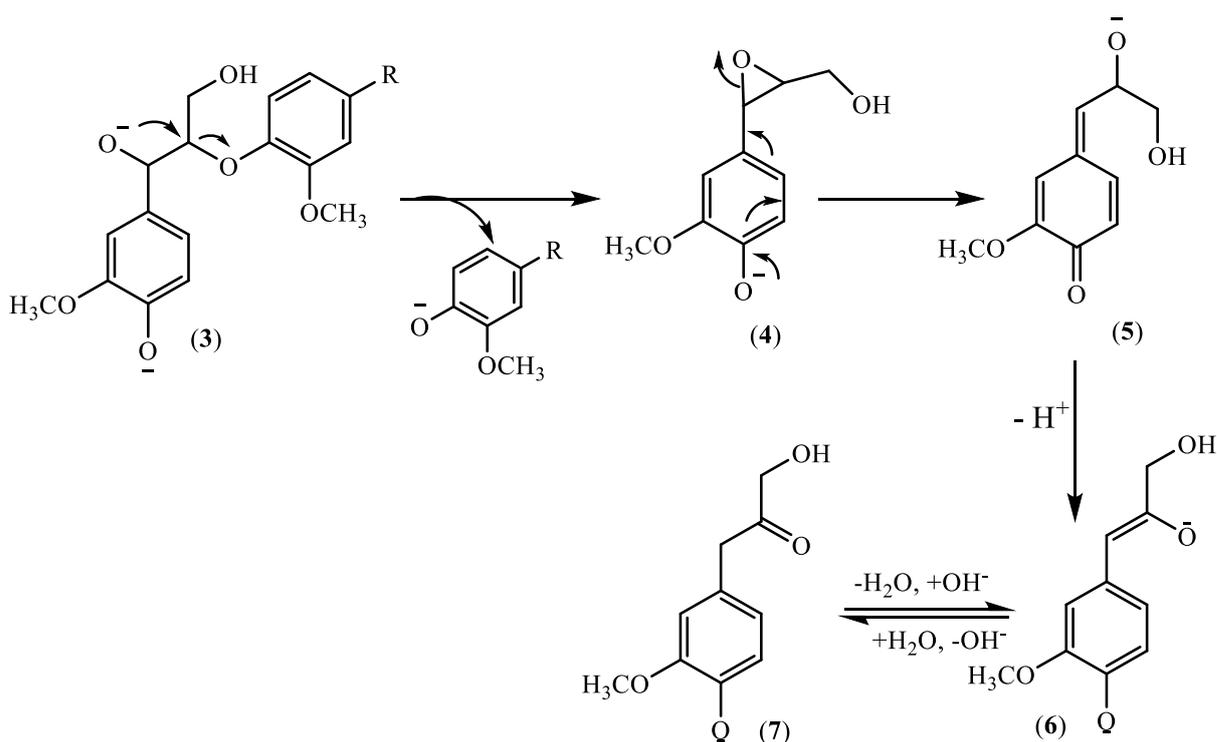
reações têm sido observadas com condições fortes de reação seja temperatura ou concentração do álcali.

Esquema 1. Reação inicial de unidades fenil propanol em meio alcalino



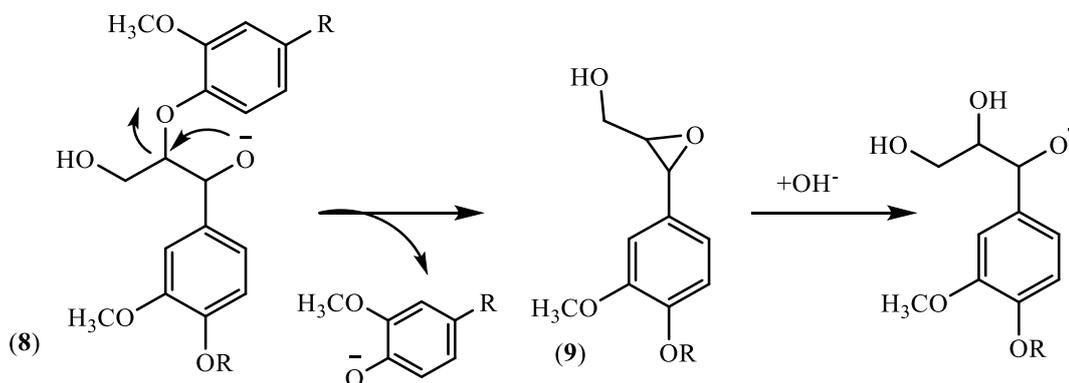
Fonte: adaptado de (XU; LI; MU, 2016)

Esquema 2. Quebra de ligações β aril éter ou alquil éter em meio alcalino



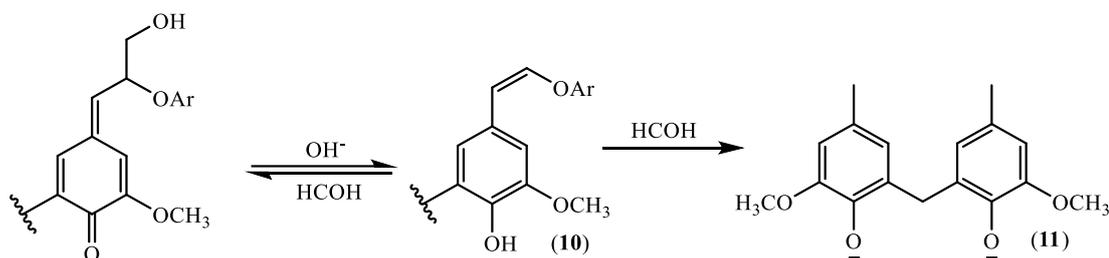
Fonte: adaptado de (XU; LI; MU, 2016)

Para compostos β -aril éter no fenólicos a reação em meio alcalino não leva à formação de um intermediário quinona, esses compostos são muito estáveis, só quando está presente um α -OH é possível fazer a quebra em que o íon oxigênio (8) ataca o β -C para gerar outro intermediário epóxi (9) (Esquema 3) (XU; LI; MU, 2016).

Esquema 3. Reação para compostos não fenólicos β -aryl éter em meio alcalino

Fonte: adaptado de (XU; LI; MU, 2016)

Para as ligações C-C entre grupos aril - aril é necessário grandes quantidades de energia, sendo muito difícil conseguir sua quebra. Caso diferente para as ligações C-C entre grupos aril-alquil ou alquil-alquil que têm sido observadas em condições fortes de tratamento. As reações de condensação também têm sido relatadas e são as principais responsáveis pelas frações de lignina com estruturas 5-5', β -5, 5-O-4 e para-difenil metano, compostos com a característica de ter grande estabilidade e dificilmente clivados. As reações de eliminação começam do intermediário de quinona, onde o grupo γ -hidroximetilo pode ser eliminado como formaldeído, levando para uma estrutura enol éter (10) (Esquema 4), sendo muito importante sua influência na quantidade de lignina residual. O formaldeído gerado pode condensar levando a formação de estruturas diaril metil (11) (SIXTA; POTTHAST; KROTSCHEK, 2006).

Esquema 4. Reação de eliminação de formaldeído da lignina

Fonte: adaptado de (SIXTA; POTTHAST; KROTSCHEK, 2006)

2.2.1.2 Principais reações dos carboidratos em meio alcalino

Apesar de que o principal objetivo do pré-tratamento alcalino é a deslignificação, é inevitável que ocorra alguma degradação dos carboidratos, levando as perdas de açúcares fermentáveis. Geralmente, a celulose apresenta menor degradação pela estrutura cristalina, em comparação com a hemicelulose. Tem sido observado que o alto valor do pH ao início do pré-

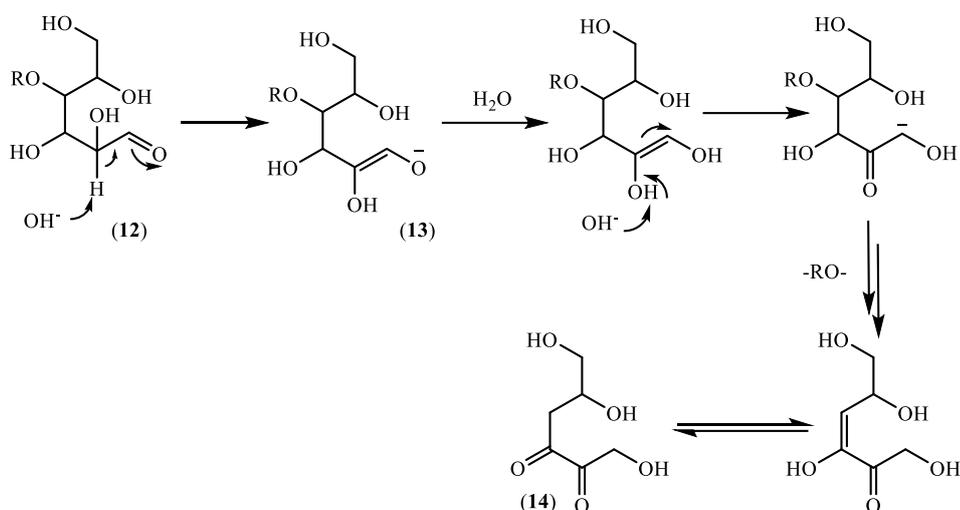
tratamento pode ionizar uma parte dos grupos hidroxilas levando a uma desacetilação na hemicelulose a superiores ≥ 70 °C (YUAN; WEN; LI, 2018).

Inicialmente, são observadas reações de solvatação dos grupos -OH dos carboidratos pelos íons hidroxilo do solvente, gerando o inchaço da fibra, sob condições mais fortes, os carboidratos são atacados e degradados por diferentes tipos de reações que podem acontecer simultaneamente, sendo as mais importantes (XU; LI; MU, 2016):

- Reações de descamação (*peeling reactions*), diminuição do grau de polimerização nos finais redutores,
- Rompimento da cadeia polimérica, também chamado de descamação oxidativo (*oxidative peeling*),
- Hidrólise alcalina, a qual acontece a temperaturas elevadas.

As reações de descamação removem a unidade redutora terminal da cadeia polimérica, gerando um novo grupo final redutor até que seja iniciada uma reação competitiva de finalização, com a formação de um grupo final estável. O mecanismo da reação tem sido descrito anteriormente (SIXTA; POTTHAST; KROTSCHEK, 2006). Mecanicamente, a reação começa com um rearranjo de Lobry de Bruyn-Alberda van Ekensteis, o qual é a interconversão recíproca de carboidratos (**12**) em seus isômeros utilizando uma solução alcalina por meio do intermediário aniônico enediólico (**13**), esta etapa de enolização é o passo determinante da velocidade de reação e que pode ser acelerado pelo aumento na concentração do meio alcalino. Subsequentemente, reações de desprotonação, desidratação e eliminação proporciona o produto dicarbonílico (**14**), o qual é chamado de unidade de saída e é uma estrutura instável em condições alcalinas, que por reações de degradação (rearranjo de ácido benzílico ou reação de Canizarro) leva à formação de ácido isossacarínico (ácido 2,5-dihidroxipentanóico) como principal produto de degradação da celulose. As reações de descamação ocorrem em temperaturas superiores a 110 °C e levam a perda entre 50 e 60 unidades de glicose antes de iniciar a reação competitiva de finalização, em que o grupo final redutor é estabilizado pela conversão em ácido metassacarínico ou em ácido aldônico unido à cadeia de celulose (XU; LI; MU, 2016).

Esquema 5. Reação geral de descamação de carboidratos em meio alcalino.



Fonte: adaptado de (SIXTA; POTTHAST; KROTSCHKEK, 2006)

Quando as reações de descamação atingem a hemicelulose (especificamente a cadeia polimérica de xiloses), as ramificações presentes dificultam de maneira importante a degradação alcalina, apesar de que a velocidade da reação é maior para a hemicelulose em comparação com a celulose, sendo esta última significativamente retardada pelas cadeias laterais (PENG et al., 2009).

Para as reações de descamação oxidativa, o rompimento da ligação glicosídica ocorre por eliminação β -alcoxi. Assim, os grupos oxidados em C2, C3 ou C6 são considerados como ligações fracas. Um grupo ceto em C2 ou um aldeído em C6 e o carbono anomérico são referidos como carbonilas ativas, dando um novo grupo final redutor que sofre mais reações de degradação. Um grupo ceto em C3 é considerado como uma carbonila inativa, devido que a possível eliminação β leva para um grupo final não redutor (XU; LI; MU, 2016). A temperaturas superiores de $140\text{ }^\circ\text{C}$ começam as reações de hidrólise alcalina, nas quais a cadeia de celulose tem quebra das ligações glicosídicas levando à formação de mais grupos finais redutores, favorecendo as reações de descamação (segunda etapa de descamado).

2.2.2 Ozonólise

O ozônio é uma molécula triatômica não linear é altamente reativa e sua estabilidade em soluções líquidas depende de fatores como a temperatura, pressão, pH, força iônica, entre outros, a molécula tem uma natureza electrofílica causada por sua estrutura ressonante. Uma

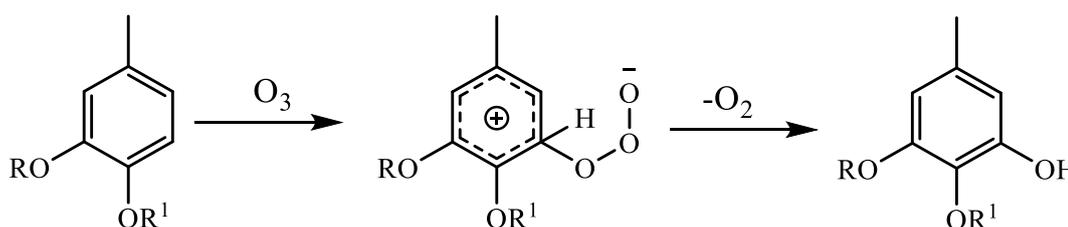
característica importante é seu alto potencial de oxidação (2.07 V) maior que para o oxigênio e peróxido de hidrogênio, razão pela qual tem sido usado no processamento de polpa de madeira. É altamente reativo para compostos com duplas ligações conjugadas e para grupos funcionais com alta densidade eletrônica (MUSSATTO, 2016), é por isto, que tem demonstrado alta reatividade para a lignina. Os diversos estudos que têm sido realizados com a aplicação de ozônio em BLC demonstram sua efetividade na remoção de lignina e o aumento na digestibilidade enzimática do material, entretanto, talvez a principal desvantagem desta metodologia seja o alto custo associado com a geração do ozônio que ainda não é compensado pelos rendimentos na produção de biocombustíveis (BINDER; PELLONI; FIECHTER, 1980; PANNEERSELVAM et al., 2013; SILVERSTEIN et al., 2007).

Na reação do ozônio como a BLC, a etapa determinante da velocidade é a transferência de massa do gás até o sítio ativo na fibra vegetal. O mecanismo mais aceito é proposto para um modelo com grande teor de umidade (baixa consistência), em que em um primeiro passo, a mistura gasosa (oxigênio/ozônio, ar/ozônio) é dissolvida na camada móvel de água sobre a fibra úmida, por convecção. O ozônio dissolvido, bem como os demais produtos da reação são transportados por difusão até uma camada imóvel de água sobre a fibra vegetal. Sendo esta última etapa a mais lenta e, conforme a reação avança o teor de umidade começa diminuir por evaporação, sendo assumido que a camada móvel não está presente (SIXTA; POTTHAST; KROTSCHKEK, 2006).

2.2.2.1 Principais reações do ozônio com a BLC

A reação do ozônio com compostos aromáticos inicia com um ataque eletrofílico do ozônio que leva à formação de um derivado fenólico que tem maior reatividade para as reações de substituição eletrofílica, sendo observado uma posterior 1,3-cicloadição do ozônio (Esquema 6).

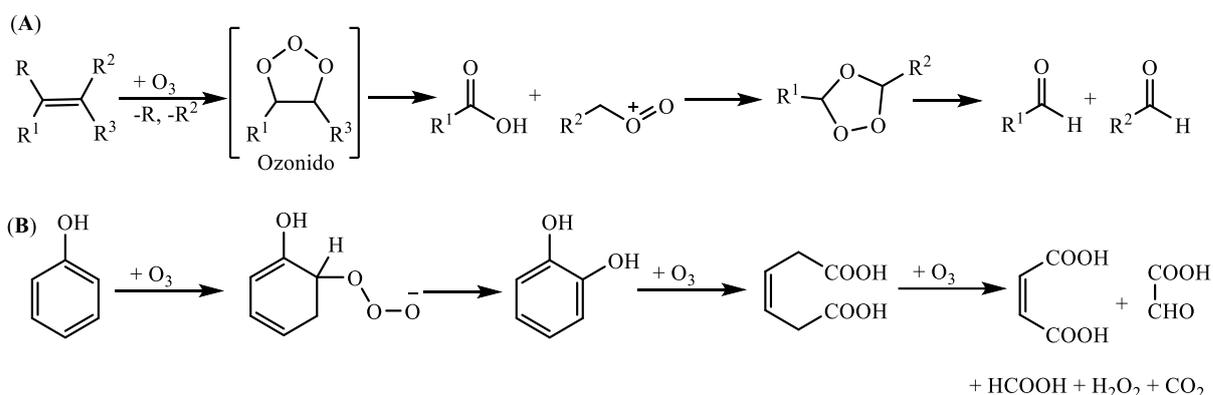
Esquema 6. Reação de ozônio com compostos aromáticos



Fonte: adaptado de (TRAVAINI et al., 2014)

Em duplas ligações, o ozônio pode adicionar-se por uma reação 1,3-cicloadição, com a formação de um primeiro intermediário ozônio, de acordo com o mecanismo proposto por Criegee (Esquema 7A). O ozônio sofre decomposição em um óxido de carbonila e um composto carbonila simples, os quais são combinados para formar um novo intermediário ozônio cíclico, que rapidamente sofre quebra para formar os produtos finais da ozonólise (MURRAY, 1968).

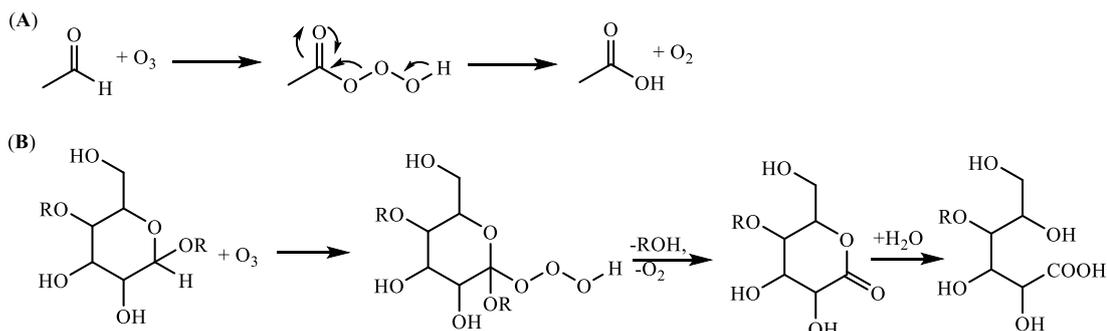
Esquema 7. Reação entre ozônio e duplas ligações. A) alifáticas, B) aromáticas



Fonte: adaptado de (TRAVAINI et al., 2014)

No caso dos compostos aromáticos substituídos com grupos doadores de elétrons (hidroxilas ou aminas) que são mais reativos como ozônio, o ataque do oxidante leva a abertura do anel aromático com a formação de produtos alifáticos com grupos carboxílicos e carbonilas (Esquema 7B) (MUSSATTO, 2016). O ataque direto do ozônio nos carboidratos leva à formação de grupos carbonila e carboxila pela inserção de ozônio no oxigênio acetal (Esquema 8A) e na ligação C-H no carbono anomérico (Esquema 8B), por um mecanismo de adição 1,3-dipolar (OLKKONEN et al., 2000).

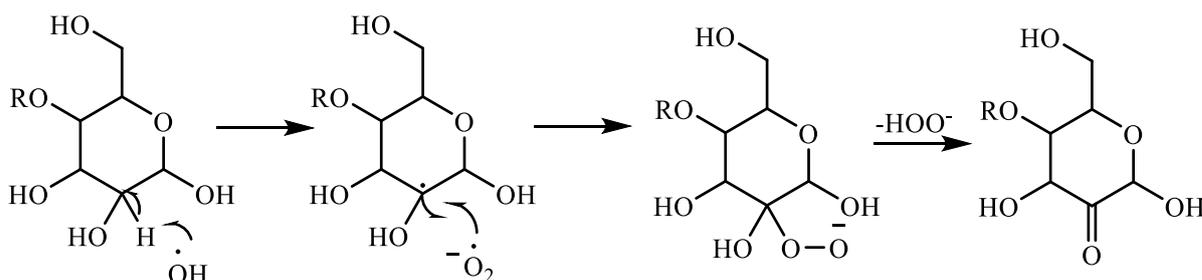
Esquema 8. Inserção do ozônio na ligação A) aldeído e B) acetal de carboidratos



Fonte: adaptado de (TRAVAINI et al., 2014)

Entretanto, os carboidratos também podem ser degradados por espécies derivadas da decomposição do ozônio em presença de quantidades elevadas de água devido a formação do radical hidroxila que participa na quebra de ligações glicosídicas. O mecanismo inicia pela subtração de um hidrogênio, seguido por uma oxigenação do radical centrado no carbono, o que permite a introdução de grupos carbonilas (Esquema 9) (TRAVAINI et al., 2014).

Esquema 9. Reação de espécies derivadas de ozônio com carboidratos



Fonte: adaptado de (TRAVAINI et al., 2014)

2.3. METODOLOGIA

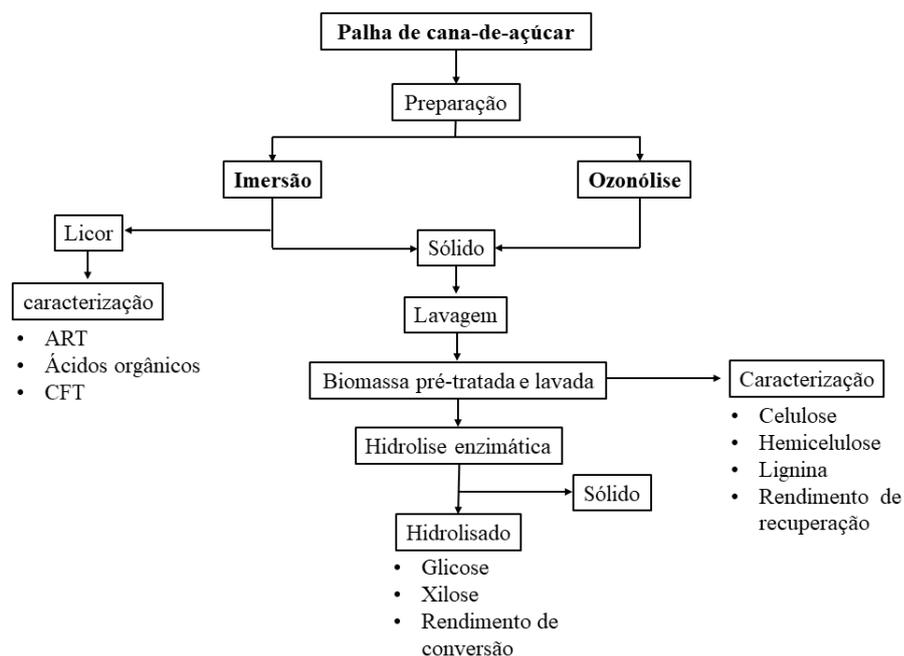
2.3.1 Preparação da biomassa

A palha de cana-de-açúcar foi fornecida pela Usina Vale (Onda Verde, Brasil). O material recebido continha principalmente folhas secas (com alta umidade e prensadas), que foram lavadas com água corrente a 25 °C duas vezes e secas em forno com circulação de ar a 45 °C por 72 horas, até atingir valor de umidade menor que 5 % (m/v). A seguir, as folhas foram trituradas (triturador TRAPP® 400) e peneiradas para a padronização do tamanho de partícula entre 0,42 mm e 1,00 mm (16 a 35 MESH), a biomassa foi armazenada em temperatura ambiente e livre de umidade e luz para seu posterior uso. Antes de cada experimento, a umidade da biomassa foi verificada em valor menor a 5 %.

2.3.2 Pré-tratamento da biomassa

A biomassa foi pré-tratada por imersão e ozonólise, cada pré-tratamento foi empregado de forma individual (Figura 3).

Figura 3. Fluxograma para o desenvolvimento dos pré-tratamentos individuais

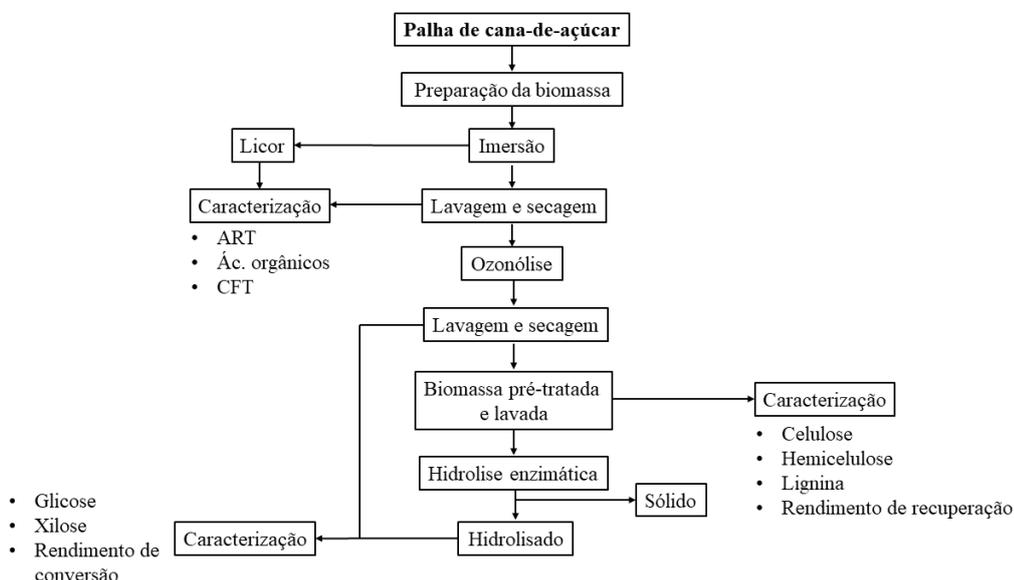


Fonte: elaborado pela autora

Adicionalmente, foi realizada a combinação de imersão e ozônio (Figura 4), para a proposta de pré-tratamento combinado, a ozonólise foi aplicada após o pré-tratamento individual de imersão. Para o licor obtido do pré-tratamento de imersão, as soluções aquosas obtidas de cada etapa de lavagem e o hidrolisado, foi analisado o conteúdo de açúcares redutores totais, compostos fenólicos totais e ácidos orgânicos de baixo peso molecular.

No caso das frações sólidas pré-tratadas, foi determinada sua composição química (celulose, hemicelulose e lignina, além do rendimento de recuperação). Para os hidrolisados obtidos após a hidrólise enzimática, foi determinado o conteúdo de glicose, xilose e calculados os rendimentos de conversão.

Figura 4. Fluxograma para o desenvolvimento do pré-tratamento combinados imersão-ozonólise



Fonte: elaborado pela autora

2.3.2.1 Pré-tratamento de imersão (meio ácido, alcalino e neutro)

Para o pré-tratamento de imersão foram testados a concentração da solução, tempo e temperatura do processo, para três diferentes meios: ácido (ácido sulfúrico), alcalino (hidróxido de sódio) e neutro (água). A faixa de concentração do ácido sulfúrico foi entre 0,05 e 0,5 mol L⁻¹, para o hidróxido de sódio foi entre 0,05 e 0,2 mol L⁻¹. O tempo do pré-tratamento foi testado entre 1 e 24 horas a temperatura fixada em 25, 50 e 80 °C. A carga de sólidos foi mantida em 5% (m/v) (5 g de biomassa por cada 100 mL de solução de imersão). Depois do pré-tratamento a biomassa foi lavada com diferentes tipos de solventes (orgânicos, álcali e água) com carga do 5 % (m/v) em um agitador orbital por 30 minutos a 25 °C, após foram secadas em forno com circulação de ar a 45 °C por 16 horas e armazenadas.

2.3.2.2 Pré-tratamento com ozônio.

Na ozonólise foram estudados os seguintes parâmetros: tempo de exposição, concentração de ozônio e tipo de reator. O ozônio foi gerado pelo método de descarga elétrica tipo corona (equipamento Radast 10C, Ozoxi-Ozônio), com ar como fonte de oxigênio e com um fluxo de entrada de 4,5 L min⁻¹ e acoplado a um sistema de refrigeração. A quantificação do ozônio na saída do reator foi determinada pelo procedimento padrão 2350 para um método

semi-batelada descrito em “*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*” (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WATER ENVIRONMENTAL FEDERATION, 1998). Neste procedimento, os gases da saída do reator são borbulhados pelo tempo de estudo, em dois recipientes sequenciais (frascos de lavagem de gases) contendo solução 2 % (m/v) de iodeto de potássio. Em seguida, o conteúdo de cada frasco de lavagem foi titulado usando uma solução 0,01 N de tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$). A aplicação da Equação 1 permite obter a concentração de ozônio em porcentagem (m/m) de ozônio no ar de entrada.

Equação 1. Determinação da concentração de ozônio

$$\text{Concentração de Ozônio} \left(\% \frac{m}{m} \right) = \frac{V * N * 24}{t * F * d * 1000}$$

Onde: V= volume em mL de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ necessário para titular os dois recipientes, N= normalidade da solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, t= tempo de borbulhamento do gás (minutos), F= fluxo de ar na saída do gerador (L min^{-1}), d= densidade do ar (kg L^{-1}).

Dois reatores foram testados, um reator rotativo baseado em um balão de vidro de fundo redondo (com capacidade de 250 mL) acoplado a um evaporador rotatório e um reator de coluna de leito fixo de vidro (diâmetro 2,7 cm x 50 cm de comprimento). A entrada do gás foi a partir da parte inferior da coluna, seguindo um fluxo ascendente. Para ambos os reatores, a saída do sistema foi dirigida para o aparelho de quantificação de ozônio descrito anteriormente. O tempo de exposição foi variado entre 30 e 120 min. A concentração do ozônio gerado foi testada entre 0,17 e 1,30 % (m/m).

Numa fase posterior, foi estudado a ozonólise com aplicação de ciclos. Esses experimentos foram realizados no reator rotatório, em cada ciclo foi inserido ao reator uma determinada quantidade de ozônio (tempo de exposição), depois o reator foi fechado para permitir a interação entre a biomassa e ozônio presente no reator (tempo de reação), completando assim um ciclo. Os parâmetros testados foram o tempo de exposição entre 10 e 40 s, tempo de reação entre 0 e 60 min, quantidade de BLC tratada em cada ciclo entre 0,1 e 7,0 g e a concentração de ozônio inserido ao reator que foi testada entre 0,17 e 1,11 % (m/m). Para todos os experimentos, se determino a quantidade de ozônio que foi consumida em cada ciclo.

2.3.3 Caracterização química da biomassa

A biomassa sem tratamento (*in natura*) e as amostras pré-tratadas foram submetidas a caracterização química dos carboidratos celulose (como glicose), hemicelulose (como xilose) e lignina total (solúvel e insolúvel) seguindo o procedimento analítico da norma NREL/TP-510-42618 (SLUITER et al., 2012). Antes dessa análise a amostra *in natura* foi tratada para remoção de extrativos pelo método NREL/TP-510-42619 (A. SLUITER, R. RUIZ, C. SCARLATA, J. SLUITER; TEMPLETON, 2008). A determinação de cinzas foi realizada pela norma NREL/TP-510-42622 (SLUITER et al., 2005). A quantificação dos carboidratos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência como se descreve na seção 3.6.1.

2.3.4 Hidrólise enzimática da biomassa

A biomassa sem tratamento foi usada como controle e as amostras pré-tratadas foram submetidas à hidrólise enzimática para a produção dos açúcares fermentáveis. Os experimentos foram realizados em frascos de 20 mL dispostos em incubadora com agitação orbital de 150 rpm, usando uma solução tampão de citrato de sódio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 5,0, a temperatura de incubação foi de $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e uma carga de 10 % de sólidos totais (m/v), o tempo da hidrólise foi de 24 horas.

A carga enzimática foi padronizada pela atividade no papel filtro (FPU mL^{-1}) (GHOSE, 1987) por grama de biomassa, sendo empregada em torno de 10 FPU mL^{-1} para cada experimento. A dosagem foi realizada a partir do preparo de uma solução-mãe das enzimas comerciais Cellic[®] CTEC2 e HTEC2 misturadas na proporção de 4:1, respectivamente. A solução final das enzimas após da diluição para fixar o complexo enzimático em 10 FPU mL^{-1} , continha as seguintes atividades enzimáticas: proteína total $0,7 \text{ mg mL}^{-1}$ (BRADFORD, 1976), β -glicosidase $28,0 \text{ IU mL}^{-1}$, xilanase $28,7 \text{ IU mL}^{-1}$, β -xilosidase $0,2 \text{ IU mL}^{-1}$, CMCase $9,0 \text{ IU mL}^{-1}$, AVICELase $3,1 \text{ IU mL}^{-1}$ (DA SILVA DELABONA et al., 2016). Os sobrenadantes coletados da hidrólise foram centrifugados por 5 minutos a 4000 rpm, diluídos e filtrados em membrana de PVDF (Merck) de $0,2 \text{ }\mu\text{m}$ para a quantificação dos açúcares fermentáveis por cromatografia líquida.

2.3.5 Caracterização por espectroscopia vibracional infravermelha com transformada de Fourier e com reflexão total atenuada (FTIR-ATR) da biomassa

A espectroscopia de infravermelho foi usada para estudar as mudanças estruturais na BLC promovidas pelos pré-tratamentos em comparação ao material de controle (sem tratamento), em respeito aos grupos químicos funcionais. Os espectros vibracionais das biomassas pré-tratadas foram coletados em um espectrofotômetro modelo Spectrum UATR Two-PerkinElmer®, na região de 4000 a 400 cm^{-1} e com resolução espectral de 4 cm^{-1} e acumulações de 32 scans.

2.3.6 Métodos analíticos

2.3.6.1 Quantificação de glicose e xilose por cromatografia de troca iônica

Os hidrolisados obtidos após da hidrólise enzimática e a fração líquida obtida da caracterização química, foram analisados por cromatografia para a quantificação de glicose e xilose. Foi empregado um cromatógrafo de troca iônica de alta eficiência com detector amperométrico de pulsos (HPAEC-PAD, Thermo Scientific, Dionex, ICS-5000), acoplado a uma coluna de troca aniônica CarboPac® PA-1. A temperatura da coluna foi mantida a 25 °C. A fase móvel esteve composta por água ultrapura (solvente A) e NaOH 0,5 mol L⁻¹ (solvente B), usando eluição isocrática de 0 até 12 minutos com 4,8 % de B, de 12 até 16 minutos com 100 % de B e de 16 até 25 minutos 4,8 % de B. Foi utilizado fluxo de 1 mL min⁻¹. Antes de cada injeção, as amostras foram passadas por filtros de 0,2 μm (membrana PVDF, Merck).

2.3.6.2 Quantificação de açúcares redutores totais

Para o licor obtido do pré-tratamento de imersão em meio alcalino, as soluções de lavagem desta etapa e da ozonólise e para o hidrolisado, foi determinada a quantidade de açúcares redutores totais (ART) presentes neles e, assim pôde-se determinar as perdas dos carboidratos pelo tratamento. As soluções foram centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos e realizadas as diluições correspondentes dos sobrenadantes. O procedimento foi baseado no método espectrofotométrico com ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) para a hidrólise dos polissacarídeos presentes na amostra. A absorbância foi determinada em 540 nm (GHOSE, 1987).

2.3.6.3 Quantificação de compostos fenólicos totais

Para o licor obtido após do pré-tratamento foi determinado o conteúdo de compostos fenólicos totais (CFT) pelo método de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999), com ácido gálico como padrão de calibração, realizando as leituras de absorbância em 765 nm.

2.3.6.4 Análise cromatográfico de ácidos orgânicos de baixo peso molecular, furfural e Hidroximetilfurfural (HMF)

No licor obtido também foi determinada a concentração de ácidos de baixo peso molecular (acético, fórmico, fumárico e oxálico), HMF e furfural. O pH das amostras foi neutralizado com HCl 1,0 mol L⁻¹, em seguida foram centrifugadas e separado o sobrenadante. A análise foi realizada em um cromatógrafo líquido de alta eficiência Flexar (PerkinElmer) equipado com detector de ultravioleta-visível (UV-Vis). Foi utilizada uma coluna Aminex[®] HPX-87H e ácido sulfúrico 6.5 mmol L⁻¹ como fase móvel com fluxo de 0.8 mL min⁻¹, a temperatura da coluna se fixou em 65 °C e o comprimento de onda foi ajustado em 210 nm. A quantificação de HMF e furfural foi desenvolvida no mesmo cromatógrafo acoplado a uma coluna C₁₈ Acclaim[™] 120 mantida a 35 °C. Para a eluição foi utilizado um gradiente de concentração com um fluxo de 0,7 mL min⁻¹ nas seguintes proporções: acetonitrila-água (60:40 v/v) por 10 minutos, continuando com acetonitrila-água (95:5 v/v) por 16 minutos e acetonitrila-água (60:40 v/v) por 15 minutos, o comprimento de onda se fixou em 360 nm. Antes de cada análise, as amostras foram tratadas com 2,4 dinitrofenilhidrazina (DNP) para sua derivatização, de acordo com a metodologia descrita por Nascimento (NASCIMENTO et al., 1997).

2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1 Composição química da palha de cana-de-açúcar

Após a palha ser triturada, foram obtidas três frações de material com diferentes tamanhos de partículas, menor a 0,42 mm, entre 0,42 e 1,00 mm e maior a 1,00 mm. A análise composicional foi feita para as três frações. Os resultados se apresentam na Tabela 1, cada análise foi realizada por triplicata. Os resultados dos componentes para cada fração foram comparados com estudos prévios, mostrando que eles estão dentro das faixas de valores

reportados, sendo que as principais diferenças estão no conteúdo de lignina. Alguns pesquisadores têm concluído que as diferenças no conteúdo dos três principais componentes são causadas por fatores ambientais, condições de crescimento, variedade (CANILHA et al., 2012; DOS SANTOS et al., 2015; SHERPA; GHANGREKAR; BANERJEE, 2018), metodologias de quantificações (HATFIELD; FUKUSHIMA, 2005), genética da planta (BENJAMIN; CHENG; GÖRGENS, 2013), entre outros.

Tabela 1. Composição química da palha de cana-de-açúcar sem tratamento.

Componentes da BLC (% m/m)	Menor 0,420 mm	Entre 0,420 e 1 mm	Maior a 1,000 mm	Outros estudos				
				1	2	3 ^b	4	5
Celulose	37,9±1,2	38,6±0,5	39,3±1,3	35,3±0,6	39,6	44,3±1,35	40,45	39,91-42,12
Hemicelulose	17,9±1,5	14,1±1,7	14,0±0,9	23,0±0,6	27,0	31,1±0,8	33,14	28,45-38,79
Lignina	23,3±1,7	23,9±1,8	24,0±2,0	^a 19,6±0,7	13,9	19,0±2,0	5,85	7,59-13,81
Cinzas	2,9±1,0	4,5±0,2	5,5±1,1	7,8±2,1		4,9±1,1		1,14-3,82
Extrativos	11,9±0,08	13±1,8	12,5±1,5	7,5±0,6		16,7±2,8		

^a Conteúdo de lignina insolúvel em ácido. ^b Valores para BLC sem extrativos. 1: (KRISHNAN et al., 2010), 2: (JUTAKANOKI et al., 2017), 3: (SANTOS et al., 2012), 4: (MOODLEY; GUEGUIM KANA, 2017b), 5: (PEREIRA et al., 2015)

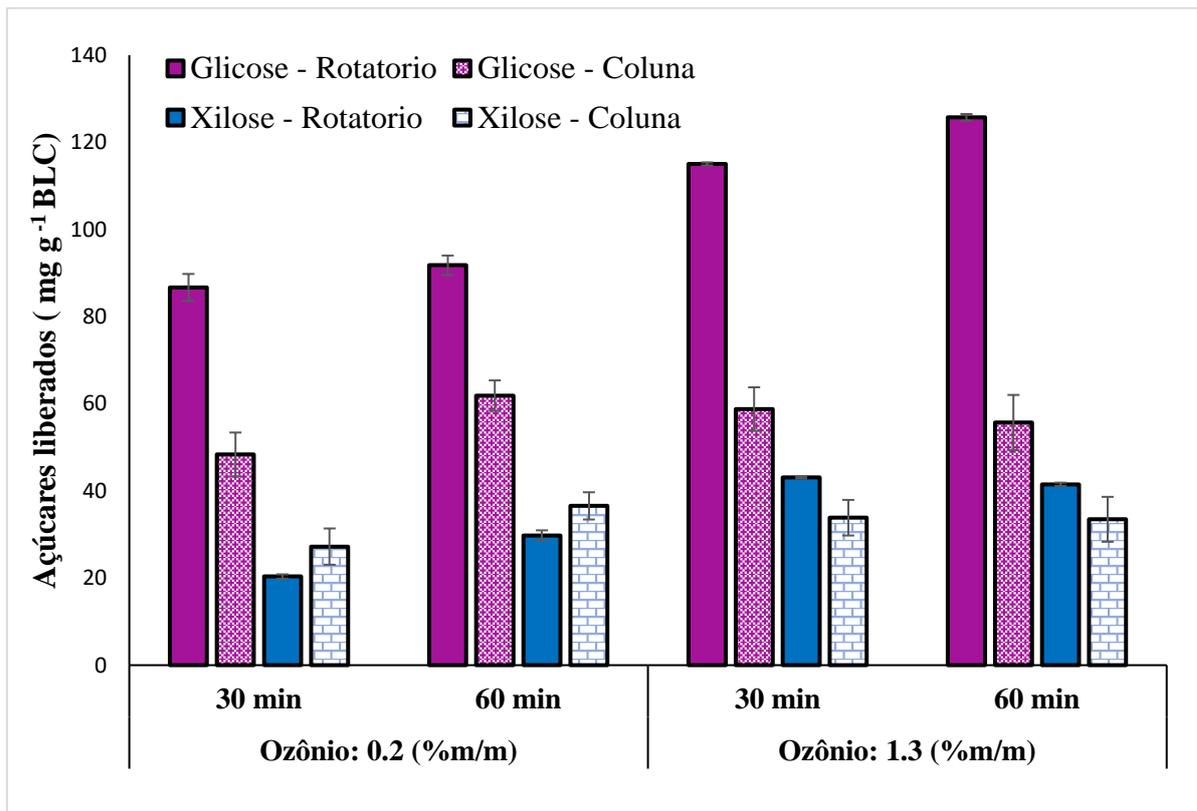
Fonte: elaborada pela autora

2.4.2 Estudo do efeito do reator, teor de umidade, tempo de exposição e concentração de ozônio

Um dos objetivos a ser estudado no tratamento com ozônio, é determinar o efeito do reator, por isso, foi realizado um primeiro planejamento estudando adicionalmente o efeito do tempo e a concentração do ozônio sobre a liberação de açúcares fermentáveis após da hidrólise enzimática. Os resultados demonstraram que todas as variáveis tiveram um efeito positivo sobre a concentração de açúcares, entretanto, para a concentração de ozônio e tipo de reator foram obtidas as maiores variações (Figura 5). O fluxo da mistura ar/O₃ ou O₂/O₃, o tempo da ozonólise e a concentração de ozônio são variáveis com uma complexa inter-relação e com incidência direta sobre a eficiência do pré-tratamento e como consequência sobre os açúcares fermentáveis produzidos. Dos resultados é possível evidenciar que quando a concentração de ozônio é mantida em um valor baixo (0,2 % m/m), o tempo da ozonólise foi determinante na quantidade de glicose obtida, entretanto, o efeito foi menor para a xilose. Se a concentração de ozônio é mantida em valor alto (1,3 % m/m), o tempo não teve efeito sobre a quantidade de

glicose e xilose obtidos, assim, nestas condições, o aumento na disponibilidade de ozônio tem um importante efeito sobre a variável de controle. No caso da glicose, em estudos prévios foram observados melhores resultados devido à maior reatividade da hemicelulose como o ozônio (TRAVAINI et al., 2014).

Figura 5. Efeito do tipo de reator, concentração de ozônio e tempo da ozonólise, sobre a quantidade de glicose e xilose liberados após da hidrólise enzimática.



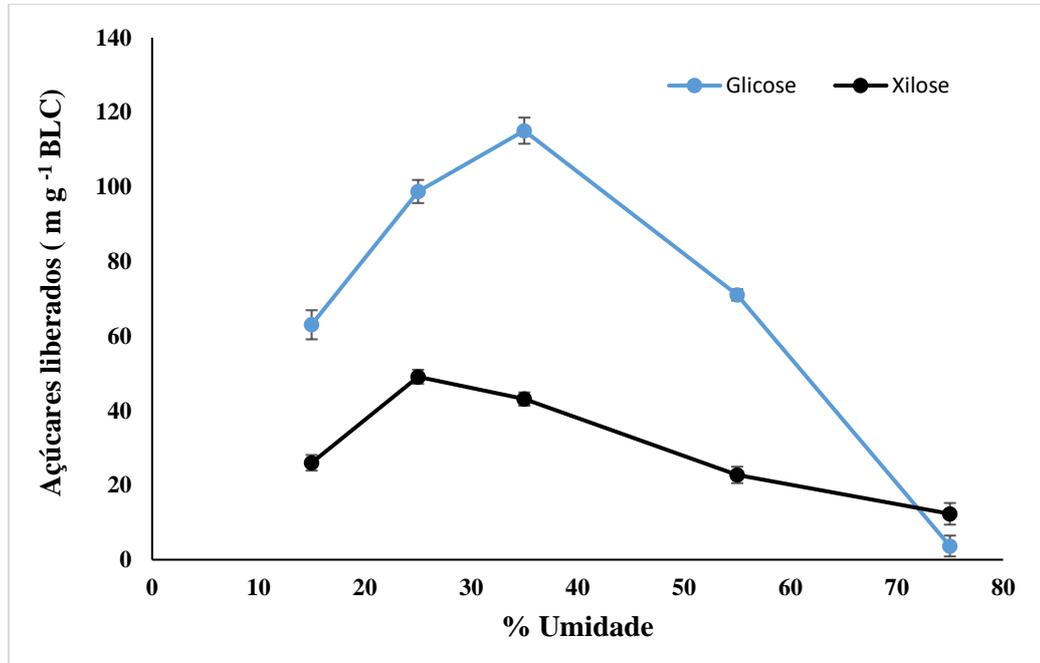
Fonte: elaborada pela autora

Para todos os experimentos, os melhores resultados foram obtidos quando se utilizou o reator rotatório e as maiores concentrações de ozônio, o movimento da biomassa permite uma maior interação entre o gás e a fibra, evitando que a velocidade da reação seja limitada pelas etapas de transferência da fase gasosa à fase líquida fornecida pela adição de água antes de iniciar o pré-tratamento.

Posteriormente, foi estudado o efeito da umidade da biomassa sobre as variáveis de controle. A Figura 6 mostra a variação nos açúcares em dependência do teor de umidade. O processo foi feito com tempo de exposição de 30 minutos e concentração de ozônio de 1,3%

(m/m) realizando a ozonólise no reator rotatório. Os valores estudados foram escolhidos com base na literatura, sendo que o melhor resultado foi obtido para o teor de umidade de 35 %.

Figura 6. Efeito do teor de umidade da biomassa nos açúcares liberados



Fonte: elaborada pela autora

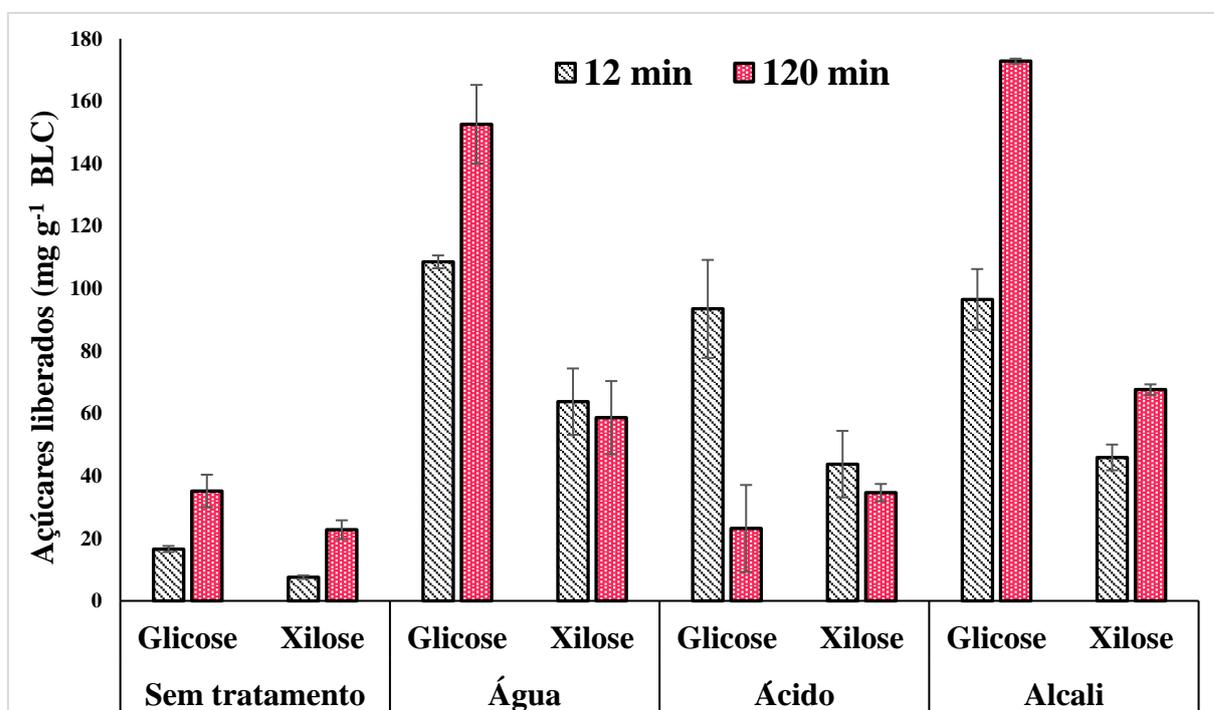
É sabido que devido às suas características de hidrofobicidade e hidrofiliabilidade, cada tipo de biomassa tem uma faixa de valores ótimos no teor de umidade para seu tratamento com ozônio, mas em geral, tem sido proposto duas etapas em que o ozônio consegue interagir com a biomassa, na primeira acontece uma transferência desde a fase gasosa para a fase aquosa subministrada pelo teor de umidade, seguido de um estágio de reação entre a biomassa e ozônio aquoso. Ao início da ozonólise, a velocidade da reação é maior que a velocidade de transferência, mas o processo está limitado pela velocidade com que o ozônio é transportado na interfase gás/água. Quando a ozonólise avança, a velocidade da reação é menor, tornando-se na etapa limitante do processo (LI et al., 2015). Pelo anterior, o teor de umidade deve ter valores favoráveis para a reação do ozônio, em valores muito baixos, a reação será limitada pela transferência de massa, sendo difícil para as moléculas gasosas do ozônio alcançar a biomassa e penetrar os poros. Pelo contrário, quando tem excesso de água na biomassa, esta age como uma barreira, bloqueando o passo do gás até a biomassa (BELTRÁN, 2005), além disso, em água, radicais tipo superóxido são gerados, em presença de oxigênio e ozônio, o superóxido é facilmente convertido em radical hidroxilo em uma reação reversível (SIXTA; POTTHAST;

KROTSCHKEK, 2006), levando para reações de decomposição do ozônio em fase aquosa, como resultado, são observados elevados consumos de ozônio e baixa eficiência do processo (LI et al., 2015).

2.4.3 Estudo das condições para o pré-tratamento de imersão

Nesta etapa o alvo foi pré-tratar a amostra antes da aplicação do ozônio e confirmar seu efeito nos carboidratos e na remoção de lignina. Com base nos resultados obtidos anteriormente, foi escolhido o reator rotatório e teor de umidade de 35 % como condições fixas para a seguinte fase de encontrar os melhores parâmetros para o processo de imersão. Três soluções foram testadas: ácida (H_2SO_4 , $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), alcalina (NaOH , $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e neutra (água) a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Os experimentos foram realizados avaliando dois tempos de pré-tratamento em 12 e 120 minutos. Os resultados são apresentados na Figura 7. As condições de ozonólise foram de 60 minutos e concentração de ozônio de 1,3 % (m/m).

Figura 7. Efeito do meio de imersão e tempo do tratamento na BLC



Fonte: elaborada pela autora

Este estudo preliminar permitiu determinar a influência do meio e do tempo da imersão do processo. Pelos resultados é possível determinar que os três meios têm um efeito positivo nos açúcares liberados, entretanto que, o meio ácido resulto apresentar os menores valores. Alguns estudos têm determinado que durante o tratamento ácido, a hemicelulose é o primeiro componente a ser degradado sendo facilmente hidrolisado devido ao rompimento das ligações xilosídicas e a divisão dos grupos acil éster (BENSAH; MENSAH, 2013), adicionalmente, com o ozônio reagendo com a biomassa, é favorecida a decomposição dos oligoxilanos, gerando compostos inibidores para a hidrólise enzimática (BAIG et al., 2015). Os resultados obtidos mostram que a quantidade de glicose liberada diminui quando o tempo do tratamento aumenta, durante a imersão acida, estes resultados coincidem com outros estudos similares em que a aparição de compostos de baixo peso molecular é evidência da degradação da celulose (MUSSATTO; ROBERTO, 2004).

Uma vez que a imersão foi realizada em condições brandas, o efeito do tempo foi importante. A Tabela 2 mostra os resultados obtidos quando o tempo, temperatura e concentração do meio foram modificados. O tempo foi variado entre 1 e 24 horas (dados reportados na literatura), mantendo constante a concentração dos meios e a temperatura. Quando a imersão foi realizada nos meios ácido e neutro, foi observado uma diminuição nos rendimentos em tempos maiores a 5 horas para os dois açúcares, de outro lado, para a solução alcalina, observa-se uma tendência positiva até as 24 horas avaliadas.

A variação na concentração permitiu determinar que na solução alcalina, cada vez que a concentração foi dobrada (0,05; 0,10; 0,20 e 0,50 mol L⁻¹), foi observado um incremento de 35; 51 e 1.8 % nos rendimentos de glicose. Assim, na maior concentração o pequeno aumento dos valores, mostra que o aumento na concentração do meio alcalino pode não gerar um significativo aumento nos açúcares, o efeito negativo do aumento deste parâmetro, tem sido relatado anteriormente, é relacionado com o rompimento da rede formada pelos dois polímeros de celulose e hemicelulose, levando a reações de degradação dos oligossacarídeos e dos monossacarídeos dissolvidos (WEN et al., 2011).

Tabela 2. Otimização dos parâmetros de imersão. Rendimentos na hidrólise de palha de cana-de-açúcar tratada por imersão e ozonólise.

Meio	Efeito do tempo ^a			Efeito da concentração ^b			Efeito da temperatura ^c		
	h	Rendimento em (mg g ⁻¹ BLC)		mol L ⁻¹	Rendimento em (mg g ⁻¹ BLC)		°C	Rendimento em (mg g ⁻¹ BLC)	
		Glicose	Xilose		Glicose	Xilose		Glicose	Xilose
Alcalino	1	156,7	54,9	0,05	161,4	54,5	25	335,8	107,1
	5	187,3	75,4	0,1	217,7	82,5	50	359,7	137,8
	8	191,9	76,4	0,2	329,7	105,3	80	396,5	159,3
	24	200,7	87,6	0,5	335,6	108,5			
Ácido	1	41,0	40,8						
	5	64,5	44,1	0,05	91,2	61,7	25	91,2	61,7
	8	35,4	26,5	0,1	79,1	33,2	50	46,0	49,8
	24	26,3	25,7	0,2	50,4	29,8	80	32,0	43,8
Água	1	154,5	57,5				25	124,3	61,3
	5	167,6	68,3				50	154,5	71,9
	8	165,5	66,0				80	188,8	76,8
	24	147,6	56,3						

Dados reportados em mg g⁻¹ BLC. ^a Concentração da solução 0,1 mol L⁻¹. Temperatura de imersão 25 °C. ^b Tempo de imersão de 8 horas para meio alcalino. Tempo de imersão de 5 horas para meio ácido. Temperatura de imersão 25 °C. ^c Tempo de imersão de 8 horas para meio alcalino. Tempo de imersão de 5 horas para meio ácido. Concentração do meio alcalino de 0,2 mol L⁻¹. Concentração do meio ácido de 0,05 mol L⁻¹. Ozonólise de 60 minutos. teor de umidade de 35% e concentração de ozônio de 1,3% (m/m).

Fonte: elaborada pela autora

Pelo anterior, foi escolhida a concentração de 0,2 mol L⁻¹, sendo que nessas condições brandas é apresentado uma preferência pela liberação de β-glucanos, fenômeno associado com o rompimento das ligações entre celulose e hemicelulose sem levar à decomposição dos polímeros (XU; LI; MU, 2016; YUAN; WEN; LI, 2018). Finalmente, foi estudada a variação da temperatura no processo na faixa de 25 até 80 °C. De novo é confirmado o resultado desfavorável no meio ácido. Entretanto, o incremento da temperatura teve um comportamento positivo em água e álcali, levando a melhores valores nos açúcares liberados nas maiores temperaturas. Baseado nos resultados anteriores, foram escolhidos os meios de imersão neutro e o alcalino com uma concentração de 0,2 mol L⁻¹, tempo de 8 horas e temperatura de 80 °C para continuar com o estudo da ozonólise.

2.4.4 Estudo das condições para o pré-tratamento de ozonólise

A biomassa pré-tratada nas condições ótimas de imersão em meio alcalino e aquoso foi submetida ao tratamento com ozônio. Pelos estudos prévios realizados no presente trabalho, era sabido que em valores máximos de tempo e temperatura foram obtidos os melhores rendimentos nos açúcares liberados, assim, foi testado um valor maior de tempo (120 minutos) e devido que a máxima concentração de ozônio disponibilizada pelo equipamento era de 1,3 % (m/m), foi testado um valor intermédio de 0,74 % (m/m) para verificar a tendência positiva e a possibilidade de encontrar uma relação de ozônio/BLC mais eficiente. A Tabela 3 mostra os resultados obtidos.

Tabela 3. Otimização dos parâmetros da ozonólise. Rendimentos da hidrólise enzimática de palha de cana-de-açúcar tratada por imersão e ozonólise.

Meio	Tempo (min) ^a	Rendimento de Glicose (mg g ⁻¹ BLC)	Rendimento de Xilose (mg g ⁻¹ BLC)	Concentração de Ozônio (% w/w) ^b	Rendimento de Glicose (mg g ⁻¹ BLC)	Rendimento de Xilose (mg g ⁻¹ BLC)
Alcalino	60	396,5	159,3	0,31	322,1	105,5
	90	278,3	107,8	0,74	351,9	125,0
	120	219,8	100,3	1,30	396,5	159,3
Água	60	188,7	76,8	0,31	166,2	47,4
	90	134,6	79,6	0,74	183,2	68,1
	120	121,0	79,1	1,30	188,7	76,8

Dados reportados em mg g⁻¹ BLC. Amostras tratadas com NaOH 0.2 mol L⁻¹ e água, com tempo de imersão de 8 horas e temperatura de 80 °C. Teor de umidade de 35% para a ozonólise. ^a Concentração de ozônio de 1.3% (w/w). ^b Tempo de ozonólise de 60 minutos.

Fonte: elaborada pela autora

Em geral, é confirmado que os melhores resultados são obtidos no meio alcalino. Os resultados quando o tempo foi variado entre 60 e 120 minutos de ozonólise, mostram que a mudança na digestibilidade dos oligopolímeros não é proporcional à variação do tempo. Tem sido relatado que o aumento no tempo de exposição ao ozônio leva a um valor máximo nos açúcares para depois diminuir (PERRONE et al., 2017). No presente estudo, para todos os casos, a quantidade dos açúcares foi menor quando o tempo de exposição aumento.

No relacionado com o efeito da concentração de ozônio, em que cada valor é aproximadamente o dobro do anterior (0,31; 0,74 e 1,3 %), em meio alcalino o aumento nos

açúcares apenas representa 9,3 e 12,7 % para glicose e 18,5 e 27,5 % para xilose, enquanto, em meio neutro o aumento foi de 10,2 e 3 % para glicose e 43,7 e 12,8 % para xilose. Os resultados mostram que um aumento na concentração de ozônio (levando um aumento em seu consumo), não leva necessariamente a um aumento importante na digestibilidade enzimática. Em estudos prévios com outros tipos de biomassa foi observado que não existe uma relação proporcional entre o aumento na concentração de ozônio e o rendimento da hidrólise (VIDAL; MOLINIER, 1988), mas pode sim ter uma relação com o consumo de ozônio (SUGIMOTO et al., 2009). É observado que para a faixa de concentração estudado aqui, com baixa disponibilidade de ozônio apresenta-se maior conversão da celulose; quando a concentração do gás disponível aumenta, a quantidade de açúcares mostra uma tendência a estabilizar.

2.4.5 Efeito da etapa de lavagem como método de detoxificação

É amplamente conhecido que um dos mais simples métodos de detoxificação de biomassa pré-tratada é a lavagem com água, solventes orgânicos (etanol, acetona), soluções alcalinas (cal, amônia, hidróxidos) e soluções poliméricas (CARRASCO et al., 2010; JONSSON; ALRIKSSON; NILVEBRANT, 2013; MARTÍN; KLINKE; THOMSEN, 2007). Assim, para incrementar a remoção de lignina e reduzir os possíveis inibidores para a hidrólise enzimática, foram estudadas soluções de lavagem com água, álcali $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e etanol (50 % v/v) após da imersão alcalina e antes da ozonólise. Em todos os casos, o efeito da lavagem da biomassa antes da ozonólise é claro. Entretanto, não é possível determinar diferenças importantes quando são comparadas as duas primeiras soluções (água, etanol/água), os valores são encontrados dentro da faixa de erro (Tabela 4).

Tabela 4. Efeito sobre os açúcares liberados da quantidade e tipo de solução de lavagem após a imersão alcalina e ozonólise de palha de cana-de-açúcar.

		Glicose (mg g ⁻¹ BLC)	Xilose (mg g ⁻¹ BLC)
Solução de lavagem	Sem tratamento	16,6 ± 0,2	7,6 ± 0,5
	Sem lavagem	303,4 ± 3,6	108,5 ± 1,0
	Primeira (água)	413,8 ± 0,5	159,3 ± 1,6
	Primeira (Etanol/água)	400,7 ± 0,4	148,0 ± 0,8
	Primeira (solução alcalina)	265,8 ± 1,9	90,3 ± 1,2
	Segunda (água)	441,9 ± 3,4	170,8 ± 1,5
	Segunda (Etanol/água)	439,1 ± 2,7	169,2 ± 2,0
	Segunda (solução alcalina)	298,4 ± 1,9	101,5 ± 0,9
	Terceira (água)	447,0 ± 2,5	166,3 ± 2,7
	Terceira (Etanol/água)	445,7 ± 0,8	180,2 ± 1,9
	Terceira (solução alcalina)	287,9 ± 3,1	118,7 ± 2,1

Dados reportados em mg g⁻¹ BLC. Amostras tratadas com NaOH 0,2 mol L⁻¹ e água, com tempo de imersão de 8 horas e temperatura de 80 °C. Teor de umidade de 35% para a ozonólise. Concentração de ozônio de 0,3% (w/w). Tempo de ozonólise de 60 minutos.

Fonte: elaborada pela autora

2.4.5.1 Açúcares redutores e Compostos fenólicos totais

As soluções de lavagem, assim como os hidrolisados obtidos: licor da imersão alcalina e o sobrenadante da hidrólise enzimática foram analisados para determinar as perdas em açúcares e a presença de possíveis compostos inibidores para o processo. Foram determinados nestas soluções a quantidade de açúcares redutores totais, compostos fenólicos (Tabela 5), ácidos de baixo peso molecular (Tabela 6), furfural e HMF.

A presença de inibidores como os compostos fenólicos formados durante as reações de degradação da lignina afeta as etapas seguintes ao tratamento, a hidrólise enzimática e uma posterior etapa de fermentação. Diferentes métodos de detoxificação têm sido estudados, como enzimáticos, redutivos, extrativos e microbiológicos entre os mais comuns (CHANDEL; DA SILVA; SINGH, 2011; JONSSON; ALRIKSSON; NILVEBRANT, 2013; PARAWIRA; TEKERE, 2011). Entretanto, dependendo do tipo de biomassa, do pré-tratamento e do grau de tolerância das enzimas e microrganismos usados nas etapas posteriores, em muitos casos a introdução de uma etapa de lavagem do material tratado leva a valores altos de remoção de

inibidores (DA COSTA NOGUEIRA et al., 2019; FERNÁNDEZ-DELGADO et al., 2019; PANNEERSELVAM et al., 2013; TRAVAINI et al., 2013). O pré-tratamento com NaOH tem seu principal efeito sobre a desestruturação e deslignificação da biomassa (DA COSTA NOGUEIRA et al., 2019; TAN et al., 2019; YUAN; WEN; LI, 2018), em consequência é caracterizado pela maior presença de compostos fenólicos (JÖNSSON; MARTÍN, 2015; MARTÍN; KLINKE; THOMSEN, 2007; TOQUERO; BOLADO, 2014).

Na Tabela 5 é mostrado a quantidade de compostos fenólicos e açúcares redutores totais. Para a solução obtida da imersão alcalina foram obtidos $2,39 \text{ g L}^{-1}$ em CFT, representando um 73% do total formado pela imersão, um valor característico para este tipo de tratamento em condições brandas, levando a considerar que houve uma diminuição no conteúdo de lignina. Os resultados para as soluções de lavagem mostraram como era esperado, que nas primeiras lavagens acontecia as maiores remoções, assim na primeira lavagem com água foi obtido uma remoção de CFT de 94%. As lavagens realizadas com a solução alcalina tiveram as maiores remoções, devido a sua capacidade para dissolver fragmentos de lignina presentes na biomassa. Tendo em conta a pouca diferença encontrada no uso das diferentes soluções de lavagem, foi escolhida a água como solução de lavagem para os dois pré-tratamentos.

Tem sido relatado que a ozonólise tem uma importante vantagem, a baixa produção de inibidores, especialmente ácidos orgânicos de baixo peso molecular e em menor quantidade furfural e HMF (BULE et al., 2013; FERNÁNDEZ-DELGADO et al., 2019; TRAVAINI et al., 2013). É observado que para a solução de lavagem seguinte ao tratamento com ozônio, apresenta uma queda na quantidade de compostos fenólicos em respeito à quantidade gerada com a imersão alcalina, representando 1.5 % deste valor. Como é esperado a quantidades de compostos fenólicos vai depender da deslignificação, entretanto Schultz-Jensen et al (2011a) encontraram que a concentração para alguns compostos fenólicos e ácidos carboxílicos apresentavam valores máximos, mas sua concentração diminuiu com maior tempo de ozonólise.

Tabela 5. Açúcares redutores e compostos fenólicos totais nos hidrolisados e soluções de lavagem.

	Açúcares redutores (g) por cada 100 g de material	Compostos fenólicos totais (g L ⁻¹)	
Licor tratamento de imersão alcalina	1,51±0,01	2,39±0,03	
Primeira (água)	0,51±0,03	0,70±0,02	
Primeira (Etanol/água)	0,44±0,04	0,66±0,01	
Primeira (Solução alcalina)	0,53±0,03	0,76±0,03	
Segunda (água)	0,25±0,03	0,14±0,02	
Segunda (Etanol/água)	0,23±0,01	0,14±0,02	
Soluções de lavagem	Segunda (Solução alcalina)	0,21±0,02	0,21±0,01
Terceira (água)	0,19±0,01	0,05±0,01	
Terceira (Etanol/água)	0,11±0,01	0,03±0,01	
Terceira (Solução alcalina)	0,12±0,01	0,06±0,01	
Ozonólise (água)	0,61±0,01	0,05±0,01	
Sobrenadante da hidrólise enzimática	87,79±0,08	0,20±0,05	

Fonte: Elaborada pela autora

Finalmente, foi analisado o conteúdo de CFT no sobrenadante da hidrólise enzimática após os dois pré-tratamentos, obtendo 0,20 g L⁻¹, mostrando um pequeno aumento em respeito à solução de lavagem após a ozonólise, no entanto, o valor é baixo comparado com a imersão alcalina responsável principal da deslignificação, sendo isto uma importante vantagem para uma posterior etapa de fermentação. Os resultados obtidos estão na faixa daqueles reportados para outros tipos de biomassa e com outros pré-tratamentos (FERNÁNDEZ-DELGADO et al., 2019; LI et al., 2017; PLAZA et al., 2017; TRAVAINI et al., 2013).

No relacionado com os açúcares redutores totais produzidos durante o processo, do total, apenas 3,38 % são perdidos ao iniciar a hidrólise enzimática e menos do 1 % das perdas são consequência das etapas de lavagem, esta perda é amplamente compensada pela diminuição de inibidores presentes no hidrolisado (CARRASCO et al., 2010). Os valores obtidos nas diferentes soluções estão por abaixo dos reportados em outros estudos em similares condições (FERNÁNDEZ-DELGADO et al., 2019; LÓPEZ-LINARES et al., 2019).

2.4.5.2 Ácidos orgânicos de baixo peso molecular, furfural e HMF

Os compostos inibidores formados durante o pré-tratamento podem ser classificados em três grupos com base em seu origem, os fenólicos que resultam das reações de degradação da lignina, os furanos (principalmente HMF e furfural) que resultam das reações de degradação dos açúcares (glicose e xilose, respectivamente), e os ácidos carboxílicos alifáticos de baixo peso molecular, formados pela decomposição dos furanos em condições de reação severas (tempo e/ou temperatura), com a exceção do ácido acético que é formado pela hidrólise de grupos acetil presentes na hemicelulose (MUSSATTO, 2016).

Na Tabela 6 são apresentados os resultados para os 4 ácidos detectados no licor, soluções de lavagem (usando água) e sobrenadante. O ácido acético foi o composto presente na maior quantidade em todas as soluções, no entanto, os valores obtidos encontram-se por baixo de outros estudos, devido possivelmente às condições brandas do tratamento. É sabido que é muito comum sua presença quando a BLC tem algum tratamento (HUANG et al., 2019; JÖNSSON; MARTÍN, 2015) e seu principal efeito é sobre os processos fermentativos (MARTÍN et al., 2002). No tratamento alcalino, tem sido relatado como um dos principais produtos formados como consequência da saponificação dos grupos acetil, reação típica deste tratamento (DA COSTA NOGUEIRA et al., 2019; SUN; LAWOTHER; BANKS, 1996).

No caso dos ácidos fórmico, fumárico e oxálico, sua presença é atribuída às reações de descamação que levam à degradação dos açúcares terminais com a formação de ácidos dicarboxílicos e dihidroxílicos (FENGEL; WEGENER, 1989), a quantidade desses ácidos também é associada com condições brandas dos tratamentos e com a perda de açúcares. Os resultados obtidos estão perto aos reportados em outros estudos (LÓPEZ-LINARES et al., 2019; MORENO et al., 2019; PLAZA et al., 2017; ROQUE et al., 2019).

Tabela 6. Quantificação de ácidos orgânicos de baixo peso molecular em licor, soluções de lavagem e hidrolisado.

		Ácidos (g L ⁻¹)			
		Acético	Fórmico	Fumárico	Oxálico
Licor imersão alcalina		2,43±0,11	1,18±0,17	0,59±0,08	0,27±0,10
Soluções de lavagem	Primeira	1,48±0,19	0,57±0,11	0,46±0,12	0,085±0,04
	Segunda	0,59±0,09	0,38±0,12	0,36±0,08	0,061±0,09
	Terceira	n, d	n, d	n, d	n, d
	Ozonólise	n, d	n, d	0,13±0,04	0,084±0,03
Sobrenadante da hidrólise enzimática		0,65±0,12	n, d	n, d	0,16±0,04

Fonte: elaborada pela autora

Diferente ao tratamento alcalino, para a solução de lavagem após a ozonólise não foram detectados os ácidos acético e fórmico, enquanto que os ácidos oxálico e fumárico estavam presentes em concentrações baixas, isto coincide com estudos prévios em que foi mostrada baixa formação de ácidos orgânicos, embora seja relatada em alguns trabalhos a presença de ácido acético e sua dependência com o tempo da ozonólise (SCHULTZ-JENSEN et al., 2011a). Por último, para o sobrenadante da hidrólise enzimática, só foram detectados os ácidos acético e oxálico com 0,65 e 0,16 g L⁻¹ respectivamente.

Nas condições estudadas, outros possíveis compostos inibidores como o furfural foi detectado só no licor da imersão alcalina em concentração menor a 10 mg L⁻¹. O HMF não foi detectado em nenhuma das amostras, conforme relatado em outros trabalhos (FERNÁNDEZ-DELGADO et al., 2019; GARCÍA-CUBERO et al., 2009; HUANG et al., 2019).

2.4.6 Estudo da composição química da biomassa após dos pré-tratamentos

Simultaneamente aos estudos de degradabilidade enzimática e da geração de compostos inibidores, foi realizado a quantificação da celulose, hemicelulose e lignina, para assim entender as mudanças que estavam sendo feitas na estrutura química da biomassa. Na Tabela 7 são mostrados a composição química, açúcares liberados e rendimento do tratamento.

Tabela 7. Efeito dos pré-tratamentos e etapas de lavagem na composição química, rendimentos de conversão de açúcares e rendimentos de sólidos.

Solução de lavagem	O ₃ % (m/m)	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Glicose (mg g ⁻¹)	Xilose (mg g ⁻¹)	Recuperação de sólidos (%)	Celulose ^a (%)	Hemicelulose ^a (%)	Lignina ^a (%)
Sem tratamento	-	38,6 ± 0,2	14,1 ± 0,5	23,9 ± 1,2	16,6 ± 0,2 (3,8)	7,6 ± 0,5 (4,7)	-	38,6 ± 0,2	14,1 ± 0,5	23,9 ± 1,2
Sem lavagem	0,24	58,0 ± 2,5	23,5 ± 2,7	16,8 ± 2,2	303,4 ± 3,6 (47,0)	108,5 ± 1,0 (41,5)	65,3	37,9 ± 3,3	15,4 ± 1,2	10,9 ± 2,8
	1,3	63,8 ± 2,0	23,7 ± 2,7	13,6 ± 1,9	376,5 ± 1,8 (53,1)	122,0 ± 0,7 (46,3)	65,6	41,8 ± 2,5	15,6 ± 2,0	8,9 ± 1,5
Água	0,24	61,3 ± 1,3	21,0 ± 0,2	13,2 ± 0,5	413,8 ± 0,5 (60,8)	159,3 ± 1,6 (68,2)	64,9	39,8 ± 2,1	13,6 ± 2,2	8,6 ± 1,8
	1,3	65,0 ± 2,1	22,2 ± 1,8	12,1 ± 1,4	434,7 ± 3,6 (60,2)	152,2 ± 1,7 (61,8)	64,9	42,2 ± 3,0	14,4 ± 1,8	7,8 ± 3,1
Etanol (50 % v/v)	0,24	59,3 ± 2,6	20,3 ± 3,5	13,0 ± 0,6	400,7 ± 0,4 (60,8)	148,0 ± 0,8 (65,7)	64,7	38,4 ± 1,5	13,1 ± 1,6	8,4 ± 1,9
	1,3	64,7 ± 3,3	22,5 ± 3,5	12,3 ± 1,2	421,8 ± 0,6 (58,7)	153,4 ± 0,8 (61,3)	64,2	41,5 ± 2,4	14,5 ± 1,0	7,9 ± 2,5
Álcali (0,01 mol L ⁻¹)	0,24	55,5 ± 1,4	20,9 ± 1,1	12,6 ± 1,1	265,8 ± 1,9 (43,1)	90,3 ± 1,2 (38,9)	63,8	35,4 ± 1,0	13,3 ± 2,9	8,1 ± 2,8
	1,3	59,7 ± 1,2	21,4 ± 0,4	11,9 ± 0,5	334,7 ± 0,3 (50,4)	111,7 ± 2,1 (47,0)	62,9	37,6 ± 2,6	13,5 ± 2,8	7,5 ± 2,8

^a Resultados obtidos pela combinação dos rendimentos para cada tratamento

Fonte: elaborada pela autora

Primeiramente, foi estudado o efeito de variar a concentração de ozônio sobre os constituintes da biomassa, para todos os experimentos o aumento do ozônio leva um incremento de celulose e hemicelulose, no entanto, o aumento é pequeno em comparação com o aumento no consumo de ozônio. No caso do tratamento com álcali, seu principal efeito está associado com a variação na cristalinidade da celulose, além de gerar uma parcial despolimerização, já no caso da ozonólise, tem pouco efeito sobre a celulose, sendo que algumas ligações glicosídicas podem ser quebradas (TRAVAINI; BARRADO; BOLADO-RODRÍGUEZ, 2016).

Para a lignina, a mudança é notável entre a biomassa não lavada e com qualquer das soluções de lavagem. O aumento de ozônio levou à maior dissolução de fragmentos e por tanto foi observada maior remoção da lignina, sendo que quando foi realizada a lavagem com a solução alcalina foram obtidas as maiores remoções para cada concentração de ozônio de 47,3 e 50,2 % (0,24 e 1,3 % de ozônio, respectivamente). Tem sido sugerido que o efeito do tratamento alcalino sobre a lignina está principalmente relacionado com sua parcial

despolimerização, além de sofrer rompimento das ligações arilglicerol- β -aril éter e reações de fragmentação, degradação e dissolução, com posterior condensação de fragmentos para formar compostos de baixa solubilidade (BALI et al., 2015; GUPTA; LEE, 2010), por sua parte, durante a ozonólise tem sido relatado sua maior reatividade para as duplas ligações presentes na lignina (COCA; GONZÁLEZ-BENITO; GARCÍA-CUBERO, 2016).

Apesar de ter maior remoção de lignina com a lavagem com álcali, é observado menor quantidade de celulose e hemicelulose presente na biomassa após dos tratamentos. Com água e etanol, os resultados estiveram muito parecidos, assim foi escolhido lavar a amostras com água após de cada pré-tratamento.

Quando são analisados os valores dos açúcares após a hidrólise enzimática e os rendimentos de conversão (valores apresentados entre parêntesis) é observado que quanto mais ozônio está disponível maior quantidade de açúcares são liberados. No entanto, quando são analisados os rendimentos de conversão, as mudanças são muito pequenas, especialmente para as amostras lavadas com água, nas quais os resultados estão dentro da faixa de erro. A diminuição de 1,3 até 0,24 % (m/m) na concentração de ozônio, implica em diminuição de 5,4 vezes no consumo de ozônio, decaindo de 4,2 para 0,78 g necessários para tratar a mesma quantidade de fibras com uma variação pequena nos rendimentos de conversão. O anterior permite determinar que o aumento no consumo de ozônio não compensa a mínima diferença nos açúcares liberados. Adicionalmente, as pequenas variações observadas na quantidade de glicose e xilose liberadas, mostram que não dependem da lignina que permanece na biomassa e que essa não interfere no acesso das enzimas na fração sólida.

Finalmente são apresentados os valores para cada componente tendo em conta os rendimentos na recuperação de sólidos após os dois pré-tratamentos, em que a imersão alcalina tem maior influência, devido que a porcentagem de recuperação esteve em torno de 63 %, enquanto para a ozonólise não foram mais altos do 2 %. Tendo em conta o balanço geral para os dois processos, o conteúdo de lignina diminuiu entre 54 e 68 %, sendo a maior remoção para as lavagens com álcali. No caso da hemicelulose, o conteúdo diminuiu entre 7 e 10 %, enquanto as menores perdas foram no caso da celulose com variação entre 3 e 4 %, mostrando um leve aumento quando foram realizadas as lavagens com água. Assim, os tratamentos e lavagens aplicados conseguiram remover lignina e manter constante os carboidratos.

2.4.7 Análises da composição química e digestibilidade enzimática da BLC para cada etapa dos pré-tratamentos

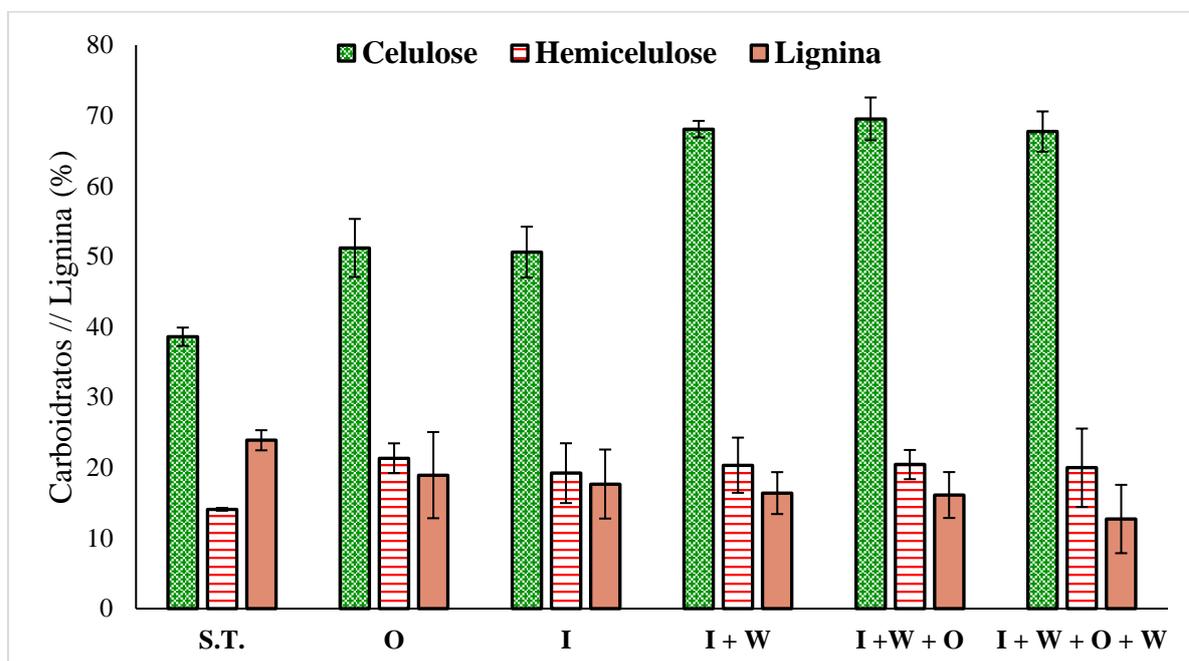
2.4.7.1 Caracterização química. Teores de carboidratos e de lignina na BLC

A composição química da biomassa tratada foi determinada após de cada etapa do processo (imersão alcalina, ozonólise e lavagens) com as condições otimizadas para a imersão de 8 horas, 80 °C e concentração do álcali de 0,2 mol L⁻¹, por sua parte para a ozonólise com 60 minutos, 0,24 % (m/m) de concentração de ozônio e teor de umidade de 35 %, com todas as lavagens com água (Figura 8).

Em respeito à celulose, a imersão alcalina é responsável por as principais mudanças no seu conteúdo, a ozonólise não gera um incremento adicional na celulose. Nas condições estudadas, foi possível atingir 31 % de aumento com imersão, em referência ao material sem tratamento (S.T.), enquanto com uma primeira lavagem com água é observado um aumento de 76 % sem tratar com ozônio. Para a hemicelulose, a imersão permitiu um incremento de 36 % e com lavagem mostra um pequeno aumento para 45 %, não são observadas perdas na biomassa (sem ter em conta o balanço de massa geral). Essa situação poderia ser causada pelas condições brandas da imersão, já que outros estudos têm relatado perdas de ambos açúcares mesmo em condições perto de 1% do meio alcalino, com temperatura e pressão ambiente mas com tempos longos (GUPTA; LEE, 2010; KHUONG et al., 2014), ou com condições medias e concentração entre 5 e 15% (CARVALHO; QUEIROZ; COLODETTE, 2016). Por sua parte Terán-hilares et al., (2016) em condições similares (0.3 mol L⁻¹, 4 horas e 70 °C) relataram degradação de hemicelulose entre 32 e 39 %, com remoção de lignina de 60 % e rendimentos de conversão em torno de 50 %.

Durante a exposição da BLC ao álcali, várias alterações estruturais físicas e químicas permitem maior exposição dos carboidratos, quebrando a estrutura rígida da parede celular, devido a reações de solvatação e/ou saponificação, que subsequentemente levam ao inchaço da estrutura, aumento da porosidade e perda do grau de polimerização (Xu e Sun, 2016). Com concentrações mais altas de álcali, são observadas reações associadas à perda do grupo terminal e à hidrólise alcalina, o que poderia explicar os casos com perda de carboidratos (WEN et al., 2011).

Figura 8. Análise da composição química da biomassa para cada etapa do tratamento.



Caracterização química para cada estágio do processo. Meio alcalino NaOH 0.2 mol L⁻¹, tempo de 8 horas e temperatura de 80°C. Para ozonólise, humidade de 35%, tempo de 60 minutos e concentração de ozônio de 0.24% (m/m). O: ozonólise, I: imersão, W: lavagem

Fonte: elaborada pela autora

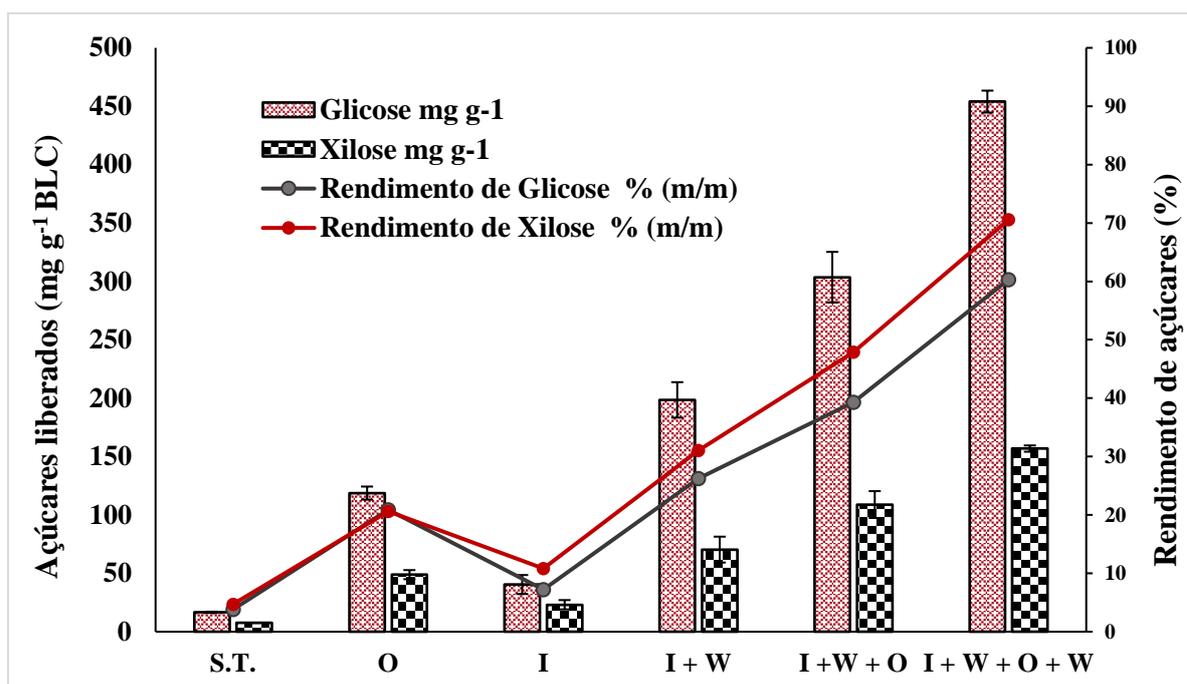
Os resultados para lignina estão em concordância com estudos anteriores em que é relatada sua dissolução. Neste caso, a remoção foi de 36 % com a imersão e 41 % com a primeira lavagem. O tratamento com ozônio incrementa a remoção até 49 %. Esse resultado é favorável considerando que Gupta e Lee (2010) atingiram 29 % de remoção com 24 horas de pré-tratamento alcalino para álamo e 64 % para palha de milho, em similares condições. Carvalho et al., (2016) conseguiram remoções de 11; 22 e 60 % para eucalipto, bagaço e palha de cana-de-açúcar, respectivamente. Khuong et al.,(2014) atingiram remover 65 % de lignina em bagaço de cana-de-açúcar em condições medias de tratamento.

2.4.7.2 Hidrólise enzimática da biomassa

Os resultados claramente mostram que a hidrólise é controlada pela ozonólise (Figura 9), quando somente a imersão alcalina é desenvolvida e os rendimentos de conversão de açúcares permanecem quase constante quando é comparada com o material sem tratamento. Depois da ozonólise, melhores rendimentos de conversão são obtidos, mesmo que os valores sejam muito baixos. No entanto, para amostras tratadas com a imersão alcalina e com lavagem, o rendimento da conversão aumenta de 7 e 11% para 26 e 31% para glicose e xilose,

respectivamente. Isso demonstra que a hidrólise enzimática é limitada pela presença de compostos inibitórios que são formados durante os dois tratamentos. O mesmo fenômeno é observado novamente quando a lavagem após a ozonólise é realizada: o rendimento da conversão de açúcar aumenta para 60 e 71% para glicose e xilose, respectivamente.

Figura 9. Hidrólise enzimática da BLC e rendimento de conversão para cada etapa do processo.



Hidrólise enzimática e rendimento de açúcares para cada estágio do processo. Meio alcalino NaOH 0.2 mol L⁻¹, tempo de 8 horas e temperatura de 80°C. Para ozonólise, umidade de 35%, tempo de 60 minutos e concentração de ozônio de 0.24% (m/m). O: ozonólise, I: imersão, W: lavagem

Fonte: elaborada pela autora

O rendimento obtido é superior ao relatado por Carvalho et al., (2016) (39.4% de glicose), que utilizou palha de cana-de-açúcar e apenas pré-tratamento alcalino em condições muito mais drásticas (temperatura mais alta, concentração de hidróxido e sob pressão) em comparação com o presente trabalho, indicando que a etapa da ozonólise é fundamental para o maior rendimento de glicose. Comparando o abordagem do presente estudo com outros pré-tratamentos empregando apenas a etapa alcalina, Gupta et al., (2010) e Bali et al., (2015) obtiveram glicose (99.8 e 60.0%, respectivamente) e xilose (71.2 e 72.0%, respectivamente), com rendimentos superiores aos nossos. No entanto, as condições de pré-tratamento alcalino empregadas por eles foram mais severas (tempos de reação mais longos e maior concentração

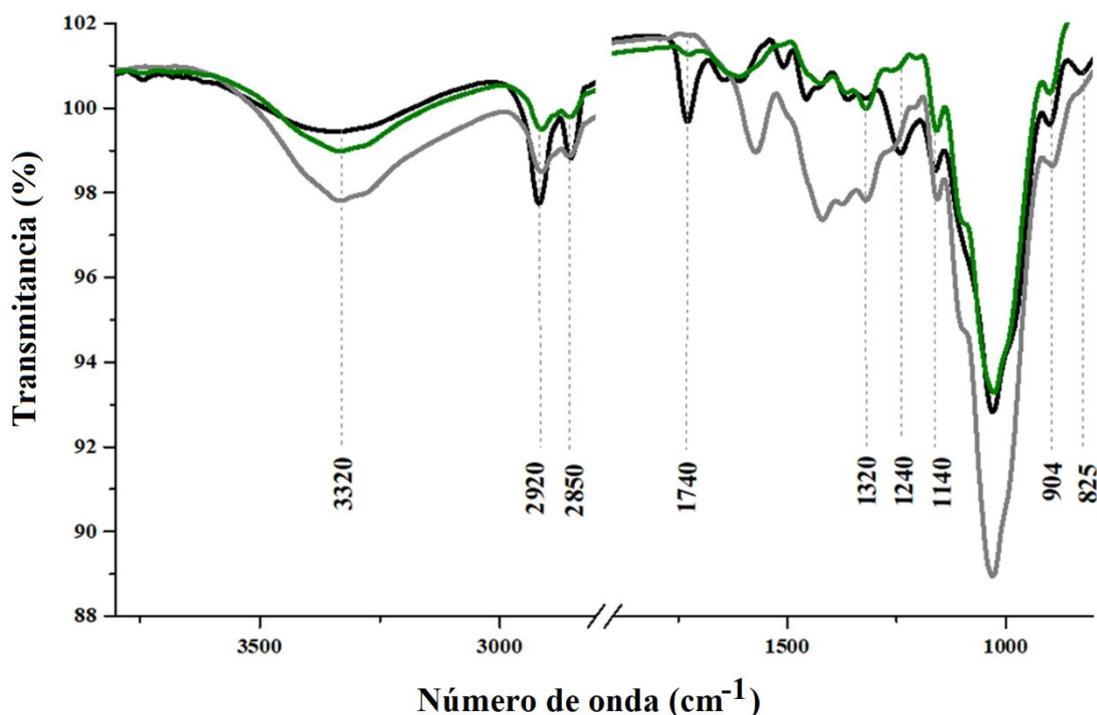
de NaOH) e a fonte de biomassa não foi a palha de cana-de-açúcar (palha de milho e álamo híbrido para Gupta et al., e *populus* para Bali et al).

Por outro lado, quando Travaini et al., (2016) e Shi et al., (2015), usaram ozonólise como pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar obtiveram rendimentos para glicose (45 %, 400 mg g⁻¹) e xilose (20 %, 101.9 mg g⁻¹), menores aos conseguidos no presente estudo, tomando em conta as diferenças na biomassa e o tipo de reator. Esses dados sugerem que apenas a ozonólise não é tão eficiente na produção de açúcares fermentáveis como a combinação de álcali e ozônio.

2.4.8 Estudo de mudanças estruturais da BLC por espectrofotometria vibracional (FTIR-ATR)

As análises de IR foram realizadas para a BLC sem tratamento, com imersão e com imersão/ozonólise (Figura 10). As bandas associadas às principais mudanças na estrutura estão resumidas a seguir: O pico largo em 3320 cm⁻¹ pode ser atribuído ao alongamento O-H das ligações de hidrogênio da celulose, enquanto o alongamento C-O foi responsável pela banda em 1034 cm⁻¹. Duas bandas em 2920 e 2850 cm⁻¹ estão presentes na BLC sem tratamento, sua intensidade diminuiu como resultado dos pré-tratamentos. Sun et al. (2008) associaram essas bandas ao alongamento C-H e CH₂ dos grupos metil e metileno da estrutura da lignina. No entanto, Wang et al, (2007) Relacionaram com CH₂ vibrações assimétricas e simétricas atribuídas à banda de cadeia alquílica menos ordenada, indicando a existência de cera ou substâncias semelhantes a cera no material não tratado. Em 1740 cm⁻¹, é observada a banda correspondente ao alongamento da ligação carbonila dos grupos acetila ou ácidos urônicos na hemicelulose. Após a hidratação, ocorre desacetilação da hemicelulose como consequência do tratamento alcalino. Entre 1600 e 1400 cm⁻¹, são observadas as bandas correspondentes às vibrações do esqueleto aromático da lignina. As mudanças de intensidade e posição nesta região demonstram as modificações feitas na lignina.

Figura 10. Espectros FTIR para a BLC, sem tratamento (linha preta), com imersão (linha cinza), imersão e com ozonólise (linha verde).



Fonte: elaborada pela autora

O deslocamento das bandas a 1466 e 1363 cm^{-1} para 1435 e 1320 cm^{-1} , correspondentes às bandas de estiramento simétricas de CH_2 e CH , demonstra o efeito sobre a lignina. Durante a ozonólise, a perda das bandas anteriores junto com a perda da banda em 825 cm^{-1} que corresponde a uma vibração fora do plano de CH aromática na lignina, confirma a redução do conteúdo de lignina (WANG; HAN; ZHANG, 2007). As bandas de 1320 e 1240 cm^{-1} foram assignadas ao alongamento CO dos anéis aromáticos. Essas bandas foram associadas a unidades de sinapila e coniferila (SUN; LAWOTHER; BANKS, 1996). Duas bandas de absorção em 1160 e 904 cm^{-1} surgiram do alongamento C-O-C nas ligações β -(1 \rightarrow 4)-glicosídicas. O alongamento do anel no plano deu um ombro a 1103 cm^{-1} (SUN et al., 2008).

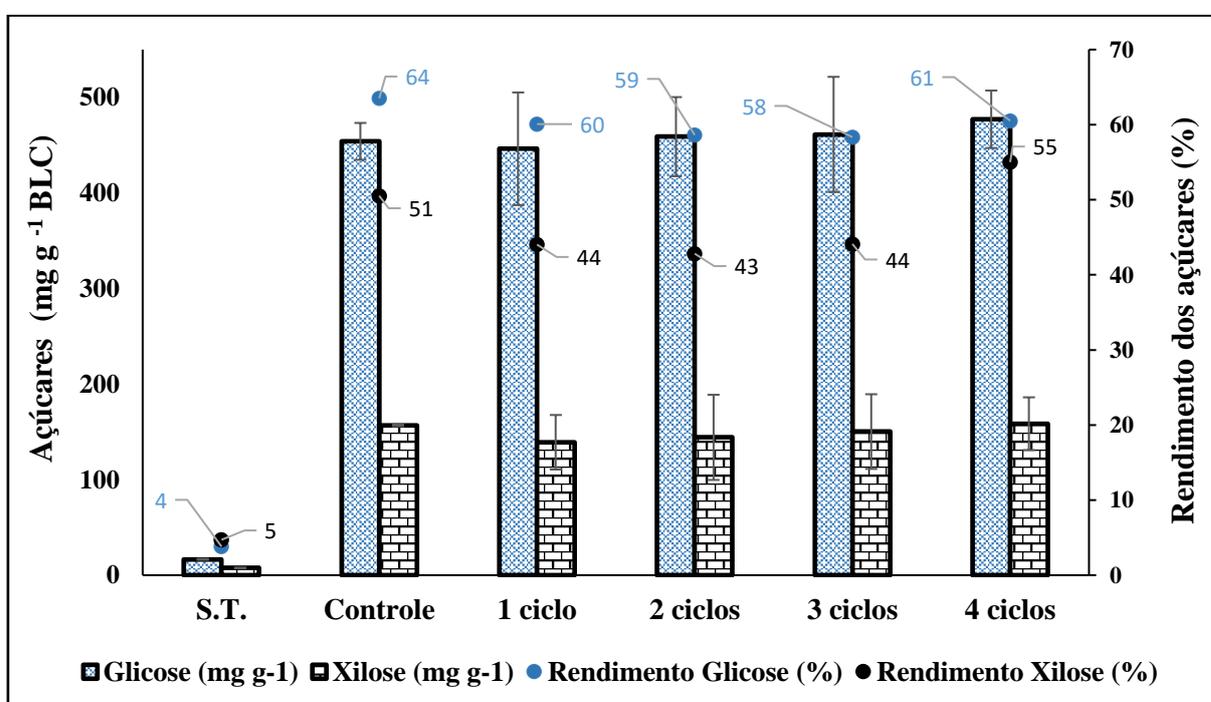
2.4.9 Metodologia a base de ciclos de ozônio

Talvez a desvantagem mais importante do uso de ozônio para tratar BLC está nos custos associados com a geração do gás. Nos últimos anos alguns estudos foram focados em reduzir a

concentração do ozônio, o tempo de tratamento e elucidar os mecanismos de reação de produtos de degradação, assim como os mecanismos de inibição nos processos biológicos para melhorar a eficiência e a relação custo/benefício do processo. Durante a otimização dos parâmetros para os dois processos realizados no presente estudo, foi observado que uma grande parte de ozônio deixava o reator sem interagir com a biomassa, por isto, foi pensado encontrar uma metodologia alternativa que permitiram diminuir a quantidade de ozônio disponibilizado para sua reação com a biomassa, sem perder a eficiência do processo.

Geralmente, durante a ozonólise são empregados tempos de exposição longos que variam entre 30 e 120 minutos, garantindo que toda a biomassa tem sido exposta ao gás. Assim, foi escolhido saturar o reator com ozônio por tempos curtos de exposição, seguido por uma etapa de reação com o gás contido no reator fechado, o processo foi repetido várias vezes e denominado como ciclos. O método proposto foi comparado com o processo de controle (60 minutos de exposição) realizado na etapa anterior deste estudo. Na Figura 11 são apresentados os resultados de açúcares fermentáveis e rendimentos de conversão.

Figura 11. Açúcares liberados e rendimentos de conversão para BLC tratada com ciclos de ozônio

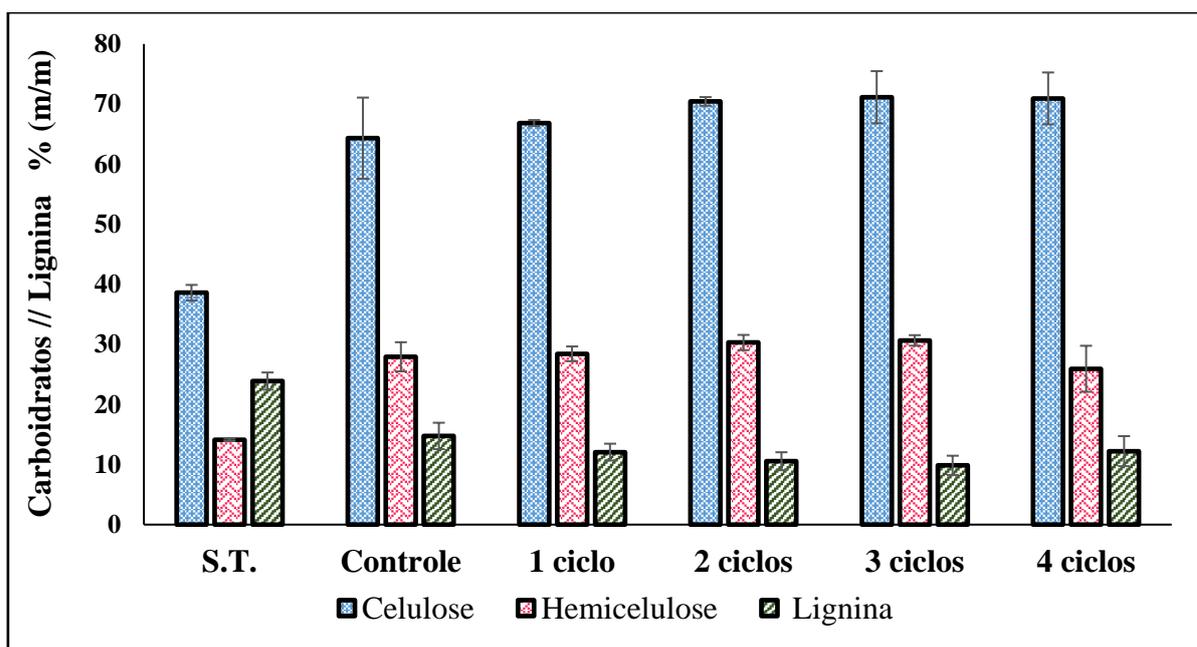


Controle: imersão alcalina com NaOH 0.2 mol L⁻¹, tempo de 8 horas a 80 °C. Ozonólise com 35% de umidade, concentração de ozônio de 0.24 % (m/m) e 60 minuto de exposição. Ciclos: mesmas condições de imersão. Ozonólise com 2 minutos de exposição ao ozônio e 10 minutos de reação.

Fonte: elaborado pela autora

O resultado mais importante é que os dados são muito similares para o tratamento de controle e o tratamento com ciclos, além disso, com só um ciclo são obtidos resultados com pouca variação em comparação com a aplicação de 4 ciclos. O estudo dos três principais componentes não permite observar alterações importantes quando são aplicados 60 minutos ou se é aplicada a metodologia de ciclos (Figura 12).

Figura 12. Caracterização química de biomassa tratada pelo método de controle e por ciclos.



Controle: imersão alcalina com NaOH 0,2 mol L⁻¹, tempo de 8 horas a 80 °C. Ozonólise com 35% de umidade, concentração de ozônio de 0,24 % (m/m) e 60 minutos de exposição. Ciclos: mesmas condições de imersão. Ozonólise com 2 minutos de exposição ao ozônio e 10 minutos de reação.

Fonte: elaborado pela autora

O leve aumento na quantidade de celulose leva a menores rendimentos de conversão para glicose com os ciclos. Com o aumento do número de ciclos é possível ter maior remoção de lignina, embora, os resultados estão muito perto entre eles. O uso dos ciclos não mostra perda nos carboidratos, observação realizada por Schultz et al., (2011a), quando usaram ozonólise com tempos curtos de exposição, evitando a perda dos carboidratos por degradação.

Para o método de controle foram inseridos ao reator 121 mg de ozônio para tratar cada grama de BLC, para o método de ciclos foram adicionados 4 mg de ozônio por cada grama de biomassa, assim, para o experimento com 4 ciclos, um total de 16 mg O₃ g⁻¹ BLC foram necessários, este implica uma diminuição de 87 % na quantidade de ozônio inserido ao reator

em comparação ao método de controle. Os resultados podem estar associados com o uso de um reator rotatório onde é possível ter uma maior e mais homogênea interação entre o sólido e a biomassa e o efeito da imersão alcalina previa à ozonólise que ajuda com a desestruturação e deslignificação do material.

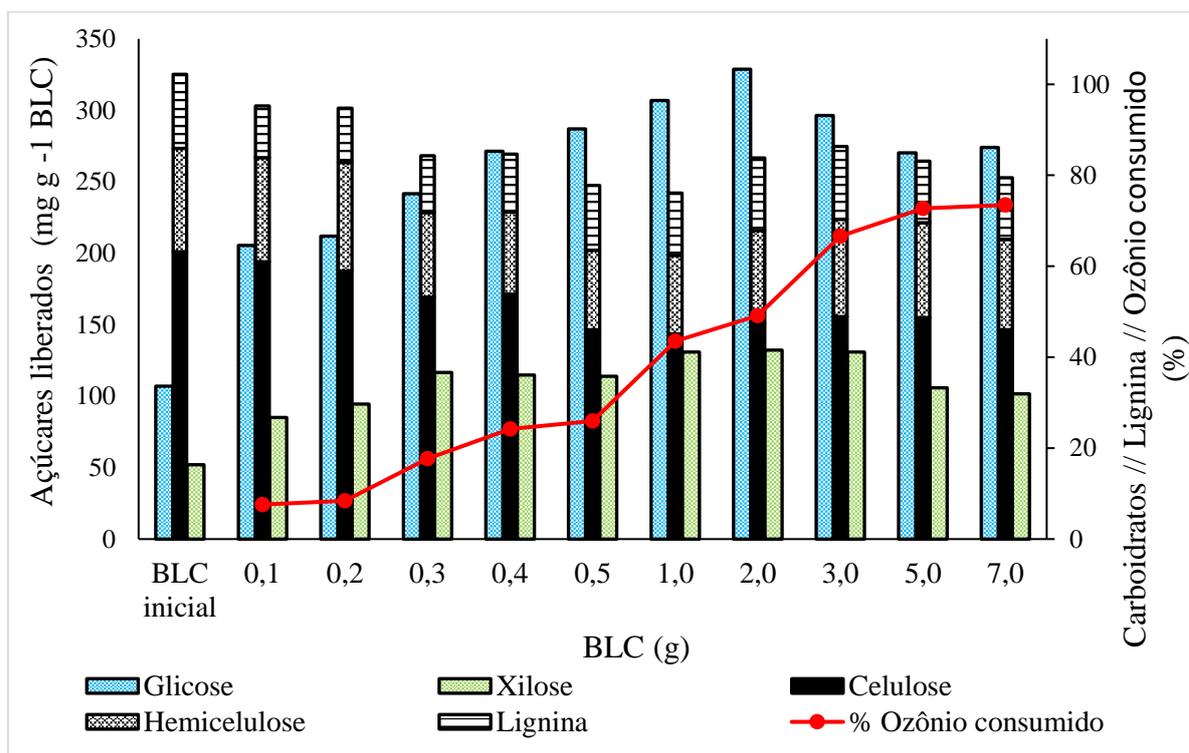
2.4.9.1 Relação entre a quantidade de biomassa tratada e ozônio inserido no reator

Uma primeira relação estudada foi entre a quantidade de BLC tratada e o ozônio, mantendo constante o tempo de exposição a concentração de ozônio e tempo de reação (com o reator fechado) (Figura 13). A quantidade de biomassa foi variada entre 0,1 e 7,0 g e foram inseridos aproximadamente 5,5 mg de ozônio para cada experimento. A análise da quantidade de glicose e xilose liberados mostra um aumento até quando são tratados 2 g de biomassa, a partir deste valor, a quantidade de açúcares liberados começa a diminuir, sendo assim, a quantidade máxima de biomassa que podem ser tratados com 5 mg de ozônio é de 2 gramas, ou seja, uma relação de 0,4 g BLC por mg de ozônio inserido, para obter uma quantidade máxima de 330 e 130 mg g⁻¹ BLC para glicose e xilose, respectivamente.

Para a lignina, quando aumenta a quantidade de BLC, menor remoção é obtida, como era esperado, demonstrando a importante interação entre o ozônio e a lignina. Como consequência da menor remoção é observado menor quantidade de holocelulose disponível com o aumento da massa de palha, os valores de celulose e hemicelulose são quase constantes acima de 0,5 g de material tratado. O máximo rendimento em conversão foi de 63,4 % para glicose com 2 gramas tratadas, entretanto que para a xilose foi atingido 68,2 % quando foi tratada 1 grama de palha.

Em relação ao ozônio consumido (calculado como a relação entre o ozônio inserido e o ozônio quantificado na saída do reator), é possível observar um aumento até quando são tratados 5 g de BLC, com um valor máximo de 73 % de ozônio consumido, esse valor estaria relacionado com a lignina removida, devido que ao aumentar a quantidade de biomassa tem maior lignina disponível para reagir.

Figura 13. Variação na quantidade de BLC tratada pelo método de ciclos.



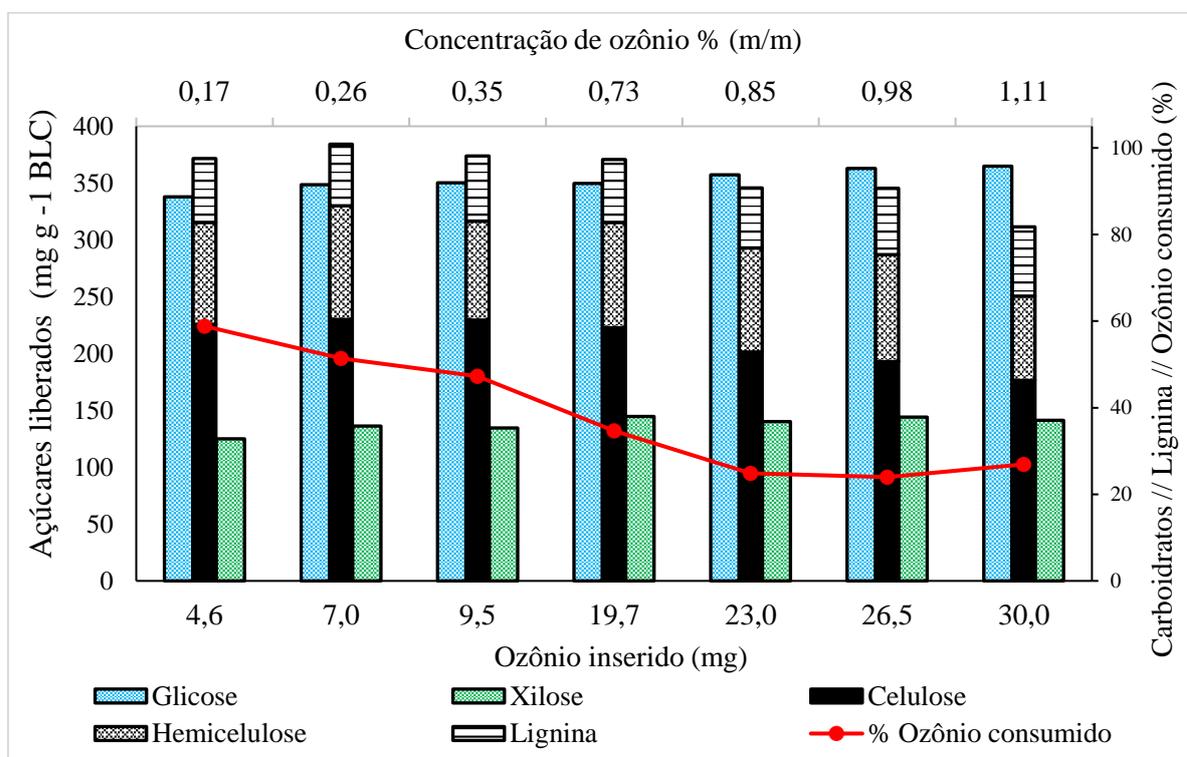
Condições iniciais: BLC pré-tratada com NaOH 0,2 mol L⁻¹ por 8 horas a 80 °C. Ozonólise com 35% de umidade, concentração de 0,24 % (m/m) de ozônio, tempo de exposição de 30 s e tempo de reação de 2 min.

Fonte: elaborado pela autora

2.4.9.2 Variação na quantidade de ozônio inserido ao reator

Mantendo a quantidade de biomassa, o tempo de exposição e de reação constantes, foi modificada a concentração de ozônio entre 0,17 e 1,11 % (m/m), que corresponde a uma faixa de 4,6 até 30 mg de ozônio inserido ao reator (Figura 14). A observação mais importante dos resultados obtidos é o comportamento do ozônio consumido, quando é aumentada sua concentração, menor é a proporção que está sendo consumida, evidenciando que o processo é mais eficiente quando os experimentos são realizados com baixas concentrações de ozônio, se a concentração é aumentada, é observado um aumento na perda de ozônio à saída do reator. Adicionalmente, sob as condições estudadas, o aumento na concentração do ozônio não levou ao aumento importantes na quantidade dos produtos obtidos, glicose e xilose. Esse fenômeno também pode estar influenciado pelo comportamento dos carboídratos, pois a concentrações maiores de ozônio, começa ser observado uma diminuição do conteúdo de celulose, considerando a possibilidade de o ozônio ter iniciado reações de degradação dos carboídratos, sendo mais afetada a celulose (TRAVAINI et al., 2014).

Figura 14. Variação na concentração do ozônio inserido ao reator pelo método de ciclos



Condições iniciais: BLC pré-tratada com NaOH 0.2 mol L⁻¹ por 8 horas a 80 °C. Ozonólise com 35% de umidade, tempo de exposição de 30 s e tempo de reação de 2 min e 2 g de biomassa tratada.

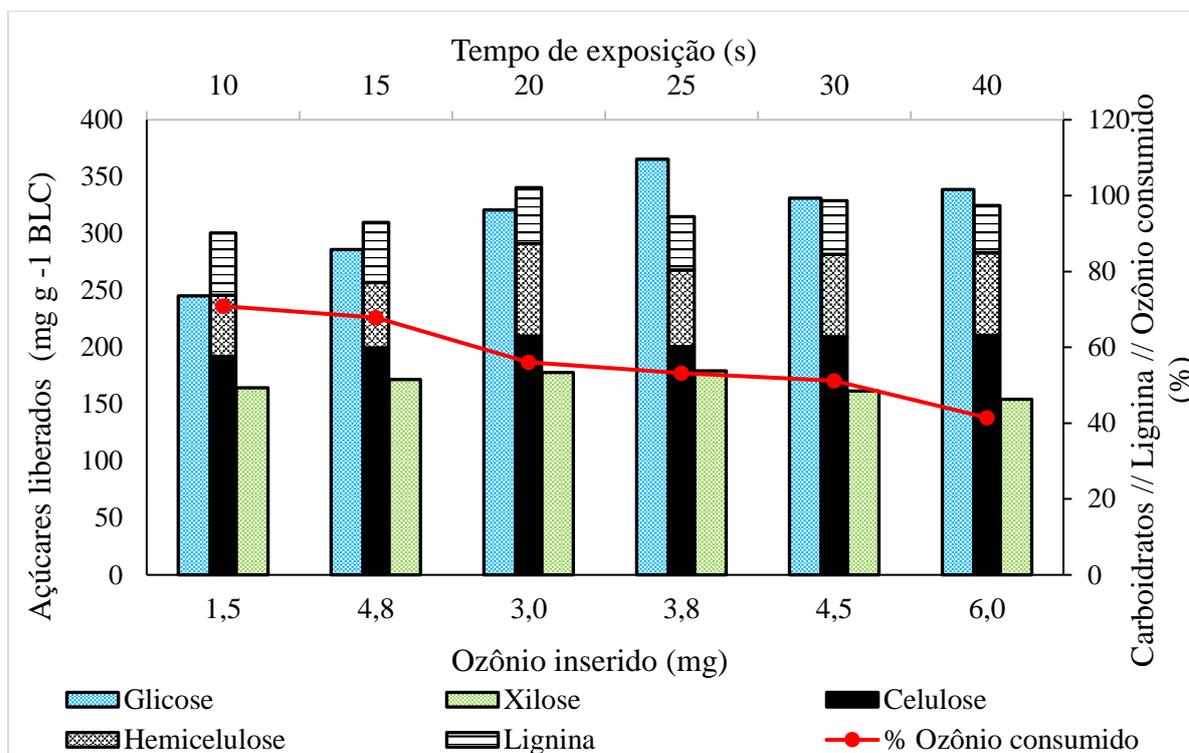
Fonte: elaborado pela autora

Sendo que a quantidade de ozônio inserido pode ser alterada quando é variada sua concentração ou o tempo de exposição da biomassa ao fluxo do gás, essa variável foi estudada entre 10 e 40 segundos, o que equivale a inserir entre 1,83 e 7,33 mg de ozônio (Figura 15). Com relação ao ozônio consumido, é observado uma tendência similar ao caso anterior, quando a quantidade de ozônio disponível é aumentada, menor é a proporção de ozônio consumido durante o processo. Observações similares foram realizadas por Schultz-Jensen et al., (2011b), uma vez que ao aumentar o tempo de ozonólise é obtida uma diminuição no ozônio consumido.

Quando é fornecida baixa quantidade de ozônio, como no caso dos experimentos com tempos de exposição entre 10 e 20 s, é observado menor liberação de açúcares, valores que aumentam se o ozônio é aumentado. A análise de celulose e hemicelulose não mostra variações importantes, o que pode estar acontecendo pela baixa disponibilidade e ozônio. No relacionado

com a lignina, é possível observar a diminuição no seu conteúdo quando tem maior quantidade de gás.

Figura 15. Variação no tempo de exposição da BLC ao ozônio



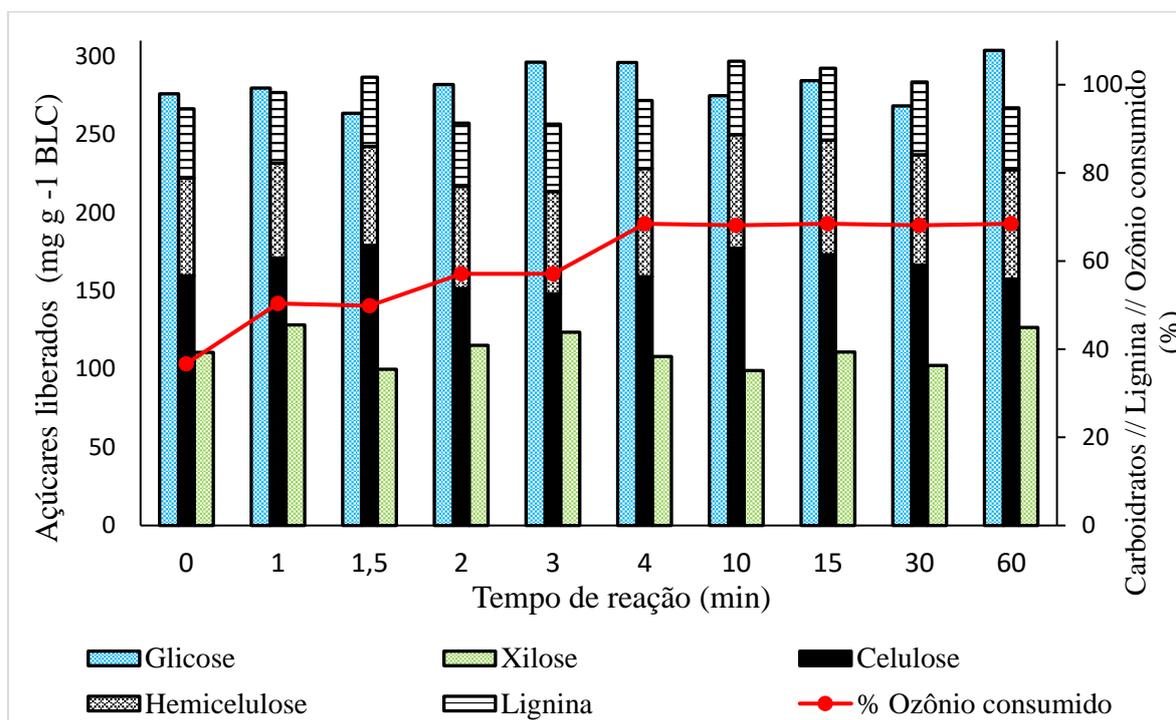
Condições iniciais: BLC pré-tratada com NaOH 0,2 mol L⁻¹ por 8 horas a 80 °C. Ozonólise com 35% de umidade, concentração de ozônio de 0,24 % e tempo de reação de 2 min e 2 g de biomassa tratada.

Fonte: elaborado pela autora

2.4.9.3 Variação no tempo de reação na ozonólise

Uma vez que o tempo de exposição termina e o reator está saturado do gás, o sistema foi fechado com uma determinada quantidade de ozônio no seu interior, assim, foi estudado se teria algum efeito alterar o tempo de contato entre a biomassa e o gás. Os resultados são apresentados na Figura 16 e mostraram que o tempo de reação não é uma variável que leve a alterações importantes no conteúdo dos carboidratos e lignina, o que pode levar a pensar que a reação ocorre em tempos curtos. A quantidade de açúcares liberados também não foi afetada por esse parâmetro. Por outro lado, a porcentagem de ozônio consumido mostra um pequeno aumento a partir de 4 minutos, sendo constante até os 60 minutos estudados.

Figura 16. Variação no tempo de reação da ozonólise.



Condições iniciais: BLC pré-tratada com NaOH 0.2 mol L⁻¹ por 8 horas a 80 °C. Ozonólise com 35% de umidade, concentração de ozônio de 0.24 % e tempo de exposição de 30 s e 2 g de biomassa.

Fonte: elaborado pela autora

2.5. Conclusões

A utilização de reator rotativo para tratamento de ozonólise foi mais eficiente do que de leito fixo, pois há melhor homogeneização da amostra e os processos de transferência de massa são facilitados. Variáveis como tempo de exposição à ozonólise, hidratação da biomassa e uso de diferentes solventes para o tratamento foram exploradas a fim de aumentar ainda mais a eficiência do tratamento com o reator rotativo. Das variáveis relacionadas ao consumo de ozônio, o tempo de ozonólise teve um efeito maior sobre o rendimento de conversão do açúcar do que a concentração de ozônio utilizada. Nas condições brandas estudadas, o meio básico usado na hidratação antes da ozonólise foi o mais eficiente para a palha de cana-de-açúcar. A hidratação com NaOH foi responsável pelas principais alterações na estrutura química do BLC. No entanto, foi com a ozonólise que os maiores rendimentos de conversão de açúcar foram alcançados.

Quando o método por ciclos foi estudado, observou-se que baixas concentrações de ozônio e tempos de reação curtos são tão eficientes quanto as maiores concentrações de ozônio

e tempos de reação usualmente empregados atualmente no pré-tratamento de ozonólise de biomassa. Essa observação está relacionada ao uso do reator rotativo, que otimiza o contato com o ozônio, exigindo menos concentração e tempo de reação. Os resultados indicam que a ozonólise pode ser um processo viável para o tratamento de biomassa, uma vez que a exposição e os tempos de reação curtos possibilitam a competitividade econômica por meio desse processo. Além disso, a combinação do pré-tratamento alcalino com a ozonólise não resultou em maiores concentrações de compostos inibidores da fermentação, tornando a etapa de fermentação viável.

REFERÊNCIAS

- A. SLUITER, R. RUIZ, C. SCARLATA, J. SLUITER, A.; TEMPLETON, D. Determination of Extractives in Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP); Issue Date 7/17/2005 - 42619.pdf. Technical Report NREL/TP-510-42619, [s. l.], n. January, p. 1–9, 2008. Disponível em: <<http://www.nrel.gov/biomass/pdfs/42619.pdf>>
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WATER ENVIRONMENTAL FEDERATION. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Washington DC.
- BAIG, K. S.; WU, J.; TURCOTTE, G.; DOAN, H. D. Novel ozonation technique to delignify wheat straw for biofuel production. *Energy and Environment*, [s. l.], v. 26, n. 3, p. 303–318, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1260/0958-305X.26.3.303>>
- BALI, G.; MENG, X.; DENEFF, J. I.; SUN, Q.; RAGAUSKAS, A. J. The effect of alkaline pretreatment methods on cellulose structure and accessibility. *ChemSusChem*, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 275–279, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/cssc.201402752>>
- BELTRÁN, F. J. *Ozone Reaction Kinetics for Water and Wastewater Systems*. [s.l.] : Lewis Publishers, 2005. v. 53
- BENJAMIN, Y.; CHENG, H.; GÖRGENS, J. F. Evaluation of bagasse from different varieties of sugarcane by dilute acid pretreatment and enzymatic hydrolysis. *Industrial Crops and Products*, [s. l.], v. 51, p. 7–18, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.08.067>>
- BENSAH, E. C.; MENSAH, M. Chemical Pretreatment Methods for the Production of Cellulosic Ethanol : Technologies and Innovations. *International Journal of Chemical Engineering*, [s. l.], 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2013/719607>>
- BINDER, A.; PELLONI, L.; FIECHTER, A. Delignification of straw with ozone to enhance biodegradability. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 1–5, 1980. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/BF00514070>>
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, [s. l.], v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976. Disponível em: <

2697(76)90527-3>

BULE, M. V.; GAO, A. H.; HISCOX, B.; CHEN, S. Structural modification of lignin and characterization of pretreated wheat straw by ozonation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, [s. l.], v. 61, n. 16, p. 3916–3925, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/jf4001988>>

CANILHA, L.; CHANDEL, A. K.; SUZANE DOS SANTOS MILESSI, T.; ANTUNES, F. A. F.; LUIZ DA COSTA FREITAS, W.; DAS GRAÇAS ALMEIDA FELIPE, M.; DA SILVA, S. S. Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: An overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, [s. l.], v. 2012, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2012/989572>>

CARRASCO, C.; BAUDEL, H. M.; SENDELIUS, J.; MODIG, T.; ROSLANDER, C.; GALBE, M.; HAHN-HÄGERDAL, B.; ZACCHI, G.; LIDÉN, G. SO₂-catalyzed steam pretreatment and fermentation of enzymatically hydrolyzed sugarcane bagasse. *Enzyme and Microbial Technology*, [s. l.], v. 46, n. 2, p. 64–73, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.10.016>>

CARVALHO, D. M. De; QUEIROZ, J. H. De; COLODETTE, J. L. Assessment of alkaline pretreatment for the production of bioethanol from eucalyptus, sugarcane bagasse and sugarcane straw. *Industrial Crops and Products*, [s. l.], v. 94, p. 932–941, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.09.069>>

CHANDEL, A. K.; DA SILVA, S. S.; SINGH, O. V. Detoxification of lignocellulosic hydrolysates for improved bioethanol production. In: M.A., Dos S. B. (Ed.). *Biofuel production-recent developments and prospects*. Shanghai: INTECH Open Accesss Publisher, 2011. p. 225–246.

COCA, M.; GONZÁLEZ-BENITO, G.; GARCÍA-CUBERO, M. T. Chemical Oxidation With Ozone as an Efficient Pretreatment of Lignocellulosic Materials. In: *Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery*. [s.l: s.n.]. p. 409–429.

DA COSTA NOGUEIRA, C.; DE ARAÚJO PADILHA, C. E.; DE JESUS, A. A.; DE SANTANA SOUZA, D. F.; DE ASSIS, C. F.; DE SOUSA JUNIOR, F. C.; DOS SANTOS, E. S. Pressurized pretreatment and simultaneous saccharification and fermentation with in situ detoxification to increase bioethanol production from green coconut fibers. *Industrial Crops and Products*, [s. l.], v. 130, p. 259–266, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.12.091>>

DA SILVA DELABONA, P.; LIMA, D. J.; ROBL, D.; RABELO, S. C.; FARINAS, C. S.; DA CRUZ PRADELLA, J. G. Enhanced cellulase production by *Trichoderma harzianum* by cultivation on glycerol followed by induction on cellulosic substrates. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, [s. l.], v. 43, n. 5, p. 617–626, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10295-016-1744-8>>

DOS SANTOS, A. B.; BOTTCHEER, A.; VICENTINI, R.; SAMPAIO MAYER, J. L.; KIYOTA, E.; LANDELL, M. A. G.; CRESTE, S.; MAZZAFERA, P. Lignin biosynthesis in sugarcane is affected by low temperature. *Environmental and Experimental Botany*, [s. l.], v.

120, p. 31–42, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.08.001>>

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

FERNÁNDEZ-DELGADO, M.; PLAZA, P. E.; COCA, M.; GARCÍA-CUBERO, M. T.; GONZÁLEZ-BENITO, G.; LUCAS, S. Comparison of mild alkaline and oxidative pretreatment methods for biobutanol production from brewer's spent grains. *Industrial Crops and Products*, [s. l.], v. 130, p. 409–419, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.12.087>>

GARCÍA-CUBERO, M. T.; GONZÁLEZ-BENITO, G.; INDACOECHEA, I.; COCA, M.; BOLADO-RODRÍGUEZ, S. Effect of ozonolysis pretreatment on enzymatic digestibility of wheat and rye straw. *Bioresource Technology*, [s. l.], v. 100, n. 4, p. 1608–1613, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2008.09.012>>

GHOSE, T. K. Measurement of Cellulase Activities. *Pure and Applied Chemistry*, [s. l.], v. 59, n. 2, p. 257–268, 1987. Disponível em: <<http://www.iupac.org/publications/pac/1987/pdf/5902x0257.pdf>>

GUPTA, R.; LEE, Y. Y. Pretreatment of corn stover and hybrid poplar by sodium hydroxide and hydrogen peroxide. *Biotechnology Progress*, [s. l.], v. 26, n. 4, p. 1180–1186, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/btpr.405>>

HATFIELD, R.; FUKUSHIMA, R. S. Can lignin be accurately measured? *Crop Science*, [s. l.], v. 45, n. 3, p. 832–839, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.2135/cropsci2004.0238>>

HUANG, S.; LIU, T.; PENG, B.; GENG, A. Enhanced ethanol production from industrial lignocellulose hydrolysates by a hydrolysate-cofermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, [s. l.], v. 42, n. 5, p. 883–896, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00449-019-02090-0>>

JONSSON, L. J.; ALRIKSSON, B.; NILVEBRANT, N. O. Bioconversion of lignocellulose: Inhibitors and detoxification. *Biotechnology for Biofuels*, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 1–10, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-16>>

JÖNSSON, L. J.; MARTÍN, C. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource Technology*, [s. l.], v. 199, p. 103–112, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.009>>

JUTAKANOKKE, R.; TOLIENG, V.; TANASUPAWAT, S.; AKARACHARANYA, A. Ethanol Production from Sugarcane Leaves by *Kluyveromyces marxianus* S1.17, a Genome-Shuffling Mediated Transformant. *BioResources*, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 1636–1646, 2017.

KHUONG, L. D.; KONDO, R.; DE LEON, R.; KIM ANH, T.; SHIMIZU, K.; KAMEI, I. Bioethanol production from alkaline-pretreated sugarcane bagasse by consolidated bioprocessing using *Phlebia* sp. MG-60. *International Biodeterioration and Biodegradation*, [s. l.], v. 88, p. 62–68, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.12.008>>

KRISHNAN, C.; DA COSTA SOUSA, L.; JIN, M.; CHANG, L.; DALE, B. E.; BALAN, V. Alkali-based AFEX pretreatment for the conversion of sugarcane bagasse and cane leaf residues to ethanol. *Biotechnology and Bioengineering*, [s. l.], v. 107, n. 3, p. 441–450, 2010.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/bit.22824>>

LARA-FLORES, A. A.; ARAÚJO, R. G.; RODRÍGUEZ-JASSO, R. M.; AGUEDO, M.; AGUILAR, C. N.; TRAJANO, H. L.; RUIZ, H. A. Bioeconomy and Biorefinery: Valorization of Hemicellulose from Lignocellulosic Biomass and Potential Use of Avocado Residues as a Promising Resource of Bioproducts. *Energy, Environment, and Sustainability*, [s. l.], p. 141–170, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-981-10-7431-8_8>

LI, C.; WANG, L.; CHEN, Z.; LI, Y.; WANG, R.; CAI, G.; LI, Y.; YU, Q.; LU, J. Ozonolysis Pretreatment of Maize Stover: the Interactive Effect of Sample Particle Size and Moisture on Ozonolysis Process. *Bioresource Technology*, [s. l.], v. 183, p. 240–247, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.042>>

LI, Y. C.; GOU, Z. X.; ZHANG, Y.; XIA, Z. Y.; TANG, Y. Q.; KIDA, K. Inhibitor tolerance of a recombinant flocculating industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain during glucose and xylose co-fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*, [s. l.], v. 48, n. 4, p. 791–800, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.11.011>>

LIN, S. Y.; DENCE, C. W. *Methods in Lignin Chemistry*. Berlin: Springer-Verlag, 1992.

LÓPEZ-LINARES, J. C.; GARCÍA-CUBERO, M. T.; LUCAS, S.; GONZÁLEZ-BENITO, G.; COCA, M. Microwave assisted hydrothermal as greener pretreatment of brewer's spent grains for biobutanol production. *Chemical Engineering Journal*, [s. l.], p. 1045–1055, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.03.032>>

LU, X. Components Analysis of Recycled Alkali Black Liquor Combined with Corn Straw under Ozone Pretreatment. *Bioenergy Research*, [s. l.], p. 1–19, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12155-021-10354-5>>

MARTÍN, C.; GALBE, M.; NILVEBRANT, N. O.; JÖNSSON, L. J. Comparison of the fermentability of enzymatic hydrolyzates of sugarcane bagasse pretreated by steam explosion using different impregnating agents. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*, [s. l.], v. 98–100, p. 699–716, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-1-4612-0119-9_57>

MARTÍN, C.; KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B. Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. *Enzyme and Microbial Technology*, [s. l.], v. 40, n. 3, p. 426–432, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.07.015>>

MOODLEY, P.; GUEGUIM KANA, E. B. Development of a steam or microwave-assisted sequential salt-alkali pretreatment for lignocellulosic waste: Effect on delignification and enzymatic hydrolysis. *Energy Conversion and Management*, [s. l.], v. 148, p. 801–808, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.enconman.2017.06.056>>

MORENO, A. D.; CARBONE, A.; PAVONE, R.; OLSSON, L.; GEIJER, C. Evolutionary engineered *Candida intermedia* exhibits improved xylose utilization and robustness to lignocellulose-derived inhibitors and ethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, [s. l.], v. 103, n. 3, p. 1405–1416, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00253-018-9528-x>>

MURLIDHAR SONKAR, R.; SAVATA GADE, P.; BOKADE, V.; MUDLIAR, S. N.;

BHATT, P. Ozone assisted autohydrolysis of wheat bran enhances xylooligosaccharide production with low generation of inhibitor compounds: A comparative study. *Bioresource Technology*, [s. l.], v. 338, n. May, p. 125559, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125559>>

MURRAY, R. W. The Mechanism of Ozonolysis. *Accounts of Chemical Research*, [s. l.], v. 1, n. 10, p. 313–320, 1968. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/ar50010a004>>

MUSSATTO, S. I. *Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery*. [s.l.] : Elsevier, 2016.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: A review. *Bioresource Technology*, [s. l.], v. 93, n. 1, p. 1–10, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.10.005>>

NASCIMENTO, R. F.; MARQUES, J. C.; LIMA NETO, B. S.; DE KEUKELEIRE, D.; FRANCO, D. W. Qualitative and quantitative high-performance liquid chromatographic analysis of aldehydes in Brazilian sugar cane spirits and other distilled alcoholic beverages. *Journal of Chromatography A*, [s. l.], v. 782, n. 1, p. 13–23, 1997. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)00425-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)00425-1)>

OLKKONEN, C.; TYLLI, H.; FORSSKÅHL, I.; FUHRMANN, A.; HAUSALO, T.; TAMMINEN, T.; HORTLING, B.; JANSON, J. Degradation of model compounds for cellulose and ligno-cellulosic pulp during ozonation in aqueous solution. *Holzforschung*, [s. l.], v. 54, n. 4, p. 397–406, 2000. Disponível em: <<https://doi.org/10.1515/HF.2000.067>>

PANNEERSELVAM, A.; SHARMA-SHIVAPPA, R. R.; KOLAR, P.; RANNEY, T.; PERETTI, S. Potential of ozonolysis as a pretreatment for energy grasses. *Bioresource Technology*, [s. l.], v. 148, p. 242–248, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.129>>

PARAWIRA, W.; TEKERE, M. Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production : review. *Critical reviews in biotechnology*, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 20–31, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.3109/07388551003757816>>

PENG, F.; REN, J. L.; XU, F.; BIAN, J.; PENG, P.; SUN, R. C. Comparative study of hemicelluloses obtained by graded ethanol precipitation from sugarcane bagasse. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, [s. l.], v. 57, n. 14, p. 6305–6317, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/jf900986b>>

PEREIRA, S. C.; MAEHARA, L.; MACHADO, C. M. M.; FARINAS, C. S. 2G ethanol from the whole sugarcane lignocellulosic biomass. *Biotechnology for Biofuels*, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1–16, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13068-015-0224-0>>

PERRONE, O. M.; ROSSI, J. S.; DE SOUZA MARIA MARCIA, M.; CARREIRA, C.; BORDIGNON, S. E.; GOMES, E.; DA-SILVA, R.; BOSCOLO, M. Influence of ozonolysis time during sugarcane pretreatment : Effects on the fiber and enzymatic saccharification. *Bioresource Technology*, [s. l.], v. 224, p. 733–737, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.043>>

- PLAZA, P. E.; GALLEGO-MORALES, L. J.; PEÑUELA-VÁSQUEZ, M.; LUCAS, S.; GARCÍA-CUBERO, M. T.; COCA, M. Biobutanol production from brewer's spent grain hydrolysates by *Clostridium beijerinckii*. *Bioresource Technology*, [s. l.], v. 244, n. July, p. 166–174, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.139>>
- ROBERTO, D.; LIMA, S.; GOMES, A.; PARANHOS, D. O.; FERNANDO, O.; ADARME, H.; SILVA, S. D. Q.; AQUINO, S. F. De. Integrated production of second-generation ethanol and biogas from sugarcane bagasse pretreated with ozone. *Biomass Conversion and Biorefinery*, [s. l.], 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13399-020-01234-7>>
- ROQUE, L. R.; MORGADO, G. P.; NASCIMENTO, V. M.; IENCZAK, J. L.; RABELO, S. C. Liquid-liquid extraction : A promising alternative for inhibitors removing of pentoses fermentation. *Fuel*, [s. l.], v. 242, n. December 2018, p. 775–787, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.12.130>>
- SANTOS, F. a; QUEIRÓZ, J. H. De; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. a; GUIMARÃES, V. M. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. *Quimica nova*, [s. l.], v. 35, n. 5, p. 1004–1010, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000500025>>
- SCHULTZ-JENSEN, N.; KÁDÁR, Z.; THOMSEN, A. B.; BINDSLEV, H.; LEIPOLD, F. Plasma-assisted pretreatment of wheat straw for ethanol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, [s. l.], v. 165, n. 3–4, p. 1010–1023, 2011. a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12010-011-9316-x>>
- SCHULTZ-JENSEN, N.; LEIPOLD, F.; BINDSLEV, H.; THOMSEN, A. B. Plasma-assisted pretreatment of wheat straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, [s. l.], v. 163, n. 4, p. 558–572, 2011. b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12010-010-9062-5>>
- SHERPA, K. C.; GHANGREKAR, M. M.; BANERJEE, R. A green and sustainable approach on statistical optimization of laccase mediated delignification of sugarcane tops for enhanced saccharification. *Journal of Environmental Management*, [s. l.], v. 217, p. 700–709, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.04.008>>
- SHI, F.; XIANG, H.; LI, Y. Combined pretreatment using ozonolysis and ball milling to improve enzymatic saccharification of corn straw. *Bioresource Technology*, [s. l.], v. 179, p. 444–451, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.063>>
- SILVERSTEIN, R. A.; CHEN, Y.; SHARMA-SHIVAPPA, R. R.; BOYETTE, M. D.; OSBORNE, J. A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. *Bioresource Technology*, [s. l.], v. 98, n. 16, p. 3000–3011, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.10.022>>
- SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, [s. l.], v. 299, n. 1974, p. 152–178, 1999. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)>
- SIXTA, H.; POTTHAST, A.; KROTSCHKEK, A. W. Chemical Pulping Processes. In: *Handbook of Pulp*. volume 1 ed. [s.l.] : Wiley-VCH, 2006. p. 109–510.
- SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.;

- CROCKER, D. NREL/TP-510-42618 analytical procedure - Determination of structural carbohydrates and lignin in Biomass. Laboratory Analytical Procedure (LAP), [s. l.], n. April 2008, p. 17, 2012. Disponível em: <<http://www.nrel.gov/docs/gen/fy13/42618.pdf>>
- SLUITER, A.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. Determination of Ash in Biomass Laboratory Analytical Procedure (LAP) Issue Date: 7/17/2005. National Renewable Energy Laboratory (NREL), [s. l.], n. January, p. 12, 2005.
- SUGIMOTO, T.; MAGARA, K.; HOSOYA, S.; OOSAWA, S.; SHIMODA, T.; NISHIBORI, K. Ozone pretreatment of lignocellulosic materials for ethanol production: Improvement of enzymatic susceptibility of softwood. *Holzforschung*, [s. l.], v. 63, n. 5, p. 537–543, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1515/HF.2009.091>>
- SUN, R. C.; LAWATHER, J. M.; BANKS, W. B. Effects of pretreatment temperature and alkali concentration on the composition of alkali-soluble lignins from wheat straw. *Journal of Applied Polymer Science*, [s. l.], v. 62, n. 9, p. 1473–1481, 1996. Disponível em: <[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(19961128\)62:9%3C1473::AID-APP17%3E3.0.CO;2-%23](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19961128)62:9%3C1473::AID-APP17%3E3.0.CO;2-%23)>
- SUN, Y.; LIN, L.; DENG, H.; LI, J.; HE, B.; SUN, R.; OUYANG, P. Structural Changes of Bamboo Cellulose in Formic Acid. *BioResources.*, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 297–315, 2008.
- TAN, M.; MA, L.; SAIF, M.; REHMAN, U.; AHMED, M. A.; SAJID, M.; XU, X.; SUN, Y.; CUI, P.; XU, J. Screening of acidic and alkaline pretreatments for walnut shell and corn stover biorefining using two way heterogeneity evaluation. *Renewable Energy*, [s. l.], v. 132, p. 950–958, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.07.131>>
- TERÁN-HILARES, R.; RESÉNDIZ, A. L.; MARTÍNEZ, R. T.; SILVA, S. S.; SANTOS, J. C. Successive pretreatment and enzymatic saccharification of sugarcane bagasse in a packed bed flow-through column reactor aiming to support biorefineries. *Bioresource Technology*, [s. l.], v. 203, p. 42–49, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.026>>
- TOQUERO, C.; BOLADO, S. Effect of four pretreatments on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of wheat straw. Influence of inhibitors and washing. *Bioresource Technology*, [s. l.], v. 157, p. 68–76, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.090>>
- TRAVAINI, R.; BARRADO, E.; BOLADO-RODRÍGUEZ, S. Effect of ozonolysis pretreatment parameters on the sugar release, ozone consumption and ethanol production from sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, [s. l.], v. 214, p. 150–158, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.102>>
- TRAVAINI, R.; MARANGON-JARDIM, C.; COLODETTE, J. L.; MORALES-OTERO, M.; BOLADO-RODRÍGUEZ, S. Ozonolysis. In: *Pretreatment of Biomass: Processes and Technologies*. [s.l: s.n.]. p. 105–135.
- TRAVAINI, R.; OTERO, M. D. M.; COCA, M.; DA-SILVA, R.; BOLADO, S. Sugarcane bagasse ozonolysis pretreatment: Effect on enzymatic digestibility and inhibitory compound formation. *Bioresource Technology*, [s. l.], v. 133, p. 332–339, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.133>>
- VIDAL, P. F.; MOLINIER, J. Ozonolysis of lignin - Improvement of in vitro digestibility of

poplar sawdust. *Biomass*, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 1–17, 1988. Disponível em:
<[https://doi.org/10.1016/0144-4565\(88\)90012-1](https://doi.org/10.1016/0144-4565(88)90012-1)>

WANG, L.; HAN, G.; ZHANG, Y. Comparative study of composition, structure and properties of *Apocynum venetum* fibers under different pretreatments. *Carbohydrate Polymers*, [s. l.], v. 69, n. 2, p. 391–397, 2007. Disponível em:
<<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.12.028>>

WANG, W.; ZHANG, C.; TONG, S.; CUI, Z.; LIU, P. Enhanced Enzymatic Hydrolysis and Structural Features of Corn Stover by NaOH and Ozone Combined Pretreatment. *molecules*, [s. l.], v. 23, n. 6, p. 1300, 2018. Disponível em:
<<https://doi.org/10.3390/molecules23061300>>

WEN, J. L.; XIAO, L. P.; SUN, Y. C.; SUN, S. N.; XU, F.; SUN, R. C.; ZHANG, X. L. Comparative study of alkali-soluble hemicelluloses isolated from bamboo (*Bambusa rigida*). *Carbohydrate Research*, [s. l.], v. 346, n. 1, p. 111–120, 2011. Disponível em:
<<https://doi.org/10.1016/j.carres.2010.10.006>>

XU, H.; LI, B.; MU, X. Review of Alkali-Based Pretreatment to Enhance Enzymatic Saccharification for Lignocellulosic Biomass Conversion. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, [s. l.], v. 55, n. 32, p. 8691–8705, 2016. Disponível em:
<<https://doi.org/10.1021/acs.iecr.6b01907>>

XU, J. K.; SUN, R. C. Recent Advances in Alkaline Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. In: *Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery*. [s.l: s.n.]. p. 431–459.

YUAN, Z.; WEN, Y.; LI, G. Production of bioethanol and value added compounds from wheat straw through combined alkaline/alkaline-peroxide pretreatment. *Bioresource Technology*, [s. l.], v. 259, p. 228–236, 2018. Disponível em:
<<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.03.044>>

ZHAO, Z.; ZHANG, J. Effects and Mechanisms of Alkali Recycling and Ozone Recycling on Enzymatic Conversion in Alkali Combined with Ozone Pretreatment of Corn Stover. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, [s. l.], v. 193, p. 281–295, 2020. Disponível em:
<<https://doi.org/10.1007/s12010-020-03425-4>>

**3. CAPÍTULO 2: PRÉ-TRATAMENTO EMPREGANDO SOLVENTES EUTÉTICOS
(DES) E OZONÓLISE**

3.1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas a demanda de tecnologias limpas, fontes renováveis e processo ecológicos têm aumentado, assim, as pesquisas estão focadas em aplicar os conceitos da química verde, além que os etapas e produtos sejam acordes aos princípios. Uma das linhas de pesquisa é a transformação de biomassa lignocelulósica (BLC) em combustíveis e compostos químicos de valor agregado. A BLC inclui uma ampla faixa de resíduos *post* colheita, de diferentes culturas, assim como resíduos sólidos de alguns processos produtivos. Apesar que a BLC representa uma definitiva fonte de matéria prima renovável de baixo custo e disponível em elevadas quantidades, seu futuro depende de encontrar tecnologias economicamente viáveis para sua transformação em produtos químicos (MAMILLA et al., 2019).

A possibilidade de tratar a BLC com solventes verdes tem surgido como um processo promissor, as características que deve ter o solvente são, disponível em grandes quantidades, de baixo custo, de fontes renováveis, baixa toxicidade, biodegradável, com estabilidade térmica e de fácil armazenamento. Os solventes eutéticos (DES) chamados assim por ter pontos de fusão menores aos reagentes de partida, possuem tais características, eles são sintetizados pela combinação de dois ou três constituintes, um deles deve ter a capacidade para doar ligações de hidrogênio (HBD) e outro para aceitar ligações de hidrogênio (HBA). A deslocalização da carga gerada pela formação de ligações de hidrogênio e a força destas ligações tem como resultado solventes com menor ponto de fusão (WANG; LEE, 2021).

Alguns pesquisadores têm classificado os DES como solventes verdes, por suas características promissoras na tentativa de reduzir ou eliminar os solventes convencionais. Geralmente, os DES têm alta biocompatibilidade e biodegradabilidade, baixos custos de síntese e matérias primas que podem ser obtidas de fontes renováveis e com baixa toxicidade, entretanto, as pesquisas estão sendo focadas na toxicidade das misturas obtidas (SANTANA-MAYOR et al., 2021). Por suas propriedades, eles estão sendo alvo de pesquisas em processos de extração, técnicas de separação, desenvolvimento de novos materiais, processos biotecnológicos, síntese orgânica, reações de polimerização, nanotecnologia, biologia celular, valorização de biomassa (DEL MONTE et al., 2014; SHISHOV et al., 2017; TANG et al., 2017).

Quando a BLC é tratada com DES, a celulose apresenta menor solubilidade, a conformação pouco ordenada dos DES limita o ganho de entropia, levando pouca solubilidade, situação diferente acontece no caso da dissolução de celulose em solventes do tipo líquidos

iônicos, os quais têm uma estrutura mais ordenada, quando acontece a dissolução, evidencia-se um ganho de entropia (MORAIS et al., 2020). Quanto a hemicelulose e a lignina, suas dissoluções acontecem por reações de hidrólise, com a quebra de ligações éter presente na lignina, e a quebra de ligações éter/éster entre lignina/hemicelulose e lignina/celulose.

Nos últimos anos, tem sido reportadas uma grande quantidade de combinações de HBA e HBD, com potencial uso no pré-tratamento de BLC, cada possível mistura apresenta características e resultados diferentes nas remoções de lignina e recuperação dos carboidratos, têm sido observadas algumas tendências que se repetem para diferentes tipos de BLC ou em condições diferentes do pré-tratamento. O tipo de DES mais adequado e os parâmetros de processo ideais para o pré-tratamento de BLC ainda podem ser alvo de pesquisa. O conhecimento básico das informações importantes da relação estrutura-propriedade-função-efeito do DES e a relação interna detalhada das variáveis de condição de pré-tratamento pode guiar o desenvolvimento futuro do pré-tratamento de biorrefinaria com estes solventes.

No presente estudo, foram preparados DES usando como HBA cloreto de colina e glicerina, como HBD foram escolhidos diferentes compostos de propriedades ácidas, básicas e neutras. Os parâmetros de temperatura, tempo e razão BLC/solvente para o pré-tratamento, foram estudados. Uma vez foram escolhidas as melhores condições, a biomassa foi tratada com ozônio, nas condições relatadas no capítulo 1. Os resultados mostraram quatro combinações com o melhor rendimento na conversão dos açúcares, entretanto, é necessário continuar com as pesquisas, pois, mudanças no teor de água e, na relação HBA/HBD poderiam levar a obter melhores resultados.

3.2. REVISÃO DA LITERATURA

3.2.1 Características gerais dos solventes eutéticos (DES)

Na indústria química, os solventes estão envolvidos em quase todas as etapas dos processos, desde limpeza de equipamentos, fabricação de materiais, revestimentos, adesivos, tratamento de matéria prima e meio de reação. Por isto, a demanda mundial de solventes tem superado as expectativas de crescimento. Em grande quantidade de processos químicos os solventes empregados representam entre 80 e 90 % da massa não aquosa usada para o produto final (ALONSO et al., 2018). Assim, os solventes típicos obtidos a partir do petróleo parece não ter um futuro certo, além das novas tendências mundiais em termos de cuidado do meio

ambiente e a saúde, levam a pesquisar o uso de novos solventes sustentáveis igual de eficientes e com menor impacto ambiental (CARPENTIERI et al., 2021; SANTANA-MAYOR et al., 2021; TAN et al., 2020).

Existem muitas possíveis alternativas de solventes estudados, entre eles apareceram os chamados líquido iônicos, misturas orgânicas formadas por um cátion de amônio (por exemplo, imidazolio ou piridínio) e um ânion de baixa nucleofilicidade. Por suas propriedades, no início eles foram considerados como solventes ideais devido a sua alta estabilidade térmica, baixa inflamabilidade e por suas propriedades físico-químicas que poderiam ser variadas em função da metodologia de síntese. No entanto, surgiram algumas desvantagens como seu alto custo, baixa estabilidade em água, toxicidade, pouca biodegradabilidade e pouca eficiência na sua síntese (ZDANOWICZ; WILPISZEWSKA; SPYCHAJ, 2018).

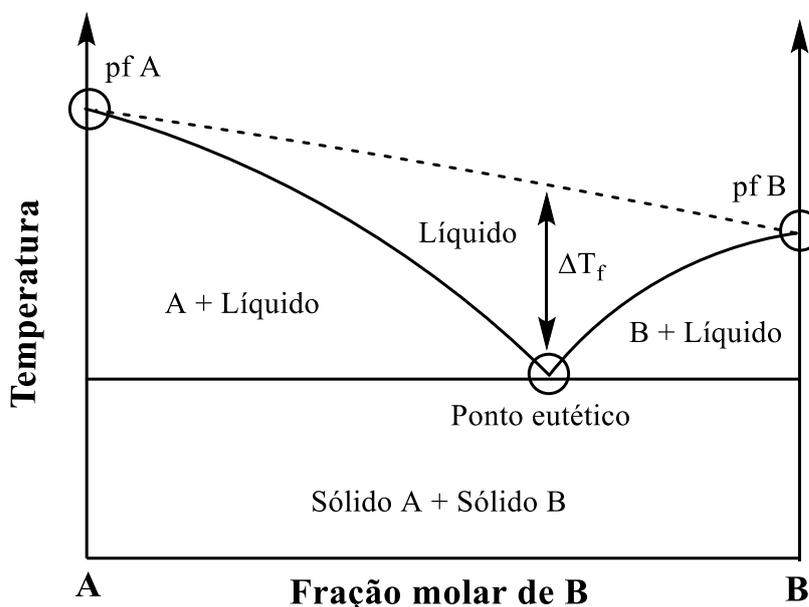
Com princípios similares aos líquidos iônicos surgem as misturas eutéicas de baixo ponto de fusão ou DES, os quais são misturas de ácidos e bases de Lewis ou de Brønsted que contêm espécies aniônicas ou catiônicas de grande tamanho, não são simétricos e tem baixa energia de rede, e, portanto, baixos pontos de fusão. Embora o conceito de DES é diferente aos líquidos iônicos, eles têm propriedades similares como baixas pressões de vapor, natureza dipolar, estabilidade térmica, baixa inflamabilidade, boa condutividade e uma faixa ampla de temperatura em que eles são líquidos, além disso, os DES oferecem a vantagem de ter propriedades físicoquímicas adaptáveis, como o pH, viscosidade, polaridade, densidade, variando os doadores de ligações de hidrogênio (LU; LIU, 2020; TORRES-VALENZUELA; BALLESTEROS-GÓMEZ; RUBIO, 2020).

Geralmente sua síntese é fácil, são obtidos pela complexação de um sal de amônio quaternário com um composto doador de ligações de hidrogênio, os quais estão fortemente associados entre eles por meio de ligação de hidrogênio (PERNA; VITALE; CAPRIATI, 2020; SMITH; ABBOTT; RYDER, 2014). Desde que foram reportados os primeiros DES, a quantidade de novas combinações que têm sido estudadas, vai aumentando ano por ano, tendo uma estimativa de 10^6 possíveis combinações binárias (HANSEN et al., 2020). Existem variadas metodologias de síntese, por aquecimento e agitação, liofilização, evaporação sob vácuo, moagem, entre outras; a metodologia a ser escolhida vai depender da disponibilização de equipamentos e as necessidades do teor de água presente na mistura, porém, o método mais reportado é de aquecimento. Como é dispensável o uso de solventes adicionais durante a síntese,

processos de purificação são desnecessários. Na aparência, os DES são líquidos viscosos, na maioria dos casos são claros, mas tem sido reportado DES com uma cor marrom claro (SMITH; ABBOTT; RYDER, 2014). Entretanto, as metodologias de síntese são simples, os estudos mostram que é necessário focar na caracterização dos DES para comprovar sua formação, análise da densidade, viscosidade, condutividade, podem dar resultados errados sobre a formação da mistura, porém, análises termogravimétricas são necessários para determinar a formação do DES (ISCI; KALTSCHMITT, 2021).

Quando ocorre a formação de uma mistura DES, uma das características mais importantes é a queda no ponto de fusão do DES em comparação com os pontos de fusão para cada um dos constituintes. A diferença no ponto de fusão, ΔT_f , da mistura eutética binária de A e B, em comparação com o valor teórico da mistura está relacionada com a magnitude da interação entre A e B, se a interação é forte, o valor de ΔT_f vai ser maior (Figura 1).

Figura 1. Representação da diferença no ponto de fusão, ΔT_f , entre um DES e os constituintes iniciais.



Fonte: adaptado de (SMITH; ABBOTT; RYDER, 2014)

A formação de um DES é resultado das interações de hidrogênio, entre um composto que é doador de ligação de hidrogênio e um composto que é receptor de ligação de hidrogênio, esta interação faz que a energia de rede seja menor, levando queda no ponto de fusão do DES (FRANCISCO; VAN DEN BRUINHORST; KROON, 2013). As forças das ligações de

hidrogênio, além das interações de Van der Waals e eletrostáticas, podem ser relacionadas com a temperatura do ponto eutético, estabilidade e propriedades do solvente. Em geral, quanto maior forem as forças de interação entre o HBA e HBD, maior será a queda no ponto eutético, por tanto, fatores como a simetria do sal tem efeito nas temperaturas de fusão observadas, com menor simetria, menor ponto de fusão (FRANCISCO; VAN DEN BRUINHORST; KROON, 2013).

Embora, alguns DES não mostram verdadeiros pontos eutéticos (similar ao ponto de fusão), por sua parte, são observadas etapas similares de transições vítreas, observanse rapidamente transições de cristalização e transições vítreas, que vão depender dos constituintes da mistura, além da velocidade de resfriamento, as transições vítreas dos DES são uma característica comum e importante no seu comportamento (HANSEN et al., 2020).

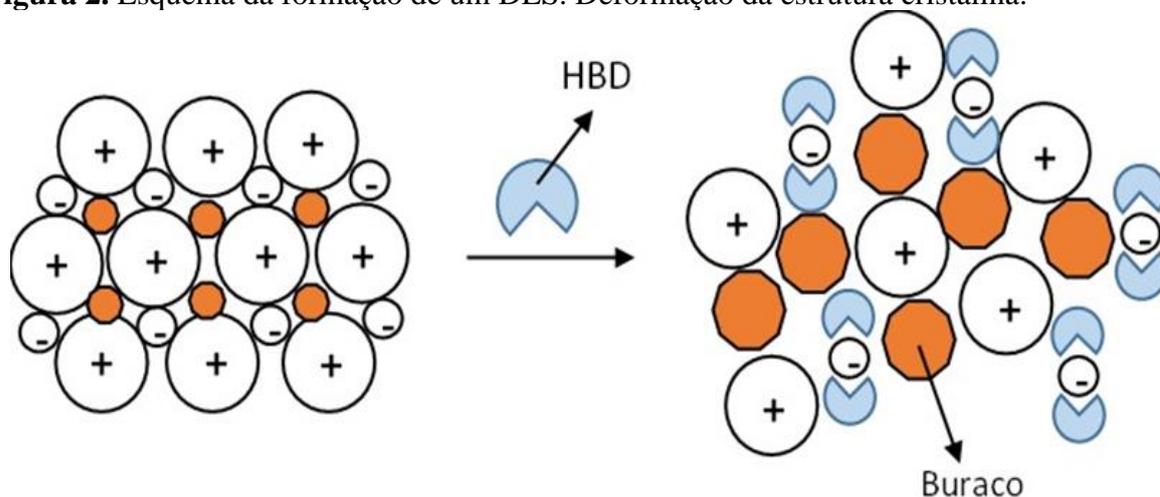
Em geral, a fórmula de um DES pode ser descrita como, $Cat^+ X^- zY$, onde Cat^+ é o cátion principal, sendo os sais quaternários, comunmente, sais de amônia, fosforo, enxofre; X^- pode ser uma base de Lewis, normalmente ânions de haletos; e Y é o ácido de Lewis ou de Brønsted que vai formar o complexo iônico (z representa o número de moléculas de Y que interatuam com X^-) (GUO et al., 2013). Abbott et al., (2003) apresentou pela primeira vez o conceito de DES e os classificou em 4 grupos:

- Tipo I: $Cat^+ X^- z MCl_x$ ($M = Zn, Sn, Fe, Al, Ga, In$). São a combinação de sais orgânicos e sais metálicos anidros. São de elevado custo e tóxicos, com aplicação limitada.
- Tipo II: $Cat^+ X^- z MCl_x \cdot y H_2O$ ($M = Cr, Co, Cu, Ni, Fe$). São uma combinação de sais orgânicos e haletos metálicos hidratados, os quais são mais baratos e geram misturas com baixo ponto eutético.
- Tipo III: $Cat^+ X^- z RZ$ ($Z = -CONH_2, -COOH, -OH$). São mistura de sais orgânicos e compostos que sejam doadores de ligação de hidrogênio, são os mais importantes e mais estudados pela facilidade de síntese e potencial como solventes sustentáveis.
- Tipo IV: $MCl_{x-1}^+ \cdot RZ + MCl_{x+1}$ ($M = Al, Zn$ e $Z = CONH_2, OH$). Combinação de haletos metálicos e ácidos de Lewis ou de Brønsted, que podem conter uma variedade de espécies aniônicas e/ou catiônicas.

Os DES do tipo I, II e III diferenciam se pelo tipo de ácido Lewis/Bronsted usado para complexar-se com a base de Lewis $Cat^+ X^-$, sendo que geralmente X é um haleto com capacidade de ser um aceptor de ligação de hidrogênio.

Dos quatro tipos de DES classificados por Abbot, os DES do tipo III têm sido amplamente estudados e são considerados os mais verdes, os HBD empregados na sua síntese são compostos biodegradáveis e alguns deles são usados na indústria de alimentos. Eles, são geralmente um sal com elevado ponto de fusão como o cloreto de colina (CC), o qual se mistura com um composto que doa ligações de hidrogênio (HBD). A mistura dos HBA e HBD faz que sejam formadas ligações de hidrogênio (e interações de Van der Waals) fazendo com que desloque a carga do ânion do sal, diminuindo a força da interação entre o cátion e o ânion do sal e, por tanto, a energia de rede cristalina. A deformação da estrutura cristalina, além dos buracos que já existem durante a formação das ligações de hidrogênio, leva a uma diminuição do ponto de fusão da mistura (Figura 2) (SMITH; ABBOTT; RYDER, 2014).

Figura 2. Esquema da formação de um DES. Deformação da estrutura cristalina.



Fonte: adaptado de (SMITH; ABBOTT; RYDER, 2014)

Adicionalmente, os buracos na estrutura do DES são muito importantes na explicação nas alterações da viscosidade, devido que quando participam íons pequenos existe maior facilidade de movimento destes íons para os buracos, tendo assim uma viscosidade baixa. No entanto, em temperaturas mais baixas, o tamanho médio dos espaços vazios diminui e com a presença de íons de grande tamanho, é difícil a mobilidade deles para os buracos, aumentando assim a viscosidade (SMITH; ABBOTT; RYDER, 2014).

3.2.2 Uso dos DES em deslignificação de biomassa lignocelulósica

Quanto à aplicabilidade dos DES na valorização de agro-resíduos, os DES tipo III tem sido os mais estudados e com o maior potencial no processamento de biomassa (TORRES-VALENZUELA; BALLESTEROS-GÓMEZ; RUBIO, 2020) devido à sua rapidez e fácil preparação, não reatividade com água, biodegradável natureza e eficácia de custo.

Os primeiros reportes feitos na área de tratamento de BLC estão relacionados com a determinação da solubilidade dos polímeros da biomassa em diferentes misturas de DES. Tem sido estudadas as solubilidades de diferentes tipos de celulose como Avicel PH 105, fibras de algodão, celulose microcristalina e amido, obtendo como resultado valores baixos de solubilidade. Parece que a dissolução da celulose em DES requer alterar as redes de ligação de hidrogênio nas fibras, seguida pela reconstrução de novas redes de ligação de hidrogênio entre as fibras de celulose e os DES. O problema está em que as interações nos DES são mais suscetíveis em comparação com as presentes na celulose (TANG et al., 2017).

Um avanço importante foi feito quando Francisco et al., (2012) encontraram que a lignina apresenta alta solubilidade em DES, especialmente aquelas misturas que tinham ácidos orgânicos. A partir disto, vários estudos começaram a ser realizados experimentando diferentes misturas e condições para conseguir as maiores remoções de lignina da fibra, diminuição da cristalinidade da celulose e obtenção de hidrolisados enriquecidos em açúcares, ou para conseguir fazer extratos de lignina para posteriores processos de biorrefinaria. Em consideração com o tratamento de BLC usando DES, é possível determinar três fatores que afetam a eficiência do processo, as características da biomassa, as propriedades dos DES e as condições do pré-tratamento.

3.2.2.1 Efeito do tipo de biomassa no pré-tratamento como DES

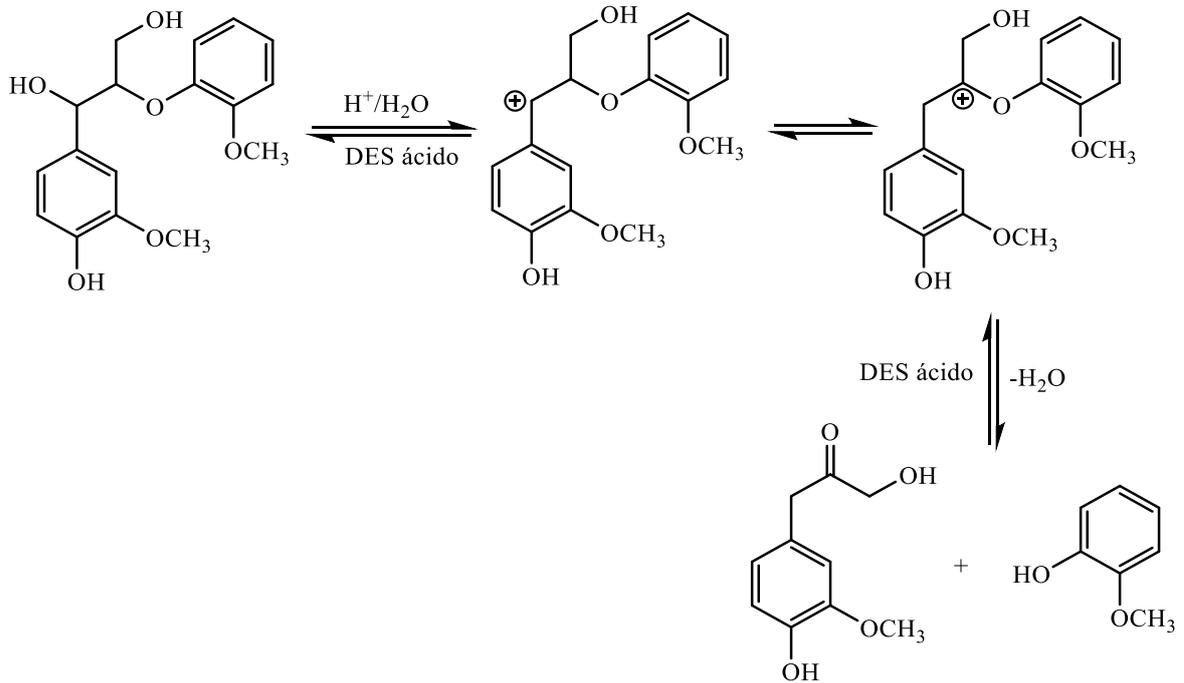
Tem sido estudadas as interações dos DES com os três constituintes principais da BLC, alguns resultados mostram que pode acontecer dissociação entre ligações carbono-carbono e ligações aril-éter, com rompimento da estrutura da lignina (CHEN; RAGAUSKAS; WAN, 2020). Os resultados de dissolução dos três constituintes apresentam variações com dependência do DES empregado (LYNAM; KUMAR; WONG, 2017), mas, em geral com pouca solubilização da celulose, entretanto a lignina apresenta maior solubilidade, enquanto a

hemicelulose é mais solúvel que a celulose, possivelmente relacionado com a presença de cadeias curtas, menor grau de polimerização e sua estrutura ramificada (BHATIA et al., 2020). Adicionalmente, a estrutura dos polímeros tem mudanças e a celulose pode sofrer inchamento, perda do grau polimerização e aumento da área superficial e porosidade da estrutura. Na hemicelulose, tem sido reportado a remoção de xilano pela quebra das ligações C-O-C (XU et al., 2020).

Os estudos de extração de lignina têm demonstrado que existem fortes interações entre os fragmentos de lignina e os DES, sendo isto confirmado por estudos em que são gerados DES a base de fenóis (GUO et al., 2013). Baseados nas propriedades dos DES, tem sido considerado que eles podem fornecer um mecanismo ácido-base fraco que promove a quebra controlada de ligações éter entre unidades de fenil propano, levando à despolimerização da lignina e/ou separação da biomassa (ALVAREZ-VASCO et al., 2016). Estes fragmentos de lignina obtidos por extração com algumas misturas de DES conservam muitas propriedades da lignina nativa. O tratamento com DES a base de ácidos favorece a quebra de ligações éter (β -O-4) em comparação com as ligações C-C, experimentos feitos com modelos de lignina mostram o efeito sob a ligação éter (Esquema 1).

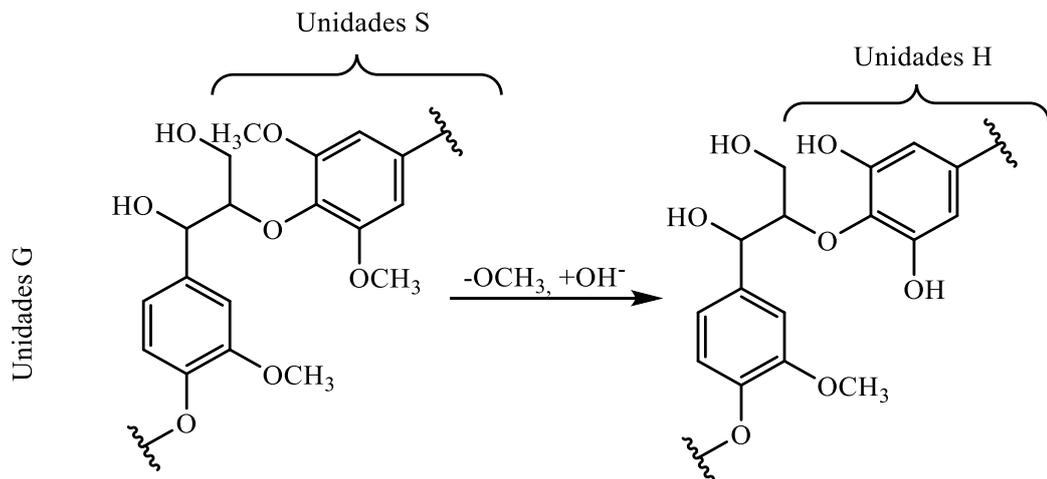
De outro lado, também tem sido observado que os DES ZnCl_2 – Ureia e CC – ZnCl_2 favorecem a clivagem de grupos metoxi (em comparação com as ligações β -O-4) nos anéis aromáticos da lignina (HONG et al., 2016), levando a um aumento nos grupos fenólicos sem apresentar uma perda importante na massa molecular da lignina tratada (Esquema 2).

Esquema 1. Mecanismo proposto para a quebra da ligação éter na lignina usando DES



Fonte: adaptado de (ALVAREZ-VASCO et al., 2016; TANG et al., 2017)

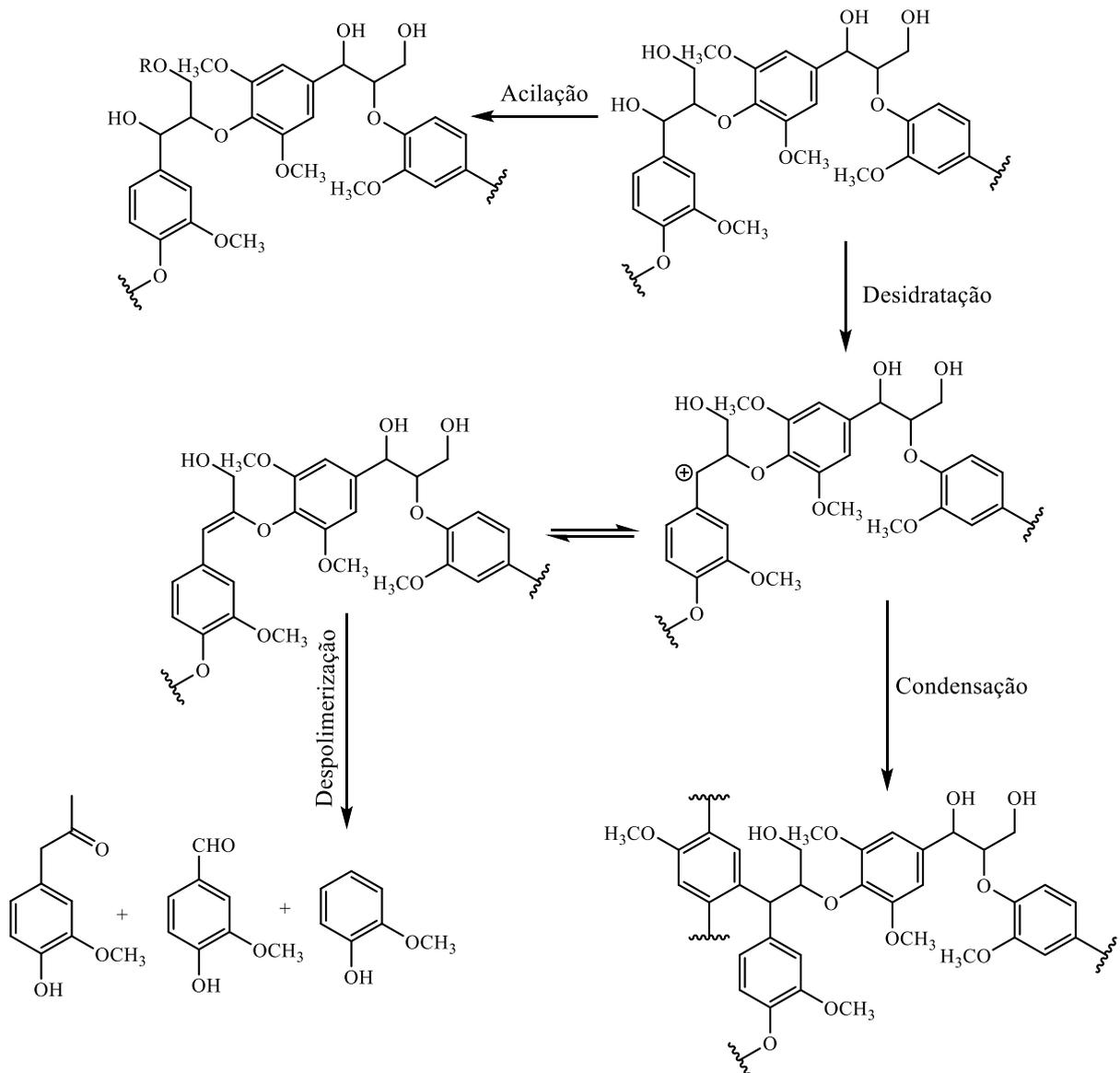
Esquema 2. Mecanismo proposto para a clivagem das ligações metoxi em lignina por efeito do DES baseados em Zn



Fonte: adaptado de Hong et al (2016)

Usando DES de CC e ácido láctico foram analisados os produtos da despolimerização da lignina, os pesquisadores propuseram o rompimento da ligação C-O e C-C, com reações de desidratação, acilação nas cadeias laterais da lignina, além da condensação parcial de lignina (Esquema 3).

Esquema 3. Mecanismo proposto para a despolimerização da lignina



Fonte: adaptado de Shen et al (2020)

O índice de cristalinidade tem um efeito importante na eficiência do pré-tratamento, as mudanças na cristalinidade são relacionadas com a remoção de lignina, degradação dos

polissacarídeos e a quebra das ligações de hidrogênio que estabilizam a estrutura da biomassa (XU et al., 2020).

3.2.2.2 Efeito das características dos DES no tratamento da BLC

Em relação com o efeito dos DES na BLC no tratamento, é possível definir dois tipos, um baseado nas características da mistura, outro com a relação molar de HBD e HBA. No tratamento de BLC tem sido estudado especialmente o CC como HBA, misturado como diferentes tipos de HBD, como ácidos orgânicos mono e polipróticos, bases orgânicas, poliálcoois, amidas, entre outros. Cada DES sintetizado tem propriedades que podem variar, pela força das ligações de hidrogênio, por tanto, ter um efeito sobre o tratamento da BLC (SHEN et al., 2020).

Parâmetros como viscosidade, polaridade, índice de refração, solubilidade, estão relacionados entre si e são dependentes da temperatura. Tem sido observado, que DES com viscosidade maior pode afetar negativamente o processo de transferência de massa no pré-tratamento (SMINK et al., 2019). A densidade, está fortemente relacionada com a mobilidade molecular do solvente e a condutividade descreve a facilidade com que os íons fluem através da solução, tem sido reportado que quanto menor a viscosidade, maior pode ser a condutividade, DES com baixa condutividade e densidade podem ter melhor penetração e mobilidade na biomassa (MAMILLA et al., 2019; REN et al., 2016).

As características químicas dos HBD como comprimento da cadeia de carbonos, polaridade, presença de grupos ácidos, básicos, álcoois, cadeias lineais, aromáticas, cíclicas, entre outras, são propriedades que podem melhorar a eficiência do pré-tratamento (CHEN; RAGAUSKAS; WAN, 2020; XU; LI; MU, 2016). Assim, no caso de HBD ácidos, os monocarboxílicos, como o ácido láctico e levulínico, apresentam melhor eficiência que os ácidos glutárico e málico que são dicarboxílicos. Entretanto, para os ácidos monocarboxílicos 2-cloropropiônico, ácido láctico e ácido glicólico, foi observado que a digestibilidade enzimática diminuiu nessa ordem. No caso dos poliálcoois, a velocidade de deslignificação diminuiu de 1,3-propanodiol, para 1,2-propanodiol e para o etilenoglicol (MENON; RAO, 2012; REN et al., 2016; SMINK et al., 2019; XU et al., 2020). Para os DES básicos, baseados em grupos amino e amida, tem sido observada desprotonação das hidroxilas fenólicas na lignina, embora, sejam necessárias condições de pré-tratamento mais fortes (ONG et al., 2019).

Para a relação molar entre HBA/HBD, existem estudos focados na mistura CC e ácido láctico, pois apresenta bons resultados no pré-tratamento para diferentes tipos de biomassa. Para este DES, a deslignificação foi maior quanto maior foi a razão molar de ácido láctico para CC (ALVAREZ-VASCO et al., 2016; HAZ et al., 2016).

3.2.2.3 Efeito das condições da reação DES-BLC

Geralmente, os estudos concentram-se na otimização do tempo, temperatura e razão DES/BLC. A quantidade de solvente empregado para fazer o pré-tratamento de uma determinada quantidade de amostra, tem sido alvo de numerosos estudos, pois esta relação é determinante na eficiência do processo. Na literatura encontram-se relações sólido:líquido desde 1:5 até 1:32, e tem sido proposto que o aumento na razão leva ao inchamento da biomassa (LIU et al., 2017; PROCENTESE et al., 2015). Uma proporção de líquido sólido muito baixa pode fazer com que as amostras de biomassa não sejam totalmente saturadas pelo DES. Com o incremento da proporção sólido-líquido, tem sido observado que o teor de celulose das amostras de biomassa tratadas com DES aumentou até atingir um valor máximo e depois diminuiu, enquanto a taxa de deslignificação e a taxa de remoção de hemicelulose continuaram aumentando. No entanto, uma proporção sólido-líquido excessivamente alta pode levar à degradação excessiva da biomassa, desperdício de solvente, maior consumo de energia, sistema de recuperação de solvente mais complexo e maior custo de pré-tratamento (ISCI; KALTSCHMITT, 2021; MUSSATTO, 2016; ZDANOWICZ; WILPISZEWSKA; SPYCHAJ, 2018).

Quanto à temperatura tem um efeito negativo na extração dos carboidratos, pois poderia acontecer degradação deles, nas temperaturas altas é observado maior remoção de lignina e hemicelulose, entretanto, a recuperação de celulose e sua conversão vai ter valores baixos. Tipicamente os estudos são realizados na faixa entre 60°C e 200°C. Com condições médias ou brandas, onde os pré-tratamentos são feitos em temperaturas baixas, são geradas poucas quantidades de compostos inibidores, poder ter menores custos no processo, além de ser mais verdes (REN et al., 2016). Em relação com o tempo do pré-tratamento, faixas amplas entre 0.5 horas até 24 horas têm sido estudadas. Nos tempos maiores é observado maior remoção de lignina, aumenta o inchamento da fibra, facilitando o acesso do solvente no interior da biomassa, mas, em condições fortes, com tempos longos, é observado aumento na perda de açúcares, como consequência da degradação dos carboidratos (SHISHOV et al., 2017). Pelo

anterior, é necessário escolher as condições do pré-tratamento que permitam encontrar o balanço entre o consumo de energia e a eficiência do processo.

3.3. METODOLOGIA

3.3.1 Preparação da biomassa

Foi realizado o mesmo procedimento descrito na seção 3.1 do capítulo 1.

3.3.2 Síntese dos DES

Os reagentes empregados na síntese foram secados antes do seu uso e mantidos em um dessecador a vácuo. Os DES foram sintetizados pelo método de aquecimento com agitação orbital contínua (250 rpm), até que foi obtido um líquido incolor homogêneo. Normalmente os DES obtidos têm viscosidades elevadas, o que dificulta seu uso na prática, por isto, em alguns casos, eles foram preparados com uma proporção máxima de 10 mols de água. Foram sintetizados dois grupos de DES um deles baseado em cloreto de colina como HBA e outro com glicerina como HBA. As diferentes proporções molares de HBA, HBD e água, temperatura e tempo de síntese para cada mistura são detalhados na Tabela 1. Os compostos usados como HBD foram neutros (ureia), poliálcoois (glicerina e sorbitol), ácidos orgânicos (levulínico, láctico, málico, oxálico, succínico e cítrico) e um ácido inorgânico (ácido bórico). Posterior a sua preparação, foram armazenados em ambiente livre de umidade e caracterizados físico-quimicamente.

Tabela 1. Condições de síntese para os DES

HBA	HBD	Nome	Proporção molar ^a	Tempo (h)	Temperatura (°C)
Cloreto de Colina	Ureia	CC-Ur	1:2:10	2	90
	Glicerina	CC-Gli	1:2:10	2	60
	Sorbitol	CC-Sor	1:1:10	2	60
	Ácido levulínico	CC-Lev	1:2:0	2	60
	Ácido láctico	CC-Lac	1:10:0	2	60
	Ácido málico	CC-Mal	1:1:10	2	90
	Ácido Oxálico	CC-Ox	1:1:0	2	90
	Ácido succínico	CC-Suc	3:1:10	4	90
	Ácido bórico	CC-Bor	3:1:10	4	90
	Ácido cítrico	CC-Cit	1:1:10	2	60
Glicerina	Ureia	Gli -Ur	1:1:10	2	90
	Sorbitol	Gli -Sor	1:1:10	2	60
	Ácido levulínico	Gli -Lev	1:1:10	2	60
	Ácido láctico	Gli -Lac	1:1:0	2	60
	Ácido málico	Gli -Mal	1:1:10	4	90
	Ácido Oxálico	Gli -Ox	2:1:10	4	90
	Ácido succínico	Gli -Suc	3:1:10	4	120
	Ácido bórico	Gli -Bor	3:1:10	4	90
	Ácido cítrico	Gli -Cit	1:1:10	2	60

^a correspondente a HBA:HBD:H₂O

Fonte: elaborado pela autora

3.3.3 Pré-tratamento da biomassa

3.3.3.1 Pré-tratamento usando DES

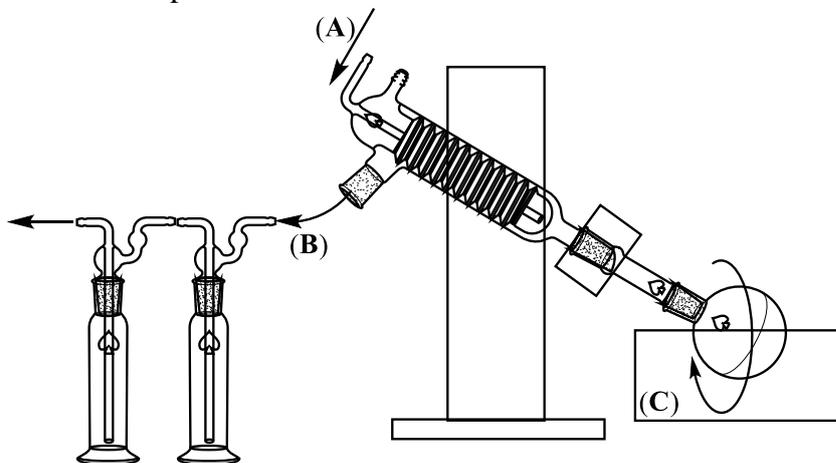
Em um primeiro grupo de experimentos, as misturas anteriores foram testadas com a biomassa. A mistura de DES e biomassa foi preparada com uma carga de sólidos de 5 % (m/v

– biomassa / DES), o parâmetro de concentração do DES foi testado em valores de 25, 50 e 100 % (v/v), o efeito do tempo em valores de 3; 6; 9 e 12 horas e da temperatura do pré-tratamento em 30; 60 e 90 °C. Após o pré-tratamento, as misturas DES-biomassa foram resfriadas e a fração líquida foi separada por filtração e armazenada a 10 °C para as análises posteriores. A fração sólida foi lavada com diferentes soluções testadas (orgânicas, alcalina e água quente) preparando uma suspensão com carga de 5 % (m/v – biomassa tratada/solução de lavagem) por 15 min com agitação mecânica constante de 300 rpm à temperatura ambiente, este procedimento foi repetido mais duas vezes e finalmente a biomassa pré-tratada foi lavada com água destilada suficiente para remover resíduos de DES até pH neutro. Após a conclusão das lavagens, a biomassa tratada foi secada a 45 °C por 16 horas com circulação de ar até que o teor de umidade ficasse menor que 5 %, e depois armazenada para posterior análise e pré-tratamento com ozônio.

3.3.3.2 Pré-tratamento com ozônio.

Depois de fazer o estudo com todas as misturas sintetizadas, foram escolhidos quatro DES por seus melhores resultados: CC-Cit, CC-Ox, Gli – Cit e Gli – Ox. Para as amostras de biomassa tratadas com cada um dos 4 DES e lavadas, foi realizado o pré-tratamento com ozônio com 35% de umidade e pela metodologia de ciclos de ozônio. O ozônio foi gerado pelo método descrito na seção 3.2.2 do capítulo 1. Foi usado um reator rotativo baseado em um balão de vidro de fundo redondo C (com capacidade de 250 mL) acoplado a um evaporador rotatório, com entrada do ozônio em A, e a saída em B para o aparelho de quantificação de ozônio descrito anteriormente (Figura 3).

Figura 3. Reator usado no pré-tratamento de BLC com ozônio

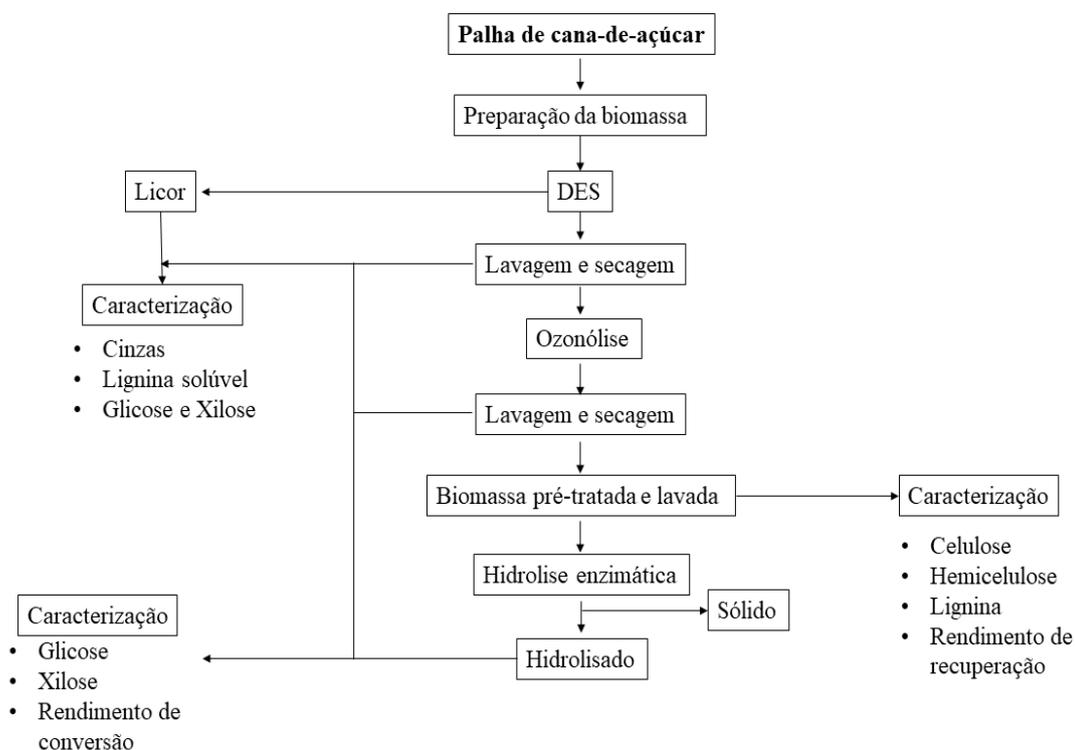


Fonte: Elaborada pela autora

Em cada ciclo foi inserido ao reator ozônio por um tempo de 30 segundos (tempo de exposição), a concentração de ozônio foi de 0,24%, e com estas condições foram inseridas ao reator 7 mg de ozônio em cada ciclo. Depois de saturar o reator com o gás, ele foi fechado para permitir a interação entre a biomassa e ozônio presente no reator (tempo de reação), para cada ciclo, o tempo de reação foi fixado em 2 minutos. Ao finalizar a ozonólise, as amostras foram lavadas com água, com carga do 5 % (m/v) em um agitador orbital por 30 minutos a 25 °C, após foram secadas em forno com circulação de ar a 45 °C por 16 horas e armazenadas.

Para o licor obtido do pré-tratamento com DES foi determinado seu conteúdo de cinzas, lignina solúvel e os açúcares glicose e xilose. No caso das frações sólidas pré-tratadas, foi determinada sua composição química (celulose, hemicelulose e lignina, além do rendimento de recuperação). Para os hidrolisados obtidos após a hidrólise enzimática, foi determinado o conteúdo de glicose, xilose e calculados os rendimentos de conversão (Figura 4).

Figura 4. Fluxograma para o desenvolvimento do pré-tratamento DES / Ozonólise



Fonte: elaborado pela autora

3.3.4 Caracterização química da biomassa

As amostras pré-tratadas foram submetidas a caracterização química dos carboidratos celulose (como glicose), hemicelulose (só como xilose) e lignina total (solúvel e insolúvel) seguindo o procedimento analítico da norma NREL/TP-510-42618 (SLUITER et al., 2012). A quantificação dos carboidratos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência como se descreve na seção 3.8.1.

3.3.5 Hidrólise enzimática da biomassa

As amostras pré-tratadas foram submetidas à hidrólise enzimática para a produção dos açúcares fermentáveis. Os experimentos foram realizados em frascos erlenmeyer de 20 mL dispostos em incubadora com agitação orbital de 150 rpm, usando uma solução tampão de citrato de sódio 0,05 mol L⁻¹ com pH 5,0. A temperatura de incubação foi de 50 °C e uma carga de 10 % de sólidos totais (m/v), o tempo da hidrólise foi de 24 horas.

A carga enzimática foi padronizada pela atividade no papel filtro (FPU mL⁻¹) (GHOSE, 1987) por grama de biomassa, sendo empregada em torno de 10 FPU mL⁻¹ para cada experimento. A dosagem foi realizada a partir do preparo de uma solução-mãe das enzimas comerciais Cellic[®] CTEC2 e HTEC2 misturadas na proporção de 4:1, respectivamente. A solução final das enzimas após da diluição para fixar o complexo enzimático em 10 FPU mL⁻¹, continha as seguintes atividades enzimáticas: proteína total 0,7 mg mL⁻¹ (BRADFORD, 1976), β-glicosidase 28,0 IU mL⁻¹, xilanase 28,7 IU mL⁻¹, β-xilosidase 0,2 IU mL⁻¹, CMCcase 9,0 IU mL⁻¹, AVICELase 3,1 IU mL⁻¹ (DA SILVA DELABONA et al., 2016). Os sobrenadantes coletados da hidrólise foram centrifugados por 5 minutos a 4000 rpm, diluídos e filtrados em membrana de PVDF (Merck) de 0,2 μm para a quantificação dos açúcares fermentáveis por cromatografia líquida.

3.3.6 Caracterização por espectroscopia vibracional infravermelha com transformada de Fourier e com reflexão total atenuada (FTIR-ATR) dos DES

A espectroscopia de infravermelho foi usada para identificar as bandas características deste tipo de solventes que são indícios da formação das interações moleculares no solvente. Os espectros vibracionais foram coletados em um espectrofotômetro modelo Spectrum UATR

Two-PerkinElmer[®], na região de 4000 a 400 cm^{-1} e com resolução espectral de 4 cm^{-1} e acumulações de 32 scans.

3.3.7 Caracterização termogravimétrica da biomassa e DES

A análise termogravimétrica dos DES dá indícios da formação dos solventes, além de dar informação sobre sua aplicabilidade como pré-tratamento sem perder suas propriedades eutéticas. A análise térmica dos DES e dos reagentes iniciais foram realizados usando uma balança termogravimétrica TGA 4000 (PerkinElmer, Shelton, CT, USA). Aproximadamente, 10 mg da amostra foram aquecidos de 30 até 500 $^{\circ}\text{C}$, com taxa de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$, em atmosfera de nitrogênio (20 mL min^{-1}).

3.3.8 Determinação da densidade e viscosidade dos DES

A densidade dos DES sintetizados foi determinada usando um picnômetro de 5 mL calibrado com água ultrapura a 20 $^{\circ}\text{C}$. Para a determinação da viscosidade foi empregado um viscosímetro de Hoppler (falling ball viscometer) acoplado a um banho termostático a 20 $^{\circ}\text{C}$, foram empregados 50 mL de cada amostra de DES e o resultado foi expresso em mPa s.

3.3.9 Métodos analíticos

3.3.9.1 Quantificação de glicose e xilose por cromatografia de troca iônica

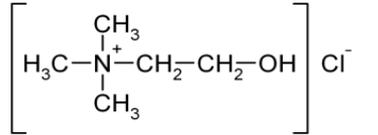
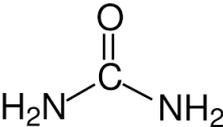
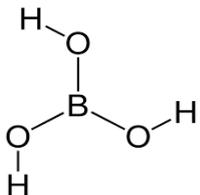
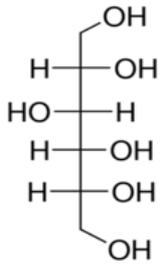
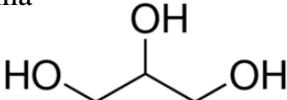
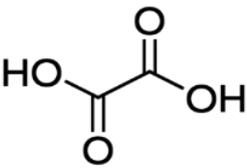
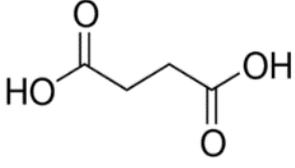
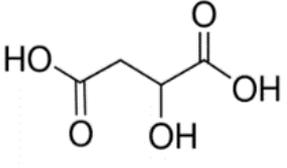
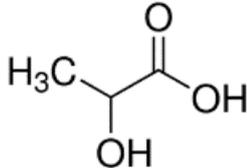
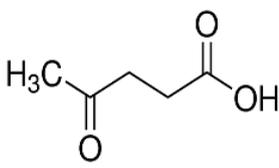
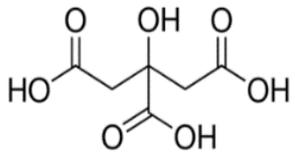
Os hidrolisados obtidos após da hidrólise enzimática, foram analisados por cromatografia para a quantificação de glicose e xilose. Foi empregado um cromatógrafo de troca iônica de alta eficiência com detector amperométrico de pulsos (HPAEC-PAD, Thermo Scientific, Dionex, ICS-5000), acoplado a uma coluna de troca aniônica CarboPac[®] PA-1. A temperatura da coluna foi mantida a 25 $^{\circ}\text{C}$. A fase móvel foi composta por água ultrapura (solvente A) e NaOH 0,5 mol L^{-1} (solvente B), usando eluição isocrática de 0 até 12 minutos com 4,8 % de B, de 12 até 16 minutos com 100 % de B e de 16 até 25 minutos 4,8 % de B. Foi utilizado fluxo de 1 mL min^{-1} . Antes de cada injeção, as amostras foram passadas por filtros de 0,2 μm (membrana PVDF, Merck).

3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 Caracterização dos DES sintetizados: Densidade e viscosidade

As estruturas químicas dos reagentes de partida para síntese das dezenove misturas de DES a base de cloreto de colina e glicerina são apresentadas na Figura 5. Foram empregados ureia como composto neutro, sorbitol e glicerina como poliálcoois (também neutros), ácido bórico como ácido inorgânico e seis ácidos orgânicos (oxálico, succínico, málico, láctico, levulínico, cítrico).

Figura 5. Estrutura química dos reagentes empregados para a síntese dos DES

Cloreto de colina 	Uréia 	Ácido Bórico 	Sorbitol 
Glicerina 			
Ácido Oxálico 	Ácido Succínico 	Ácido Málico 	
Ácido Láctico 	Ácido Levulínico 	Ácido Cítrico 	

Fonte: elaborada pela autora

Uma revisão geral das condições de síntese permite fazer uma relação com as estruturas dos reagentes de partida. Existem variáveis que influenciam significativamente na formação e

estabilidade dos DES, como o número de grupos doadores ou aceptores de ligações de hidrogênio, a estrutura espacial destes grupos e a posição das ligações. Um exemplo pode ser feito com o grupo de HBD de ácidos carboxílicos, e assim, a síntese do DES de Gli com ácido succínico foi a única mistura que precisou de maior tempo de síntese com a máxima temperatura empregada para este grupo (120 °C). Os DES a base de ácido oxálico e málico precisaram menos tempo, mas com temperatura também alta (90 °C), entretanto os DES a base de ácido cítrico, láctico e levulínico foram sintetizados com as condições mais brandas (60 °C e 2 horas). Tendo em conta a estrutura destes ácidos, é possível concluir que a presença de maior quantidade de grupos hidroxilas e carboxilas permite que sejam formadas mais ligações de hidrogênio, aumentando a estabilidade dos líquidos, tornando mais fácil sua síntese. Em geral, os DES a base de CC foram os mais fáceis de sintetizar.

Outros estudos têm relatado a dificuldade para obter algumas misturas de DES a temperatura ambiente, assim, a adição de água ajudou para a obtenção de DES estáveis a temperatura ambiente, entretanto, quantidades maiores de água levam à diluição dos reagentes de partida com perda das ligações de hidrogênio, e como consequência desaparece a estrutura especial dos DES. A adição de água sem levar à diluição, melhora as condições de síntese e diminuição importante da viscosidade (GUTIÉRREZ et al., 2009). Os valores de densidade e viscosidade são parâmetros que devem ser levados em consideração para o projeto e operação de processos em uma escala maior, e os dados obtidos são apresentados na Tabela 2. Estas variáveis são propriedades dos DES relacionadas com a pureza, presença de água e com o tipo de interações moleculares no líquido, pois que dependem do tipo de HBA e HBD, assim como da relação molar entre eles. O DES com a maior viscosidade obtida foi Gli-Suc e Gli-Bor, precisando de especial manuseio no pré-tratamentos da biomassa. As densidades dos DES apresentaram valores entre e 1.1 e 1.3 g cm⁻³. Valores muito altos de viscosidade são uma desvantagem importante, pois reduzem a transferência de massa dos compostos até as fibras lignocelulósica. A viscosidade pode ser ajustada com a temperatura do processo ou misturando os DES com água.

3.4.2 Caracterização dos DES sintetizados: Termogravimetria

Antes de sua aplicação no tratamento da biomassa, os DES foram caracterizados por espectroscopia vibracional (ATR-IR) e por termogravimetria (TGA). Na Tabela 2 são mostrados os valores de temperatura de início de degradação para cada mistura de DES obtida,

e os dados foram comparados com o perfil do HBA e HBD. A alteração nos perfis é evidência da formação de novas interações intermoleculares entre os reagentes de partida, além disso é importante determinar a estabilidade térmica dos DES para posterior aplicação no tratamento de biomassa.

Tabela 2. Densidade, Viscosidade e Temperatura de degradação dos DES sintetizados

HBA	HBD	Nome	Proporção molar ^a	Densidade a 20 °C ^b	Viscosidade a 20 °C ^c	T _d
	Ureia	CC-Ur	1:2:10	1,1253	6,205	150
	Glicerina	CC-Gli	1:2:10	1,1207	15,019	155
	Sorbitol	CC-Sor	1:1:10	1,2036	26,431	250
	Ácido levulínico	CC-Lev	1:2:0	1,1343	146,15	150
Cloreto de Colina	Ácido láctico	CC-Lac	1:10:0	1,1860	84,609	125
	Ácido málico	CC-Mal	1:1:10	1,1637	15,717	170
	Ácido Oxálico	CC-Ox	1:1:0	1,2411	732,832	185
	Ácido succínico	CC-Suc	3:1:10	1,1476	37,482	225
	Ácido bórico	CC-Bor	3:1:10	1,1324	25,184	265
	Ácido cítrico	CC-Cit	1:1:10	1,2355	48,537	170
		Ureia	Gli-Ur	1:1:10	1,1236	5,712
	Sorbitol	Gli -Sor	1:1:10	1,2168	36,254	160
	Ácido levulínico	Gli -Lev	1:1:10	1,0986	7,4302	130
Glicerina	Ácido láctico	Gli -Lac	1:1:0	1,1247	145,223	135
	Ácido málico	Gli -Mal	1:1:10	1,2349	18,339	175
	Ácido Oxálico	Gli-Ox	2:1:10	1,2946	265,042	120
	Ácido succínico	Gli-Suc	3:1:10	1,2907	1633,332	160
	Ácido bórico	Gli-Bor	3:1:0	1,3023	1850,441	190
	Ácido cítrico	Gli -Cit	1:1:10	1,2680	43,443	150

^a correspondente a HBA:HBD:H₂O, ^b em g cm⁻³, ^c mPa s, T_d: Temperatura de degradação em °C

Fonte: elaborada pela autora

Para os DES de CC, na maioria dos casos todas as temperaturas de degradação tiveram valores entre os correspondentes para os reagentes de partida, exceto para CC-Cit e CC-Sor,

cujas temperaturas de degradação iniciam em valores próximos do ácido cítrico e do sorbitol, que são os HBD com maior temperatura de degradação. O CC-Lac apresentou a menor temperatura de início de degradação (125 °C). Para os DES de Glicerina em geral, as temperaturas de decomposição foram menores em comparação com os DES de CC, isto devido à menor temperatura de decomposição da glicerina. Os DES de Gli-Lac, Gli-Mal e Gli-Ox foram as misturas menos resistentes à decomposição térmica.

A interpretação dos resultados da estabilidade térmica dos DES não é um processo fácil. O tipo de HBD e HBA, os grupos funcionais envolvidos na mistura, o comprimento da cadeia alquílica, a viscosidade e todas as possíveis interações (ligações de hidrogênio, eletrostáticas e de dispersão) podem ter um efeito importante na alteração das propriedades térmicas (GHAEDI et al., 2017). Tem sido relatado que a adição de água tem como efeito a diminuição na estabilidade térmica (SAVI et al., 2019), o que poderia explicar porque para alguns DES as temperaturas de início de degradação têm valores menores aos reportados em estudos prévios. A análise das curvas termogravimétricas permite observar para vários DES a aparição de diferentes eventos térmicos, sendo o primeiro deles entre 60 e 120 °C correspondente a perda da água. Os eventos na faixa entre 120 e 250 °C aproximadamente, correspondem à completa vaporização e decomposição do HBD, enquanto o evento próximo a 300 °C é a decomposição do CC. Nas Figuras 6 e 7 são mostradas as curvas termogravimétricas bem como suas primeiras derivadas dos DES a base de cloreto de colina e a base de glicerina, respectivamente.

Para o ácido bórico é observado um primeiro evento associado com sua degradação (130 °C) e um segundo evento em 160 °C. Com a formação dos DES, é observado uma alteração no perfil da curva, mostrando a perda da água seguido pela decomposição do HBA (CC ou Gli). O termograma do DES CC-Gli mostra um perfil muito diferente dos reagentes, com a formação e decomposição de intermediários, que podem ter sido formados pelas interações intermoleculares (FERNÁNDEZ-DELGADO et al., 2019; SAVI et al., 2019).

Figura 6. Curvas termogravimétricas e as respectivas curvas da primeira derivada negativa dos DES a base de Cloreto de Colina

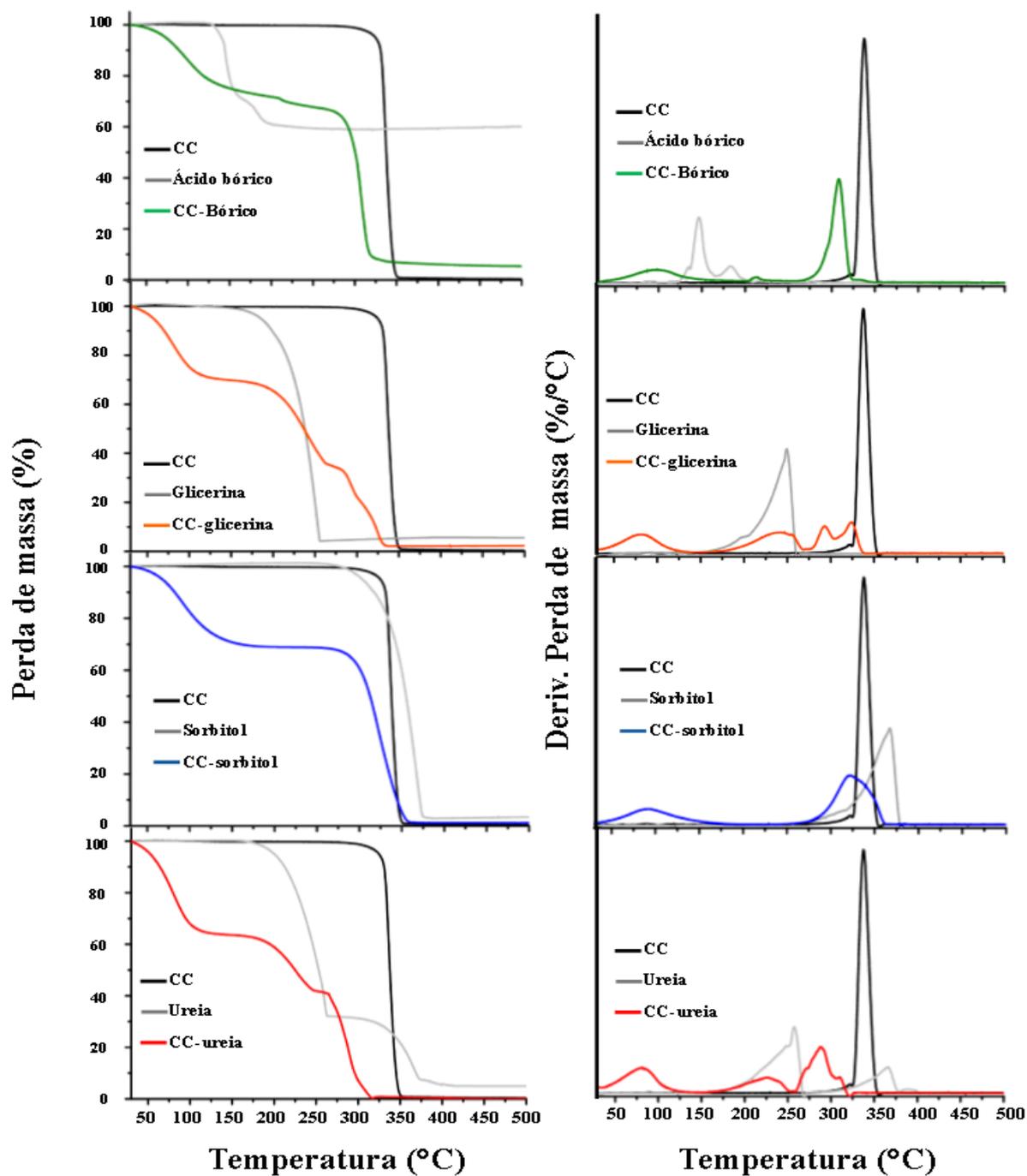
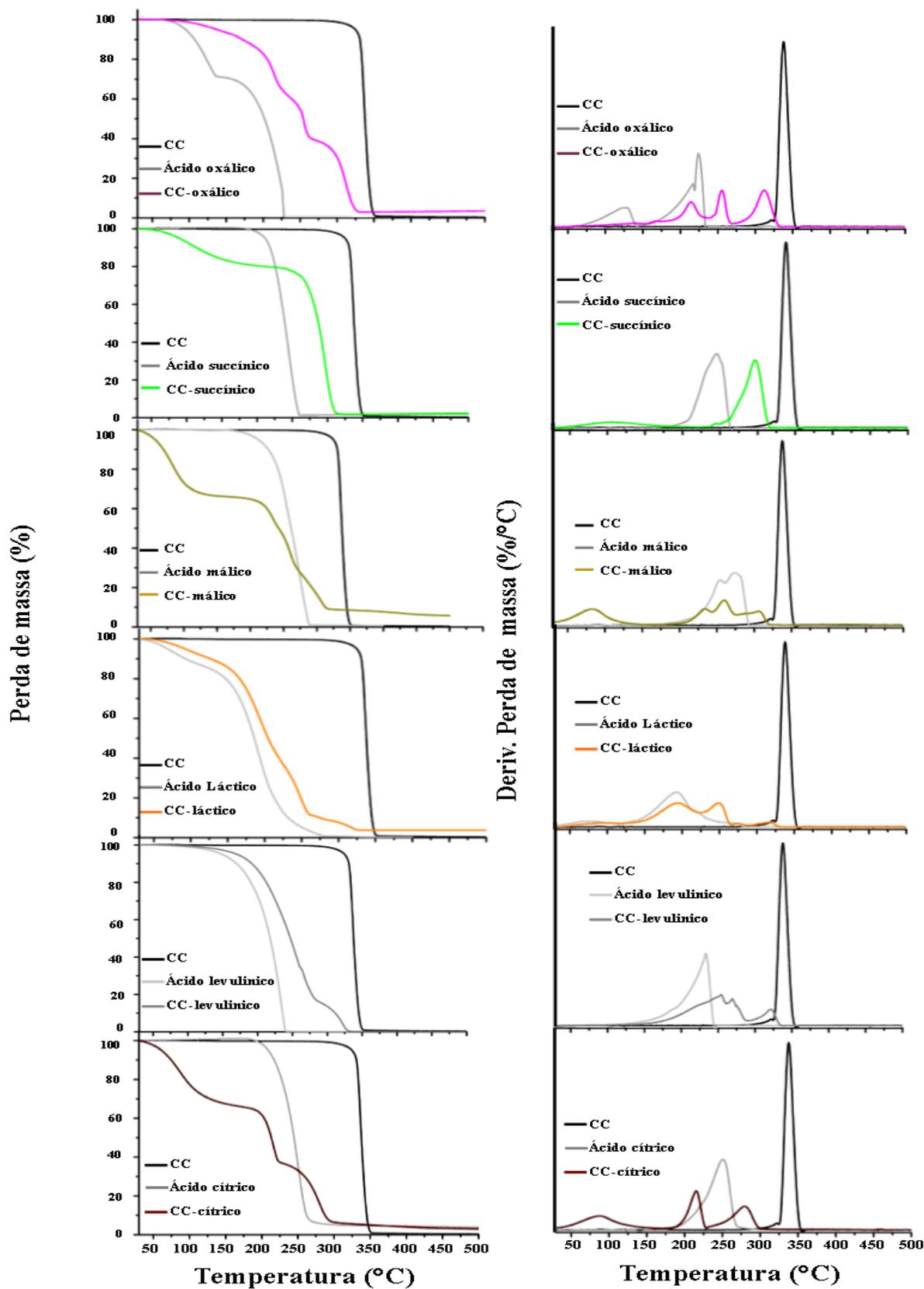


Figura 6. Continuação



Fonte: Elaborada pela autora

O estudo de TGA para CC-Sor e Gli-Sor mostra uma primeira perda de massa de água até 260 °C quando se inicia um único evento em menor temperatura que os respectivos reagentes. No caso de ureia, um primeiro evento em 160 °C é ocasionado pela vaporização da ureia, em 250 °C inicia a decomposição dos intermediários (biuret e ácido ciânico) (SCHABER et al., 2004). Na curva de decomposição térmica do CC-Ur é possível observar a decomposição destes intermediários, mas em Gli-Ur o segundo evento está sobreposto com a decomposição da glicerina, que está em menor temperatura em comparação com o CC (WANG et al., 2015).

A análise dos DES de ácido oxálico mostra perfis diferentes aos reagentes, pois o TGA do ácido oxálico apresenta dois eventos, o primeiro que corresponde a perda da água e sublimação (entre 60 e 100 °C), e em 140 °C inicia sua fusão ígnea e vaporização para depois sofrer decomposição (HAZ et al., 2016). No caso de CC-Ox se observa a aparição de 3 eventos, em que o primeiro poderia estar associado com a vaporização e decomposição do ácido oxálico, e o final com a decomposição do CC. Entretanto, que o evento intermédio corresponderia à degradação de um intermediário da mistura. O TGA do DES Gli-Ox não mostra a perda da água, possivelmente, porque seu teor diminuiu como consequência do aquecimento na síntese da mistura. Os eventos aparecem em temperaturas maiores em comparação com o ácido oxálico puro e na perda final estão presentes a decomposição dos dois reagentes, o que poderia ser evidência das interações intermoleculares (SAVI et al., 2019).

As curvas termogravimétricas das misturas a base de ácido succínico mostram a evaporação e decomposição simultânea do ácido (235 °C), já para o CC-Suc o único evento está entre as temperaturas dos reagentes de partida. Para os DES de ácido málico é observada inicialmente a perda de água, seguido pelo início da decomposição simultânea dos reagentes, que no caso do ácido málico se inicia em 150 °C. A análise para os DES com ácido láctico mostra um comportamento similar aos DES de ácido oxálico, já que aparecem maior número de eventos com pouca perda de massa. A decomposição do ácido láctico está em torno de 200 °C, mas no CC-Lac aparece uma nova perda de massa em 250 °C, entretanto para Gli-Lac é observada uma perda contínua, mostrando um evento largo entre 130 e 270 °C, além da perda de água no início (FRANCISCO; VAN DEN BRUINHORST; KROON, 2012). Estes resultados são similares aos obtidos por Haz et al., (2016). As misturas do ácido levulínico apresentam um comportamento térmico diferente aos reagentes, pois para o Gli-Lev é observada perda de água e um só evento de decomposição largo (130 até 290 °C), entretanto, o CC-Lev apresenta dois eventos iniciando em 140 °C (correspondente à vaporização do ácido e

decomposição da glicerina), e um menor em 290 °C, correspondente a decomposição do CC (FERNÁNDEZ-DELGADO et al., 2019). Finalmente, as misturas de ácido cítrico mostram a aparição de dois eventos, sendo o primeiro relacionado com a temperatura de decomposição do ácido cítrico iniciando em 180°C, sendo importante notar que a perda de massa inicia na mesma temperatura, mas a temperatura máxima para a mistura ocorre em um valor menor em comparação com o ácido cítrico.

Figura 7. Curvas termogravimétricas e as respectivas curvas da primeira derivada negativa dos DES a base de Glicerina

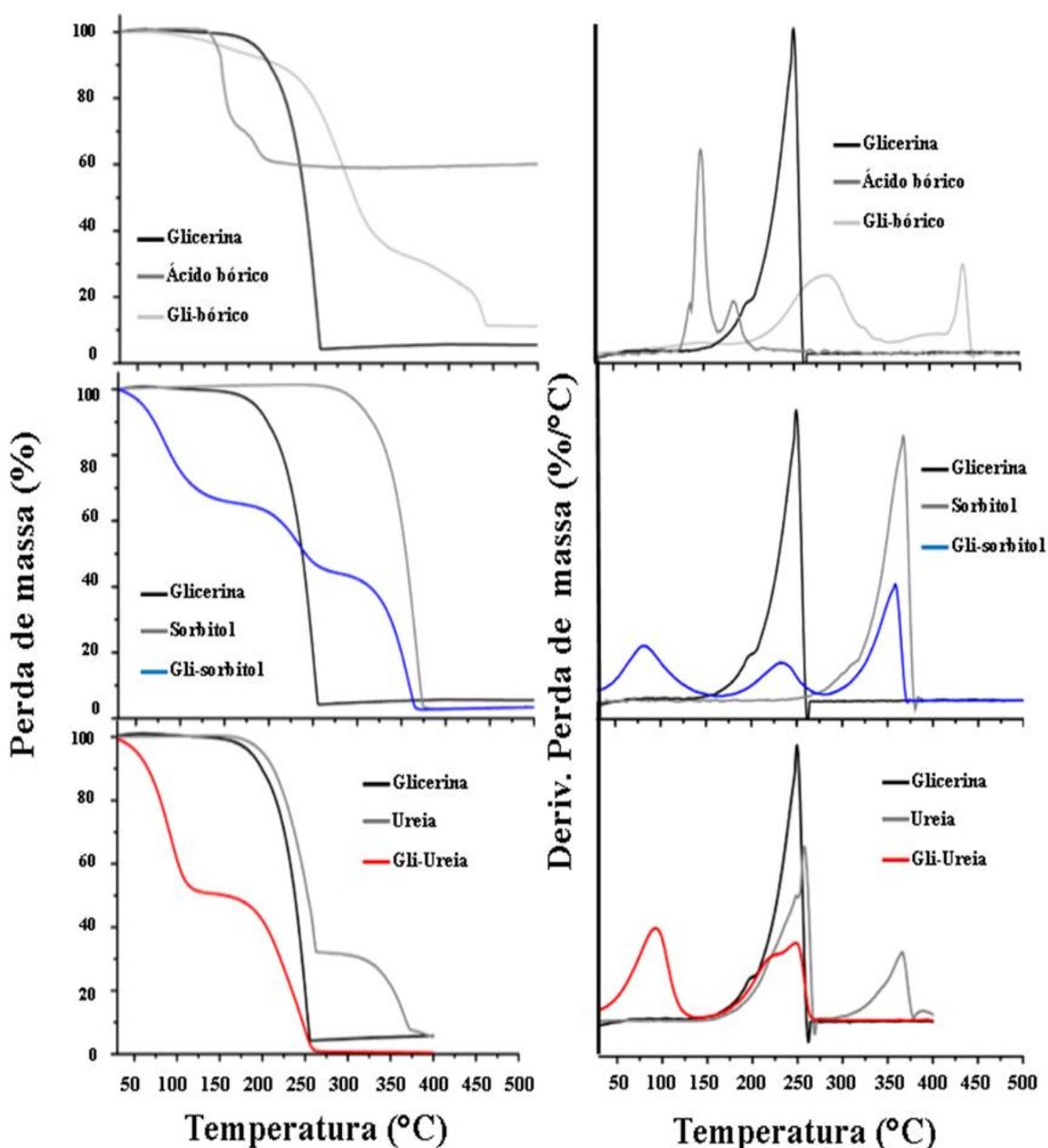
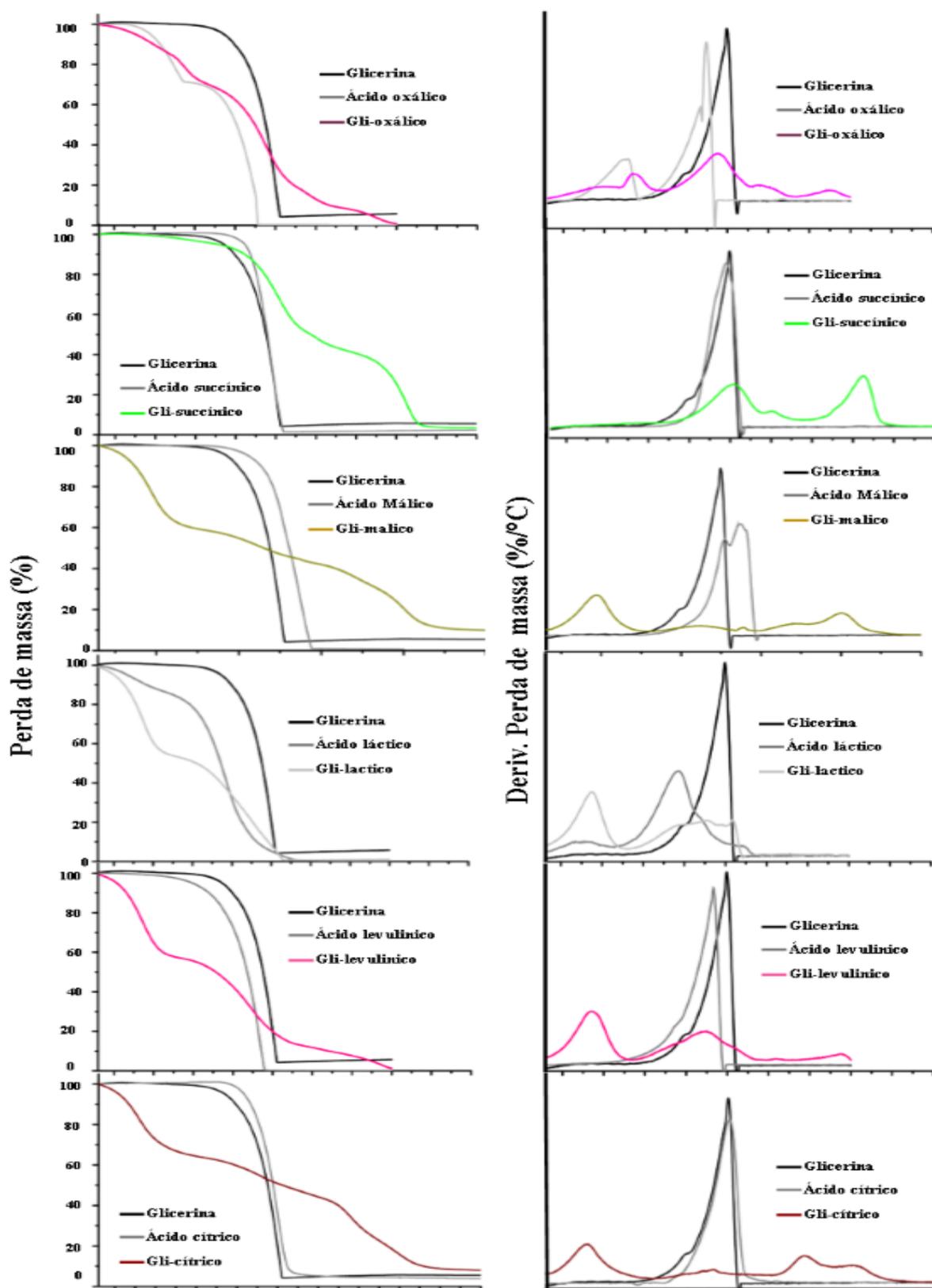


Figura 7. Continuação



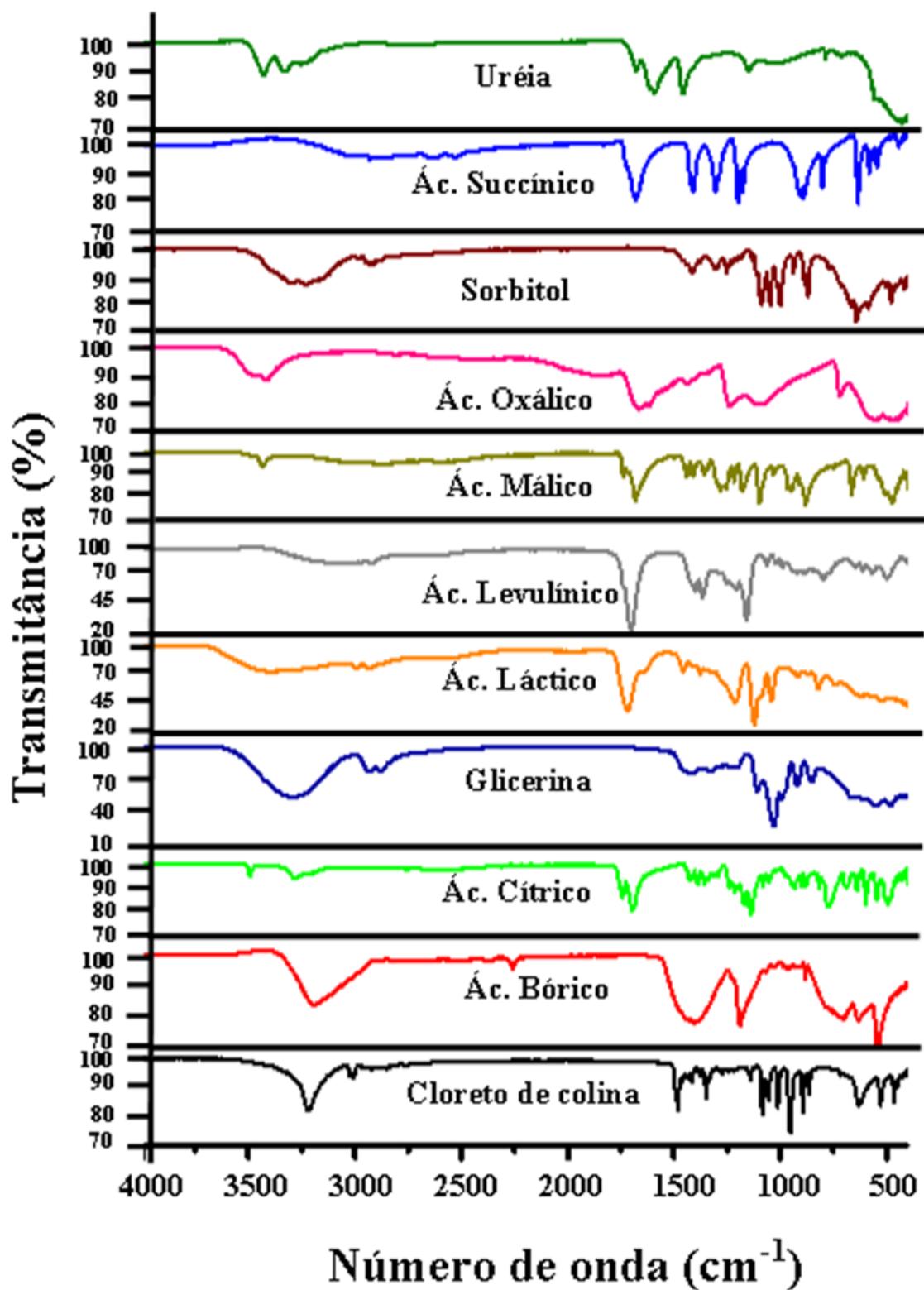
Fonte: Elaborada pela autora

3.4.3 Caracterização dos DES sintetizados: Espectroscopia vibracional

Os espectros vibracionais para cada reagente de partida são mostrados na Figura 8, para os DES a base de CC, na Figura 9, e para os DES a base de Gli na Figura 10. Em uma análise geral dos espectros serão levadas em conta as alterações mais importantes que permitem concluir que foram gerados DES para cada mistura. Na região entre 3500 e 3000 cm^{-1} são observadas as bandas de estiramento da ligação dos grupos -OH em todos os materiais analisados, entretanto nos reagentes é observado que esta banda é de baixa intensidade e nos espectros dos DES é possível detectar uma mudança que está associada com a formação de ligações de hidrogênio, pois as nuvens de elétrons do átomo de oxigênio foram transferidas à ligação de hidrogênio, pois do contrário, se a banda de -OH não estivera participando a banda de absorção seria estreita (AISSAOUI et al., 2015; BARAŃSKA et al., 2003). Alguns pesquisadores relatam que uma banda perto de 3450 cm^{-1} pode estar relacionada com um grupo -OH parcialmente livre, no qual o átomo de oxigênio participa como acceptor de próton presente numa molécula de água (CASSANAS et al., 1991).

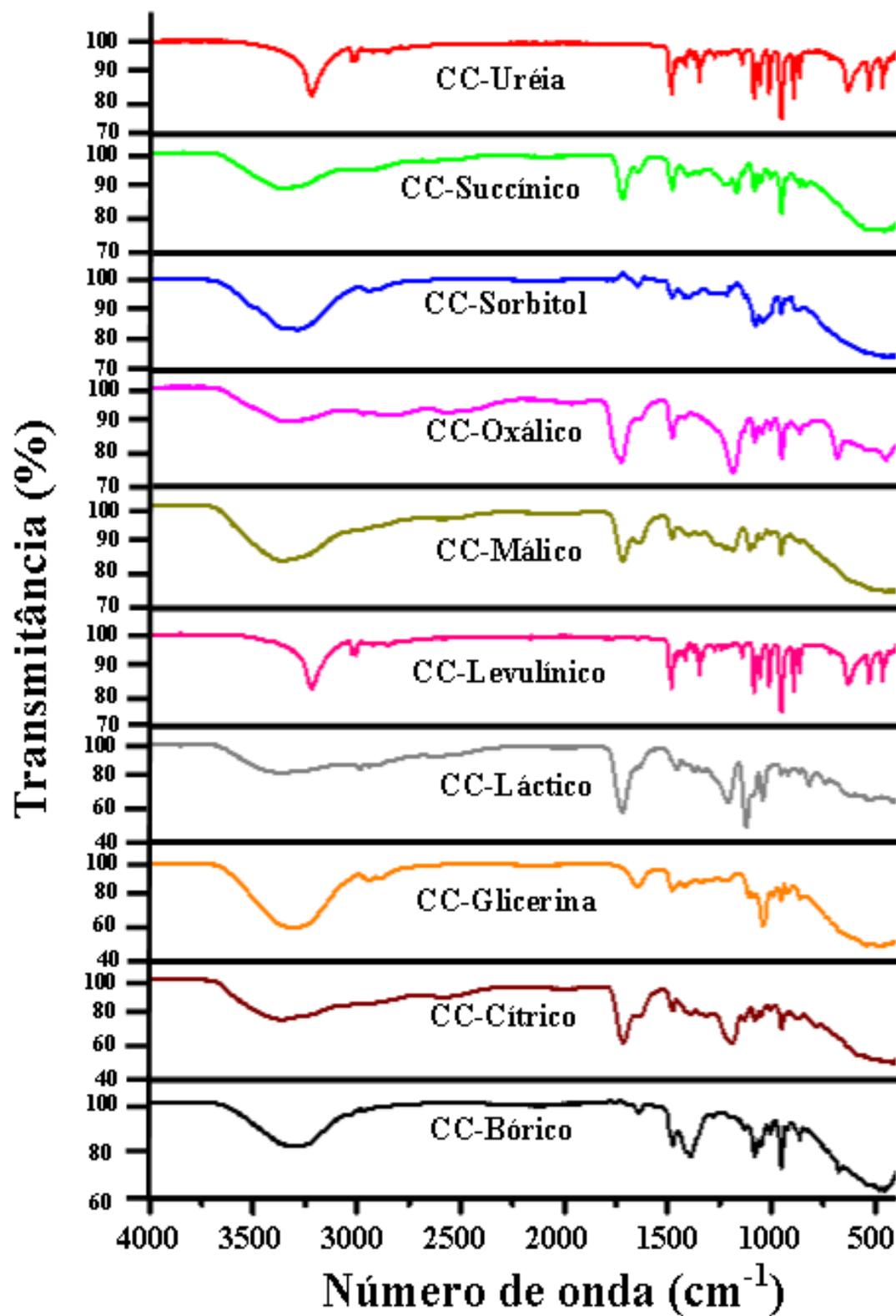
Geralmente, aparecem bandas de pouca intensidade e largas perto de 3000, entre 2600 e 2500 e em 1920 cm^{-1} que deslocam as bandas de estiramento do grupo -OH. Estas bandas estão associadas com a formação das ligações de hidrogênio ($\text{O}=\text{C}-\text{O}-\text{H}\cdots\text{O}$) intermoleculares e a formação de dímeros com duplas ligações de hidrogênio em DES que contêm ácidos orgânicos (DAI et al., 2015; XU et al., 2005). Outra característica própria da formação dos DES é o deslocamento da banda de estiramento da carbonila para números de onda maiores, causado pelo aumento da densidade eletrônica no oxigênio, o que evidencia que a formação da ligação de hidrogênio acontece pelo hidrogênio do grupo hidroxila, sendo que o grupo carbonila não participa desta interação (XU et al., 2005). Finalmente, em vários DES aparece uma banda de baixa intensidade em 1630 cm^{-1} que corresponde à vibração de flexão da molécula de água que é deslocada pela formação das ligações de hidrogênio.

Figura 8. Espectros vibracionais dos reagentes de partida na síntese dos DES



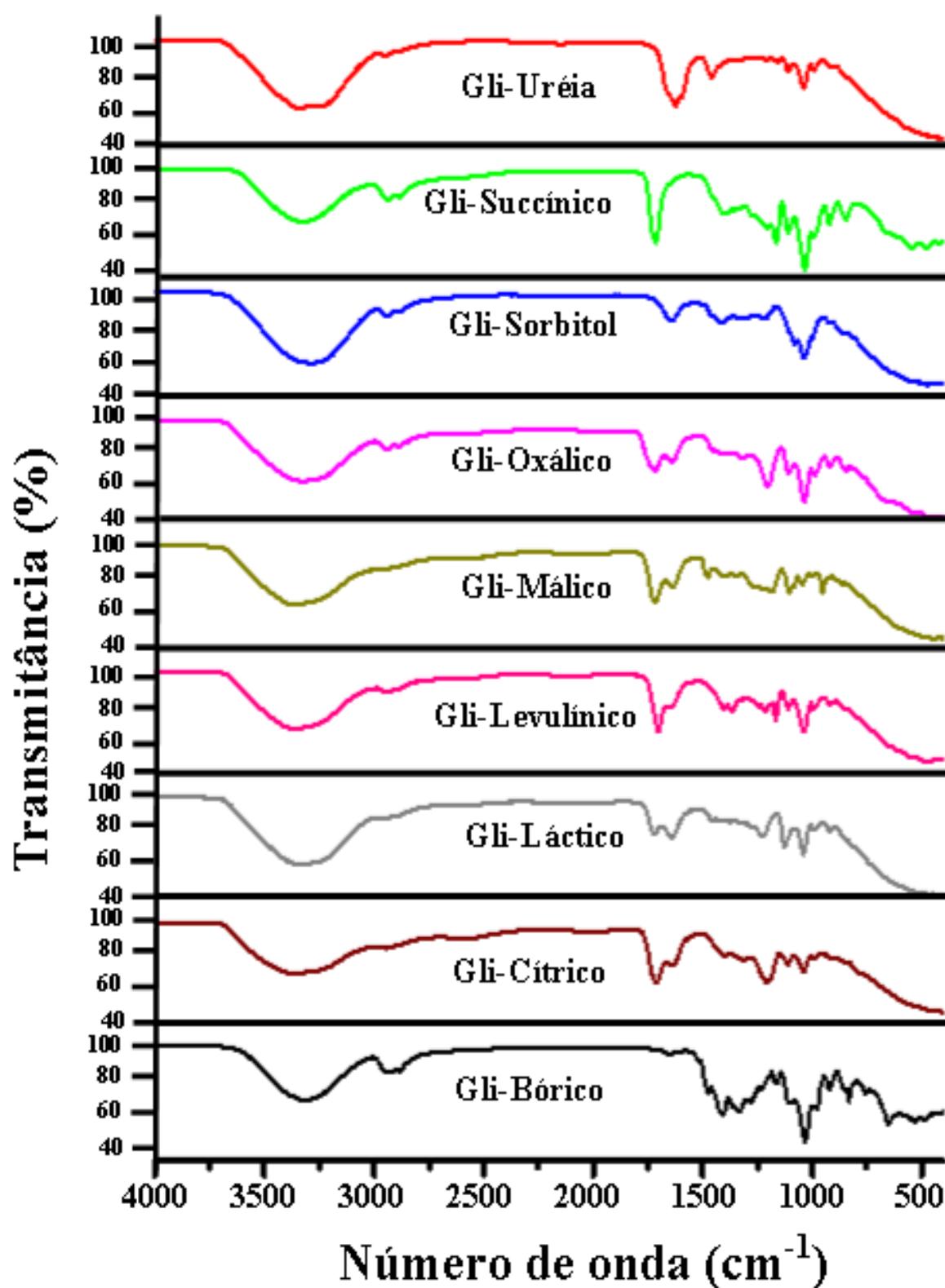
Fonte: elaborada pela autora

Figura 9. Espectros vibracionais dos DES a base de CC



Fonte: elaborada pela autora

Figura 10. Espectros vibracionais dos DES a base de Gli



Fonte: elaborada pela autora

3.4.4 Uso dos DES no pré-tratamento de BLC

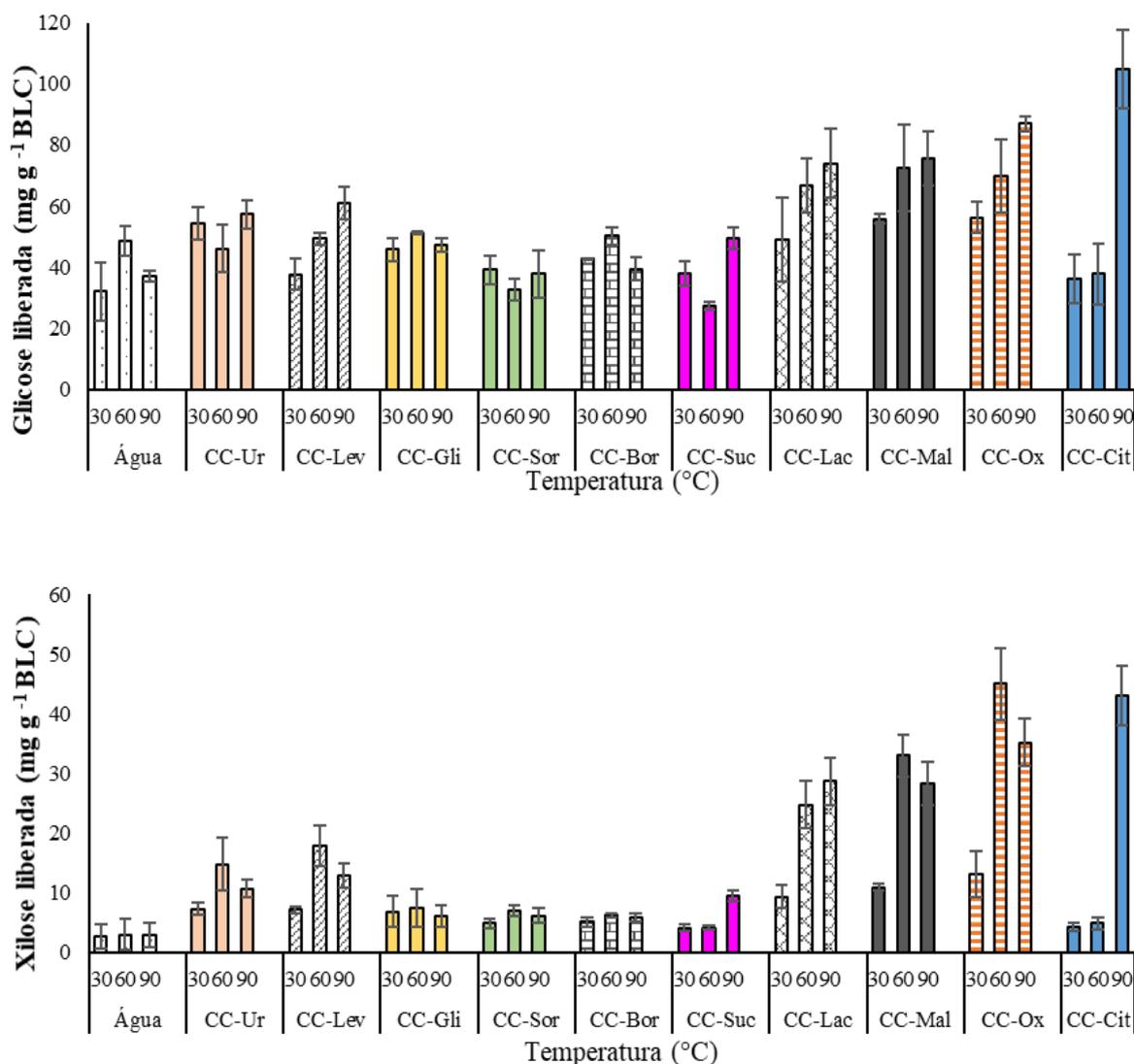
As misturas obtidas foram testadas em palha de cana-de-açúcar para determinar seu efeito na deslignificação e extração de carboidratos. Para cada DES foi testado o efeito da concentração do DES, temperatura e tempo do tratamento.

3.4.4.1 Efeito da temperatura no tratamento com DES

Foram testadas três temperaturas 30; 60 e 90 °C, o seja bem abaixo das temperaturas de degradação dos DES e da fibra. O tempo de reação foi de 8 horas, com 25 %(v/v) na concentração do DES. Os resultados para os açúcares liberados, glicose e xilose, quando a biomassa foi tratada com os DES de cloreto de colina, são apresentados na Figura 11.

Nos gráficos são mostrados os valores quando a BLC foi tratada só com água (controle). Em geral, os DES a base de ureia, ácido levulínico, glicerina, sorbitol, ácido bórico e ácido succínico apresentam comportamento similar e poucas diferenças foram observadas com relação ao controle, incluindo perda de glicose na biomassa tratada com CC-Sor e CC-Suc. Adicionalmente não foi observada uma tendência positiva quando a temperatura foi aumentada. Os melhores resultados para os dois açúcares foram obtidos com as misturas de cloreto de colina com os ácidos láctico, málico, oxálico e cítrico. Em geral, foi observado que com o aumento da temperatura ocorre um pequeno aumento na glicose liberada, exceto para o DES CC-Cit com o qual foi obtido o melhor resultado na maior temperatura. No caso da xilose, o efeito da temperatura é mais importante, obtendo os melhores resultados com CC-Ox e CC-Cit.

Figura 11. Efeito da temperatura do pré-tratamento de BLC tratada com DES de CC na liberação de açúcares (Glicose e Xilose).

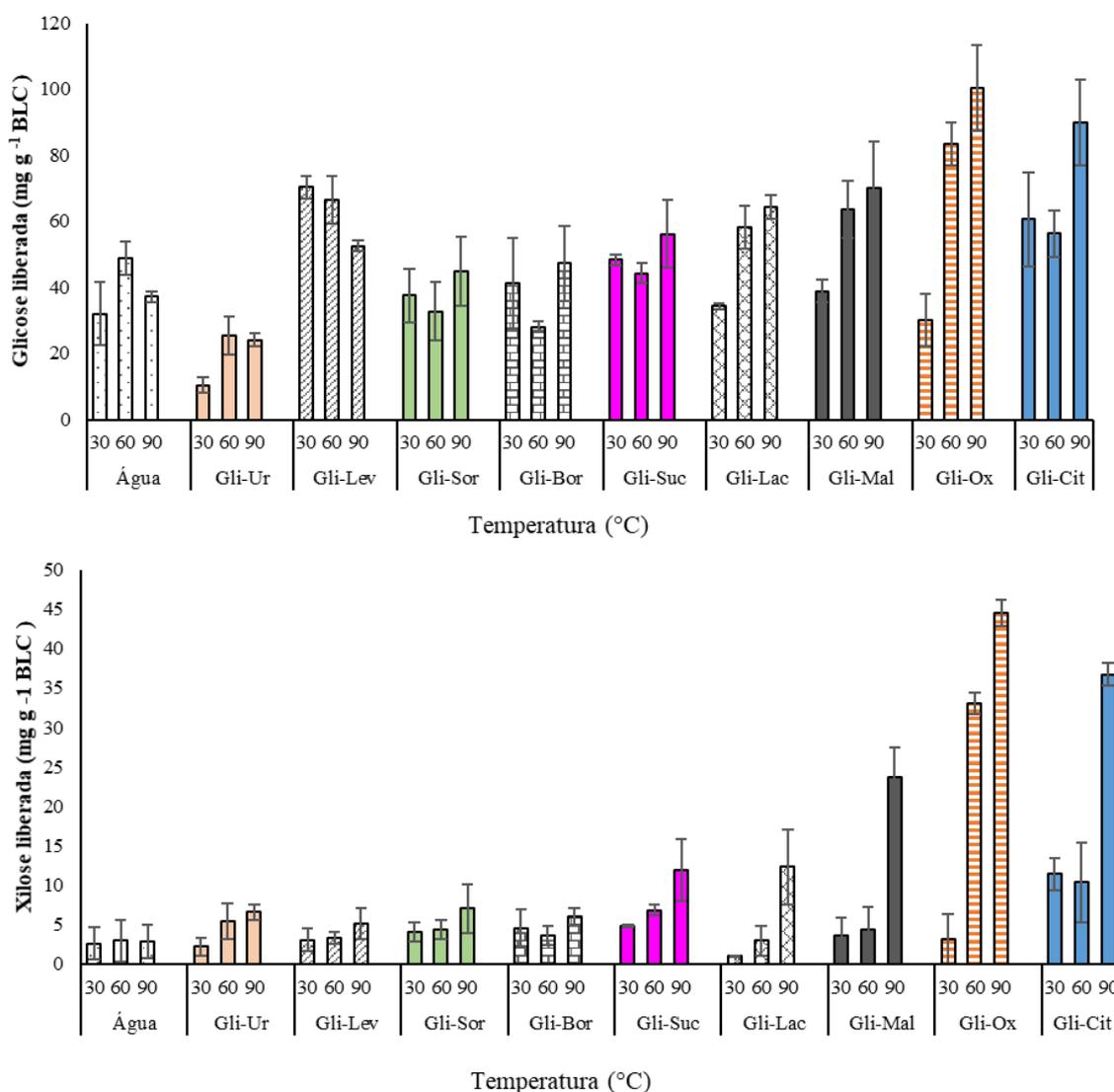


Experimentos com tempo de tratamento de 8 horas, concentração do DES 25% (v/v), carga biomassa / solvente de 5% (m/v).

Fonte: Elaborada pela autora

Quando a biomassa foi tratada com os DES de glicerina (Figura 12) foi observado pouca diferença nas tendências gerais em comparação com os DES de CC. Neste caso foi observado um melhor comportamento para Gli-Lev e novamente os melhores dados são Gli-Mal, Gli-Ox e Gli-Cit para glicose. Para a xilose foi observado que só os DES de ácido oxálico e cítrico mostraram efeito positivo, com valores próximos aos dos DES de CC.

Figura 12. Efeito da temperatura do pré-tratamento de BLC tratada com DES de Gli na liberação de açúcares (Glicose e Xilose)



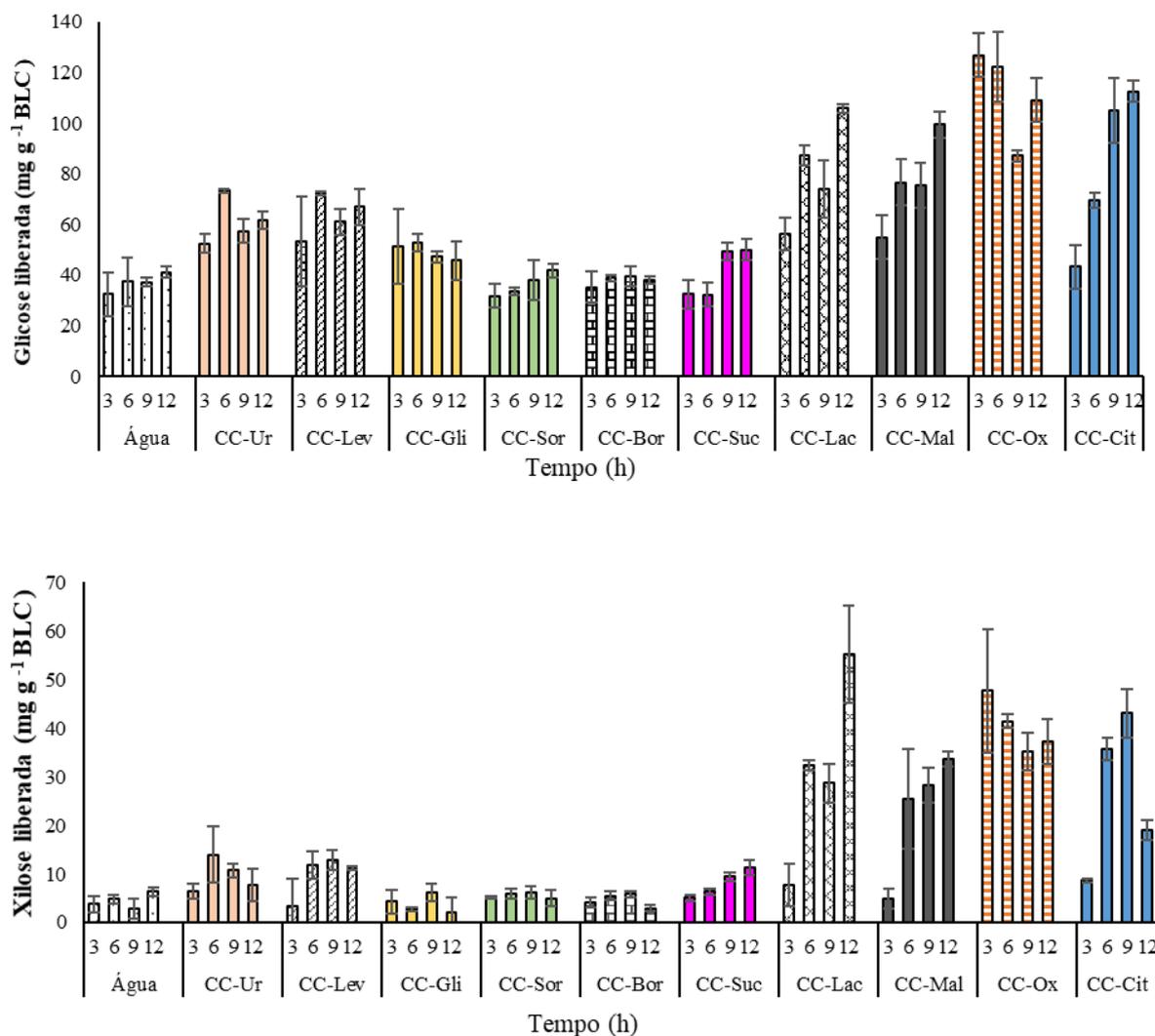
Experimentos com tempo de tratamento de 8 horas, concentração do DES 25% (v/v), carga biomassa / solvente de 5% (m/v).

Fonte: Elaborada pela autora

3.4.4.2 Efeito do tempo do tratamento com DES

O efeito do tempo de tratamento também foi estudado e são mostrados os resultados na Figura 13 para os DES de CC. A temperatura foi fixada em 90 °C e a concentração dos DES em 25%. Os resultados para CC-Sor, CC-Bor e CC-Suc foram menores ou iguais que o controle. Quando foram usados os DES de CC-Ur, CC-Lev e CC-Gli não foi observado uma tendência ao aumentar o tempo de tratamento, entretanto para os tratamentos com CC-Lac, CC-Mal e CC-Cit com maiores tempos, maior quantidade de glicose foi liberada. Para CC-Ox parece que o tempo tem efeito negativo para os dois açúcares, entretanto o uso de CC-Cit em maiores tempos não favorece a obtenção de xilose.

Figura 13. Efeito do tempo do pré-tratamento de BLC tratada com DES de CC na liberação de açúcares (Glicose e Xilose)

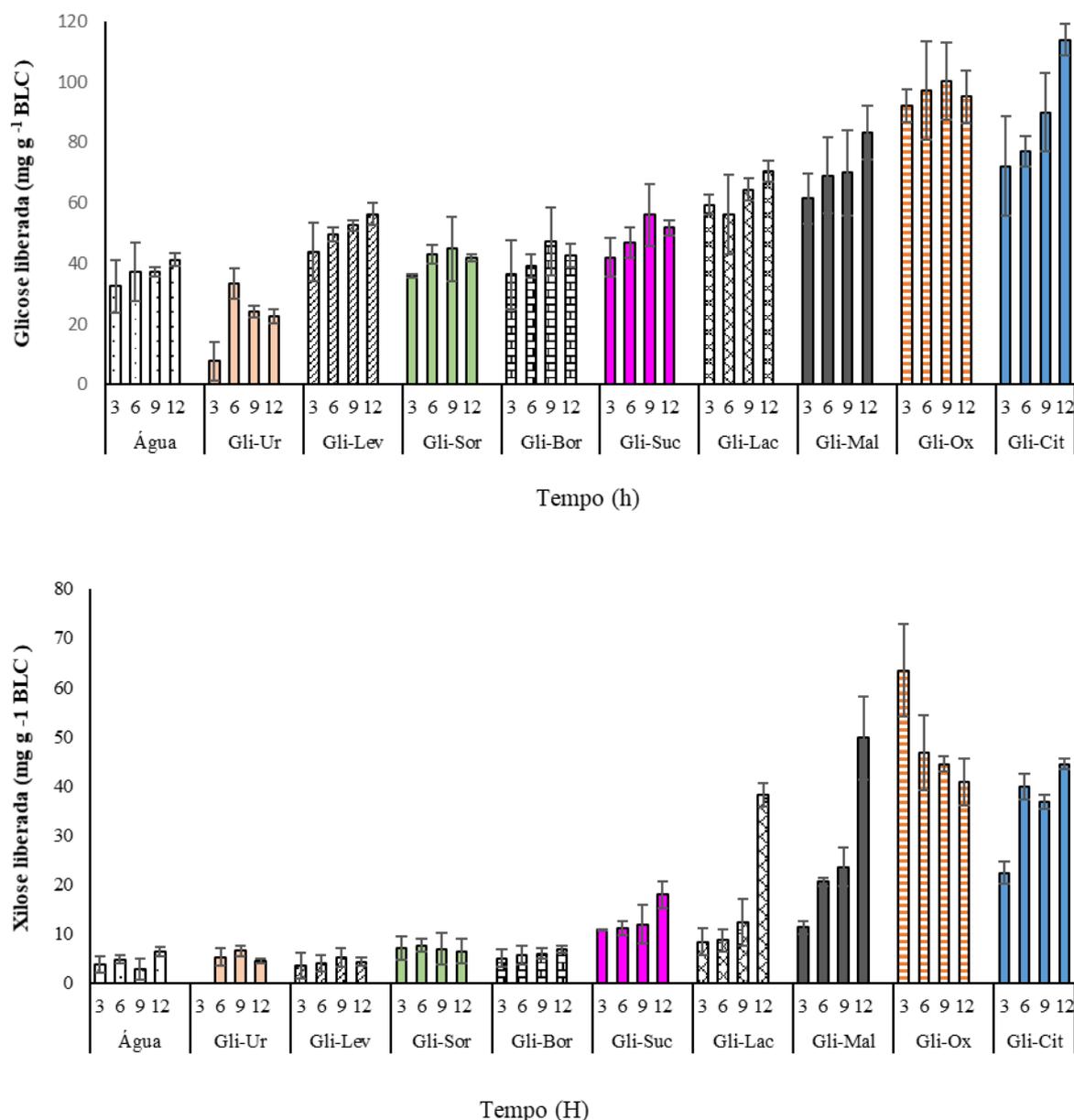


Experimentos com temperatura de tratamento de 90 °C, concentração do DES 25% (v/v), carga biomassa / solvente de 5% (m/v).

Fonte: Elaborada pela autora

Quando são analisados os resultados para os DES de glicerina (Figura 14), foi possível determinar que a mistura Gli-Ur teve perdas de açúcares. Os DES de Gli-Lev, Gli-Sor, Gli-Bor e Gli-Suc não apresentaram diferenças importantes em comparação com o controle. Novamente Gli-Cit e Gli-Ox tiveram melhores resultados, mas em geral todos os valores obtidos dos açúcares são menores que os DES de CC.

Figura 14. Efeito do tempo do pré-tratamento de BLC tratada com DES de Gli na liberação de açúcares (Glicose e Xilose)



Experimentos com temperatura de tratamento de 90 °C, concentração do DES 25% (v/v), carga biomassa / solvente de 5% (m/v).

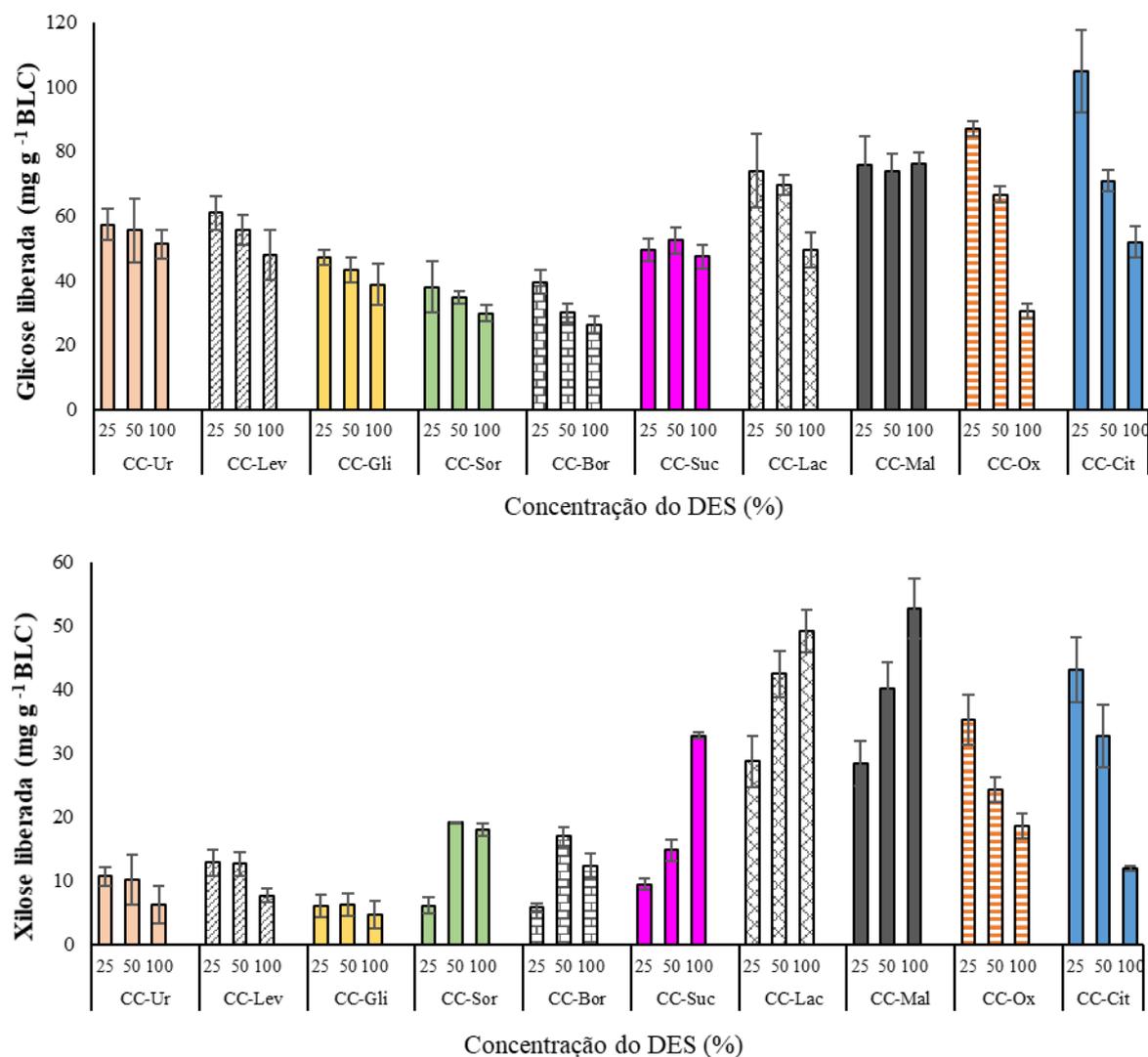
Fonte: Elaborada pela autora

3.4.4.3 Efeito da concentração dos DES no tratamento

Finalmente foi testado o efeito da concentração dos DES nos valores de 25; 50 e 100 % (v/v em água). Os resultados são mostrados nas figuras 15 e 16, onde se observa que para os DES de CC não há efeito positivo do aumento na concentração do DES sobre a liberação de glicose, exceto para os DES de ureia, ácidos succínico e málico que não tiveram efeito positivo.

No caso de CC-Cit e CC-Ox foi observado o maior efeito negativo. É importante notar o comportamento diferente que foi obtido para a xilose para alguns DES (CC-Sor, CC-Bor, CC-Suc, CC-Lac e CC-Mal), pois a degradabilidade enzimática foi favorecida. Entretanto, que para CC-Ox e CC-Cit foi observado um importante decaimento na quantidade de xilose liberada.

Figura 15. Efeito da concentração do DES no pré-tratamento de BLC com DES de CC sobre a liberação de açúcares (Glicose e Xilose)



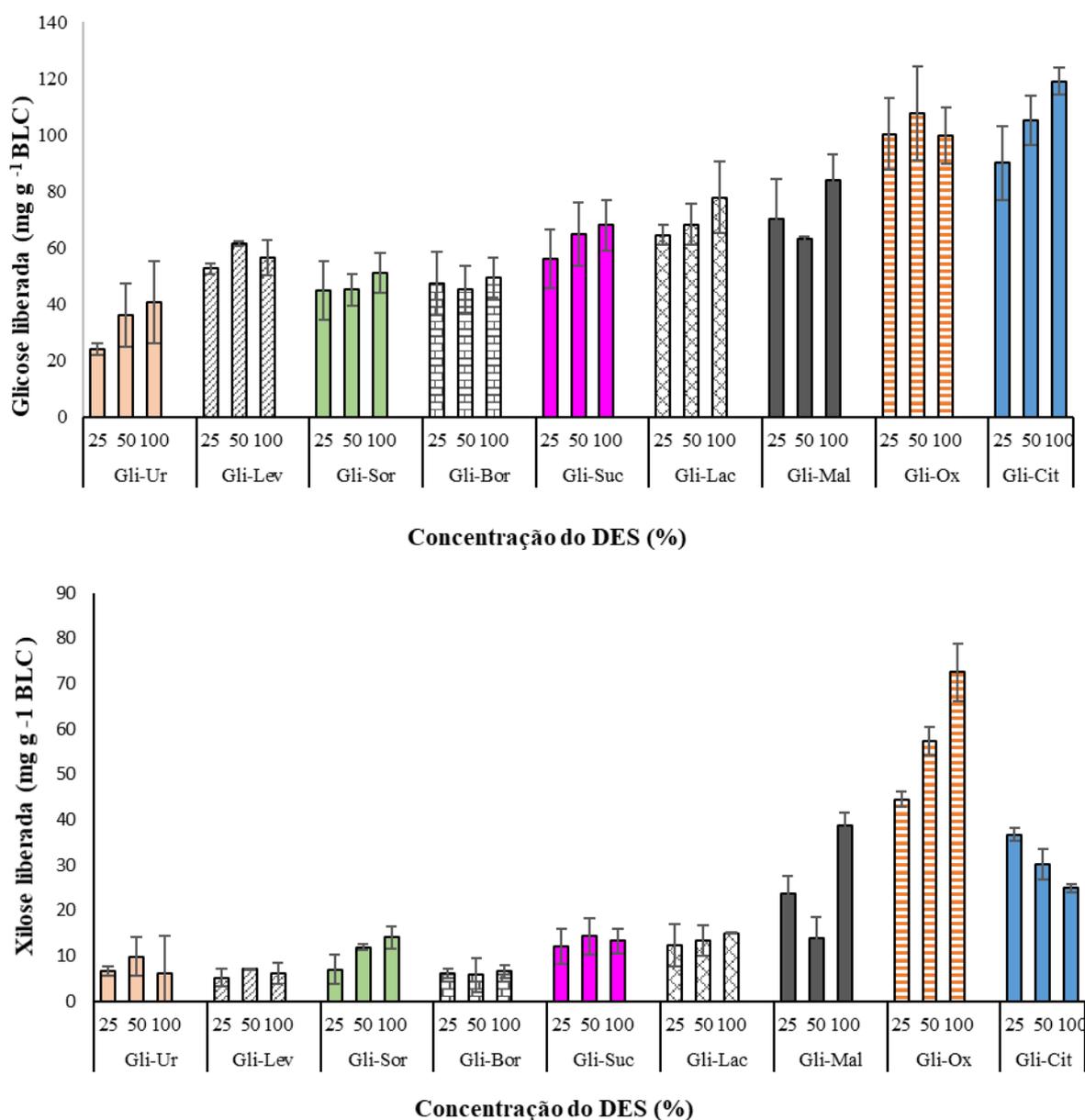
Experimentos com temperatura de tratamento de 80 °C, tempo do tratamento de 8 h, carga biomassa / solvente de 5% (m/v).

Fonte: Elaborada pela autora

Os DES de Gli (Figura 16) mostram um comportamento muito diferente, pois foi observada tendência de valores constantes de liberação de glicose e, um pequeno efeito positivo para os DES Gli-Lac e Gli-Cit. Para o caso de xilose, o Gli-Ox teve um comportamento

constante, entretanto que Gli-Cit novamente mostra não ser tão efetivo quando sua concentração é aumentada.

Figura 16. Efeito da concentração do DES no pré-tratamento de BLC com DES de Gli sobre a liberação de açúcares (Glicose e Xilose)



Experimentos com temperatura de tratamento de 80 °C, tempo do tratamento de 8 h, carga biomassa / solvente de 5%(m/v).

Fonte: Elaborada pela autora

3.4.5 Uso dos DES e ozonólise no pré-tratamento de BLC

Dos resultados anteriores, foram escolhidos os DES de CC-Cit, CC-Ox, Gli-Cit e Gli-Ox para continuar com os testes aplicando ozônio. As condições para cada um deles são observadas na Tabela 3. Para a ozonólise, foi escolhida a metodologia de ciclos, empregando 3 gramas da biomassa, 2 minutos de tempo de exposição, 2 minutos de tempo de reação e 4 ciclos.

Tabela 3. Condições escolhidas para o tratamento com DES.

Parâmetros	CC -Cit	CC-Ox	Gli-Cit	Gli-Ox
Tempo do tratamento (h)	9	3	9	3
Concentração do DES	25 % (v/v)			
Temperatura do tratamento (°C)	90			
Carga biomassa / solvente	5% (m/v) biomassa / solvente			

Fonte: elaborada pela autora

Quando foram feitos os testes com DES, um dos principais fatores negativos foi a lavagem da biomassa para eliminar o solvente. Por isto, foi necessário testar várias metodologias de lavagem (Tabela 4). Os resultados obtidos para as quatro misturas de DES são apresentados na Tabela 5, em geral, as lavagens tiveram um efeito positivo sobre a biomassa, é possível observar que a quantidade de lignina diminuiu após o tratamento, e as amostras não apresentaram degradação dos carboidratos. Entretanto para as amostras lavadas com soluções etanólicas, a percentagem de recuperação foi maior, além que o conteúdo de lignina ficou maior para estas amostras. Quando foi realizada a lavagem, foi observado que a aparência da biomassa foi de um sólido grudado, permitindo concluir que não foi possível retirar o DES da biomassa, por este motivo, os valores de recuperação são maiores. Os resultados mais importantes são observados com os valores da hidrólise enzimática, em geral, para as amostras que foram lavadas com a metodologia 8 tiveram maiores quantidades de açúcares liberados.

Tabela 4. Metodologias de lavagem testadas para biomassa tratada com DES.

No.	Referência	Lavagem da biomassa	Filtrado
1	(CHEN; WAN, 2018)	Resfriamento da BLC Adição de acetona (50:50) Agitação mecânica 30 min Filtração com vácuo	Evaporação em estufa a 60 °C. Centrifugação 8000 rpm 12 min Lavagem com etanol (1:9 v/v), repetição de 5 vezes. Secagem e pesagem do resíduo
2	(KUMAR; GAUTAM; DUTT, 2016)	Resfriamento da BLC Centrifugação 5000 rpm – 30 min	Adição de água fria 6 vezes volume do DES, Resfriamento 5 °C, 12 h Centrifugação 8000 rpm 12 min lavagem com água fria duas vezes
3		Primeira lavagem com água, segunda e terceira lavagem com NaOH 0.01M	Centrifugação 8000 rpm 12 min
4	Modificação de (CHEN; WAN, 2018)	Primeira lavagem com acetona sem diluição, segunda lavagem com acetona sem diluição, terceira lavagem com água fria.	Centrifugação 8000 rpm 12 min
5	Modificação de (CHEN; WAN, 2018)	Primeira lavagem com etanol sem diluição, segunda lavagem com etanol sem diluição, terceira lavagem com água fria.	Centrifugação 8000 rpm 12 min
6		Primeira lavagem com acetona sem diluição, segunda lavagem com etanol sem diluição, terceira lavagem com água fria	Centrifugação 8000 rpm 12 min
7	(ZHANG; XIA; MA, 2016)	Primeira lavagem com NaOH 0.1 M, segunda lavagem com água fria.	Centrifugação 8000 rpm 12 min
8	(XU et al., 2016)	Lavagem com água quente 85 °C	Centrifugação 8000 rpm 12 min

Fonte: elaborada pela autora

Tabela 5. Resultados de caracterização e de hidrólise enzimática, obtidos para a biomassa tratada com CC-Cit, CC-Ox, Gli-Cit e Gli-Ox e com as metodologias de lavagem

DES	Lavagem	Recuperação de sólidos (%)	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Glicose (mg g ⁻¹ BLC)	Xilose (mg g ⁻¹ BLC)
	Sem tratamento		38,6	14,1	23,9	16,6	7,6
CC - Ox	1	53,2	34,2	14,8	8,6	288,5	36,1
	2	75,5	36,7	13,7	14,3	223,7	41,2
	3	63,3	36,4	13,9	10,1	264,7	39,4
	4	65,1	33,5	15,2	9,2	248,9	33,5
	5	72,8	34,0	12,8	10,8	255,3	35,0
	6	65,7	32,7	16,1	9,1	277,1	27,9
	7	62,8	32,4	14,5	10,5	300,8	35,0
	8	61,7	39,1	15,7	8,9	348,2	55,2
CC -Cit	1	69,3	33,1	13,9	12,6	266,7	33,2
	2	72,7	34,5	14,0	14,9	287,6	39,7
	3	65,4	34,9	13,7	11,3	299,7	25,4
	4	60,9	33,8	12,4	13,6	303,4	22,6
	5	69,7	36,7	13,9	12,8	288,0	30,5
	6	65,8	35,8	14,2	12,9	299,4	38,4
	7	67,2	33,1	13,8	13,5	308,3	34,2
	8	68,4	38,8	15,8	10,3	310,7	41,8
Glic- Ox	1	55,9	36,1	16,7	11,2	264,1	37,4
	2	69,2	36,9	14,8	13,3	288,5	31,5
	3	62,5	35,1	15,7	12,9	248,6	39,0
	4	66,8	36,9	14,6	11,3	299,4	32,8
	5	70,0	37,0	14,5	12,7	302,5	38,1
	6	64,2	36,8	14,9	11,0	300,3	36,6
	7	63,2	37,9	13,8	10,8	320,4	39,9
	8	66,2	38,4	17,2	9,1	335,4	49,7
Gli- Cit	1	65,7	35,7	14,1	13,8	256,1	30,8
	2	72,0	36,0	14,9	13,3	287,4	33,1
	3	66,8	35,7	15,0	12,5	231,0	29,8
	4	67,1	33,7	15,2	13,4	244,9	27,6
	5	71,1	36,0	14,4	12,5	290,1	33,0
	6	66,3	35,4	12,5	12,6	266,4	36,7
	7	66,4	36,7	13,3	13,1	280,4	39,1
	8	67,8	37,9	15,3	12,8	288,3	40,8

Fonte: elaborada pela autora

Uma vez escolhida a lavagem, foram testadas duas concentrações dos DES, em 25 % e 100 % (v/v), para cada uma das quatro misturas de DES, com aplicação da ozonólise (Tabela 6). Primeiramente, para a maioria dos DES baseados em Ox, a recuperação de sólidos foi próxima a 90%, entretanto para os DES com HBD ácido cítrico foi menor, mostrando maior severidade deste tratamento. A caracterização das BLC tratadas e a quantidade de açúcares liberados levam conseguir rendimentos de glicose e xilose importantes para os DES do ácido cítrico. É possível observar como os DES usados tem um efeito importante no conteúdo de hemicelulose, mostrando que aconteceram degradação do carboidrato, por tanto, perda na xilose obtida. Para a glicose, apesar da maior severidade do tratamento, com perda do sólido, foi obtida a maior quantidade de glicose, também com o melhor rendimento de conversão. Em outros estudos já tem sido reportado como a hemicelulose sofre despolimerização para oligômeros e monômeros, entretanto a celulose é recalcitrante e não pode ser facilmente solubilizada nos DES (CHEN; RAGAUSKAS; WAN, 2020).

Tabela 6. Efeito dos pré-tratamentos com DES e ozônio na composição química, rendimentos de conversão de açúcares e rendimentos de sólidos

DES	Concentração	Recuperação de sólidos (%)	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Glicose (mg g ⁻¹)	Xilose (mg g ⁻¹)	Rendimento de Glicose % (m/m)	Rendimento de Xilose % (m/m)
Sem tratamento	-	-	44,1 ± 0,2	15,0 ± 0,5	30,2 ± 1,2	16,6 ± 0,2	7,6 ± 0,5	3,8	4,7
CC-Ox	100%	87,3	36,8±4,2	9,8±2,3	26,5±4,0	241,5±0,3	35,0±1,1	49,0	27,3
CC-Ox	25%	87,2	31,5±0,3	10,2±4,3	27,0±7,8	158,8±1,2	22,1±4,1	49,1	26,7
Gli-Ox	100%	89,6	31,9±1,3	10,5±4,7	24,6±0,3	172,9±1,3	26,3±0,8	45,6	21,0
Gli-Ox	25%	92,2	31,2±5,7	10,6±3,0	25,0±2,5	128,9±2,1	12,4±1,4	37,1	10,1
CC-Cit	100%	55,1	26,8±2,0	3,1±2,4	16,6±4,6	347,3±0,7	46,7±0,7	68,4	90,8
CC-Cit	25%	69,3	27,6±7,0	6,2±1,2	24,0±7,1	320,3±0,1	42,3±1,7	69,6	47,6
Gli-Cit	100%	73,0	29,3±5,1	8,1±2,3	24,0±6,8	275,1±1,5	46,3±3,1	55,1	34,2
Gli-Cit	25%	81,2	32,7±2,6	9,9±2,2	27,9±0,4	204,4±1,2	31,1±2,9	42,2	21,6

Fonte: elaborada pela autora

Com o objetivo de verificar o processo de remoção de lignina, foi realizada sua quantificação no licor obtido após cada tratamento, além de determinar a presença de açúcares no licor (Tabela 7). Com base na composição da BLC após do tratamento, foi determinada a quantidade de perdas dos carboidratos ou remoção da lignina, para todos os casos a hemicelulose apresenta as maiores perdas. No caso da glicose, para DES de Ox as perdas

estiveram entre 27 e 37 %, entretanto, para DES de cit, estiveram entre 39 e 66 %, sendo que para o Gli – Cit foi observada a menor perda, e para CC-Cit ao 100% o maior valor. Para no caso da hemicelulose, foi observado que os DES afetam de forma importante seu conteúdo, apresentando remoções altas, mais importante para os DES do ácido cítrico, resultados similares com outras misturas, têm sido reportados em outros estudos (ALVAREZ-VASCO et al., 2016; CHEN; WAN, 2018). Em quanto a lignina a remoção ficou entre 21 e 69 %, de novo, para os DES baseados no ácido cítrico, foram obtidas as maiores remoções, Alvarez-Vasco et al reporto remoções altas de lignina quando foi utilizado DES de CC-Lac (ALVAREZ-VASCO et al., 2016). Na literatura é possível encontrar numerosos estudos sobre o efeito de HBDs de ácidos carboxílicos na deslignificação de biomassa, neles ácidos como oxálico, láctico, levulínico têm sido os mais pesquisados, sendo proposto que a presença dos prótons e a intensidade das atrações intermoleculares entre o HBA e HBD influenciam a quebra das ligações entre lignina e os carboidratos (CHEN; RAGAUSKAS; WAN, 2020). Adicionalmente, tem sido proposto que os DES baseados em CC podem gerar mais quebras das ligações entre lignina e açúcares, isto devido à tendência dos Cl^- para formar ligações de hidrogênio com as hidroxilas dos açúcares, facilitando a quebra da estrutura lignocelulósica (CHEN; RAGAUSKAS; WAN, 2020)

O licor obtido de cada DES foi analisado para quantificar glicose, xilose e lignina solúvel, em geral, a quantidade dos açúcares presente nos licores é menor ao 7%, excetuando CC-Cit com valores maiores presentes no licor, pelo anterior, é considerado que os açúcares perdidos sofreram degradação, foi confirmado que os DES têm pouca capacidade de dissolução de celulose. Os resultados mostram que os licores obtidos ficaram enriquecidos no heteropolímero, confirmando sua capacidade de extração de lignina, fato importante para ser considerado em processos de extração e purificação de resíduos de lignina. Os resultados de remoção de lignina são maiores para os DES de Cit, entretanto que para os DES de Ox apresentaram maior recuperação de lignina solúvel.

Tabela 7. Efeito dos pré-tratamentos com DES e ozônio na perda de celulose, hemicelulose e remoção de lignina. Composição dos constituintes no licor de tratamento com DES

DES	Concentração	Constituintes	Composição apos tratamento (%)	Perda o Remoção após tratamento (%)	Composição no licor do DES (%)	Perda por degradação (%)
CC-Ox	100%	celulosa	36,8	27,0	1,61	98,39
		hemicelulose	9,8	43,0	5,02	94,98
		lignina	26,5	22,9	60,28	39,72
		cinzas	2,19	N.D.	N.D.	N.D.
CC-Ox	25%	celulosa	31,5	37,6	4,38	95,62
		hemicelulose	10,21	40,6	6,69	93,31
		lignina	26,98	21,6	93,96	6,04
		cinzas	2,56	N.D.	N.D.	N.D.
G-Ox	100%	celulosa	31,9	35,0	2,70	97,30
		hemicelulose	10,4	37,9	0,72	99,28
		lignina	24,6	26,5	47,68	52,32
		cinzas	2,35	N.D.	N.D.	N.D.
G-Ox	25%	celulosa	31,15	34,7	2,88	97,12
		hemicelulose	10,6	34,8	0,41	99,59
		lignina	24,99	23,2	18,99	81,01
		cinzas	2,39	N.D.	N.D.	N.D.
CC-Cit	100%	celulosa	26,8	66,4	3,00	97,00
		hemicelulose	3,11	88,6	22,77	77,23
		lignina	16,6	69,5	28,55	71,45
		cinzas	2,08	N.D.	N.D.	N.D.
CC-Cit	25%	celulosa	27,6	56,5	2,64	97,36
		hemicelulose	6,15	71,6	21,94	98,06
		lignina	24	44,6	13,83	86,17
		cinzas	2,25	N.D.	N.D.	N.D.
Gli-Cit	100%	celulosa	29,3	51,4	0,41	99,59
		hemicelulose	8,13	60,4	5,89	99,10
		lignina	24	41,6	30,57	69,43
		cinzas	2,3	N.D.	N.D.	N.D.
Gli-Cit	25%	celulosa	32,7	39,8	0,33	99,67
		hemicelulose	9,9	46,5	6,33	93,67
		lignina	28	24,4	43,70	56,30
		cinzas	2,25	N.D.	N.D.	N.D.

Fonte: elaborada pela autora

3.5. CONCLUSÕES

O uso dos DES no tratamento de BLC ainda é uma área com grandes possibilidades de estudo, devido as propriedades de cada mistura é possível modular o tipo de DES para melhorar o fracionamento da biomassa e seus componentes. No presente estudo, das misturas testadas, os DES com HBA CC e Gli, e HBD ácido cítrico e ácido oxálico, apresentaram os melhores resultados na liberação de celulose e sua conversão em glicose. Foi evidenciado que estes DES conseguem fracionar a hemicelulose e dissolver fragmentos de lignina. Na literatura, ainda é pouco reportado o uso de ácido cítrico como HBD em tratamento de BLC.

Apesar que foram testadas variáveis importantes como são temperatura, tempo, concentração do DES e carga sólido/solvente, ainda é necessário continuar estudando o efeito de outros fatores como a proporção da água, dos HBDs, misturas ternarias para assim conseguir condições menos severas no tratamento e evitar perda dos carboidratos por degradação.

A preservação da celulose e a extração de hemicelulose e lignina de BLC foi evidenciado no presente estudo, sendo que é uma oportunidade para melhorar os processos extrativos, a identificação de resíduos, a elucidação de possíveis mecanismos e a produção de compostos de maior valor.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, A. P.; CAPPER, G.; DAVIES, D. L.; RASHEED, R. K.; TAMBYRAJAH, V. Novel Solvent Properties of Choline Chloride /Urea Mixtures_Supplementaryinfo. **Chemical Communication**, [s. l.], v. 0, n. 1, p. 70–71, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1039/B210714G>>

AISSAOUI, T.; ALNASHEF, I. M.; HAYYAN, M.; HASHIM, M. A. Neoteric FT-IR investigation on the functional groups of phosphonium-based deep eutectic solvents. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [s. l.], v. 149, n. 11, p. 588–591, 2015.

ALONSO, D.; BAEZA, A.; CHINCHILLA, R.; GÓMEZ LUCAS, C.; GUILLENA, G.; MARSET, X.; PASTOR, I.; RAMÓN, D.; ROS NÍGUEZ, D.; SAAVEDRA, B. Mezclas eutécticas como alternativa sostenible a los disolventes convencionales en Química Orgánica. **Anales de la Real Sociedad Española de Química**, [s. l.], v. 114, n. 2, p. 79–87, 2018. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10045/76541>>

ALVAREZ-VASCO, C.; MA, R.; QUINTERO, M.; GUO, M.; GELEYNSE, S.; RAMASAMY, K. K.; WOLCOTT, M.; ZHANG, X. Unique low-molecular-weight lignin with high purity extracted from wood by deep eutectic solvents (DES): A source of lignin for

valorization. **Green Chemistry**, [s. l.], v. 18, n. 19, p. 5133–5141, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1039/C6GC01007E>>

BHATIA, S. K.; JAGTAP, S. S.; BEDEKAR, A. A.; BHATIA, R. K.; PATEL, A. K.; PANT, D.; RAJESH BANU, J.; RAO, C. V.; KIM, Y. G.; YANG, Y. H. Recent developments in pretreatment technologies on lignocellulosic biomass: Effect of key parameters, technological improvements, and challenges. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 300, n. January, p. 122724, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122724>>

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)>

CARPENTIERI, S.; SOLTANIPOUR, F.; FERRARI, G.; PATARO, G.; DONSI, F. Emerging green techniques for the extraction of antioxidants from agri-food by-products as promising ingredients for the food industry. **Antioxidants**, [s. l.], v. 10, n. 9, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/antiox10091417>>

CASSANAS, G.; MORSSLI, M.; FABRÈGUE, E.; BARDET, L. Vibrational spectra of lactic acid and lactates. **Journal of Raman Spectroscopy**, [s. l.], v. 22, n. 7, p. 409–413, 1991.

CHEN, Z.; RAGAUSKAS, A.; WAN, C. Industrial Crops & Products Lignin extraction and upgrading using deep eutectic solvents. **Industrial Crops & Products**, [s. l.], v. 147, n. February, p. 112241, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112241>>

DA SILVA DELABONA, P.; LIMA, D. J.; ROBL, D.; RABELO, S. C.; FARINAS, C. S.; DA CRUZ PRADELLA, J. G. Enhanced cellulase production by *Trichoderma harzianum* by cultivation on glycerol followed by induction on cellulosic substrates. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 43, n. 5, p. 617–626, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10295-016-1744-8>>

DAI, Y.; WITKAMP, G. J.; VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H. Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 187, p. 14–19, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.123>>

DEL MONTE, F.; CARRIAZO, D.; SERRANO, M. C.; GUTIÉRREZ, M. C.; FERRER, M. L. Deep eutectic solvents in polymerizations: A greener alternative to conventional syntheses. **ChemSusChem**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 999–1009, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/cssc.201300864>>

FERNÁNDEZ-DELGADO, M.; PLAZA, P. E.; COCA, M.; GARCÍA-CUBERO, M. T.; GONZÁLEZ-BENITO, G.; LUCAS, S. Comparison of mild alkaline and oxidative pretreatment methods for biobutanol production from brewer's spent grains. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 130, p. 409–419, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.12.087>>

FRANCISCO, M.; VAN DEN BRUINHORST, A.; KROON, M. C. New natural and renewable low transition temperature mixtures (LTTMs): Screening as solvents for lignocellulosic biomass processing. **Green Chemistry**, [s. l.], v. 14, n. 8, p. 2153–2157, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1039/C2GC35660K>>

FRANCISCO, M.; VAN DEN BRUINHORST, A.; KROON, M. C. Low-transition-temperature mixtures (LTTMs): A new generation of designer solvents. **Angewandte Chemie - International Edition**, [s. l.], v. 52, n. 11, p. 3074–3085, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/anie.201207548>>

GHAEDI, H.; AYOUB, M.; SUFIAN, S.; LAL, B.; UEMURA, Y. Thermal stability and FT-IR analysis of Phosphonium-based deep eutectic solvents with different hydrogen bond donors. **Journal of Molecular Liquids**, [s. l.], v. 242, p. 395–403, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.molliq.2017.07.016>>

GHOSE, T. K. Measurement of Cellulase Activities. **Pure and Applied Chemistry**, [s. l.], v. 59, n. 2, p. 257–268, 1987. Disponível em: <<http://www.iupac.org/publications/pac/1987/pdf/5902x0257.pdf>>

GUO, W.; HOU, Y.; REN, S.; TIAN, S.; WU, W. Formation of deep eutectic solvents by phenols and choline chloride and their physical properties. **Journal of Chemical and Engineering Data**, [s. l.], v. 58, n. 4, p. 866–872, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/je300997v>>

GUTIÉRREZ, M. C.; FERRER, M. L.; MATEO, C. R.; MONTE, F. Del. Freeze-drying of aqueous solutions of deep eutectic solvents: A suitable approach to deep eutectic suspensions of self-assembled structures. **Langmuir**, [s. l.], v. 25, n. 10, p. 5509–5515, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/la900552b>>

HANSEN, B. B.; SPITTLE, S.; CHEN, B.; POE, D.; ZHANG, Y.; KLEIN, M.; HORTON, A.; ADHIKARI, L.; ZELOVICH, T.; DOHERTY, B. W.; GURKAN, B.; MAGINN, E. J.; RAGAUSKAS, A.; DADMUN, M.; ZAWODZINSKI, T. A.; BAKER, G. A.; TUCKERMAN, M. E.; SAVINELL, R. F.; SANGORO, J. R. Deep Eutectic Solvents : A Review of Fundamentals and Applications. **Chemical Reviews**, [s. l.], v. 121, n. 3, p. 1232–1285, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00385>>

HAZ, A.; STRIZINCOVA, P.; MAJOVA, V.; SKULCOVA, A.; JABLONSKY, M. Thermal stability of selecte deep eutectic solvents. **International Journal of Recent Scientific Research**, [s. l.], v. 7, n. 11, p. 14441–14444, 2016.

HONG, S.; LIAN, H.; SUN, X.; PAN, D.; CARRANZA, A.; POJMAN, J. A.; MOTA-MORALES, J. D. Zinc-based deep eutectic solvent-mediated hydroxylation and demethoxylation of lignin for the production of wood adhesive. **RSC Advances**, [s. l.], v. 6, n. 92, p. 89599–89608, 2016. Disponível em: <<http://doi.org/10.1039/C6RA18290A>>

ISCI, A.; KALTSCHMITT, M. Recovery and recycling of deep eutectic solvents in biomass conversions : a review. **Biomass Conversion and Biorefinery**, [s. l.], n. 0123456789, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13399-021-01860-9>>

LIU, Y.; CHEN, W.; XIA, Q.; GUO, B.; WANG, Q.; LIU, S.; LIU, Y.; LI, J.; YU, H. Efficient Cleavage of Lignin–Carbohydrate Complexes and Ultrafast Extraction of Lignin Oligomers from Wood Biomass by Microwave-Assisted Treatment with Deep Eutectic Solvent. **ChemSusChem**, [s. l.], v. 10, n. 8, p. 1692–1700, 2017. Disponível em: <<http://doi.org/10.1002/cssc.201601795>>

LU, W.; LIU, S. Choline chloride–based deep eutectic solvents (Ch-DESSs) as promising green solvents for phenolic compounds extraction from bioresources: state-of-the-art,

prospects, and challenges. **Biomass Conversion and Biorefinery**, [s. l.], 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13399-020-00753-7>>

LYNAM, J. G.; KUMAR, N.; WONG, M. J. Deep eutectic solvents; ability to solubilize lignin, cellulose, and hemicellulose; thermal stability; and density. **Bioresource Technology**, [s. l.], 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.079>>

MAMILLA, J. L. K.; NOVAK, U.; GRILC, M.; LIKOZAR, B. Biomass and Bioenergy Natural deep eutectic solvents (DES) for fractionation of waste lignocellulosic biomass and its cascade conversion to value-added bio-based chemicals. [s. l.], v. 120, n. December 2018, p. 417–425, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.12.002>>

MENON, V.; RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science**, [s. l.], v. 38, n. 4, p. 522–550, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.peccs.2012.02.002>>

MORAIS, E. S.; COSTA, M.; FREIRE, M. G.; FREIRE, C. S. R.; COUTINHO, A. P.; SILVESTRE, A. J. D. Use of Ionic Liquids and Deep Eutectic Solvents in Polysaccharides Dissolution and Extraction Processes towards Sustainable Biomass Valorization. **molecules**, [s. l.], v. 25, n. 16, p. 3652, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/molecules25163652>>

MUSSATTO, S. I. **Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery**. [s.l.] : Elsevier, 2016.

ONG, V. Z.; WU, T. Y.; LEE, C. B. T. L.; CHEONG, N. W. R.; SHAK, K. P. Y. Sequential ultrasonication and deep eutectic solvent pretreatment to remove lignin and recover xylose from oil palm fronds. **Ultrasonics Sonochemistry**, [s. l.], v. 58, n. May, p. 104598, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.05.015>>

PERNA, F. M.; VITALE, P.; CAPRIATI, V. Deep eutectic solvents and their applications as green solvents. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, [s. l.], v. 21, p. 27–33, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2019.09.004>>

PROCENTESE, A.; JOHNSON, E.; ORR, V.; GARRUTO CAMPANILE, A.; WOOD, J. A.; MARZOCHELLA, A.; REHMANN, L. Deep eutectic solvent pretreatment and subsequent saccharification of corncob. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 192, p. 31–36, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.05.053>>

REN, H.; CHEN, C.; WANG, Q.; ZHAO, D.; GUO, S. The properties of choline chloride-based deep eutectic solvents and their performance in the dissolution of cellulose. **BioResources**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 5435–5451, 2016.

SANTANA-MAYOR, Á.; RODRÍGUEZ-RAMOS, R.; HERRERA-HERRERA, A. V.; SOCAS-RODRÍGUEZ, B.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M. Á. Deep eutectic solvents. The new generation of green solvents in analytical chemistry. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 134, p. 116108, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116108>>

SAVI, L. K.; CARPINÉ, D.; WASZCZYNSKYJ, N.; RIBANI, R. H.; HAMINIUK, C. W. I. Influence of temperature, water content and type of organic acid on the formation, stability and properties of functional natural deep eutectic solvents. **Fluid Phase Equilibria**, [s. l.], v.

488, p. 40–47, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fluid.2019.01.025>>

SCHABER, P. M.; COLSON, J.; HIGGINS, S.; THIELEN, D.; ANSPACH, B.; BRAUER, J. Thermal decomposition (pyrolysis) of urea in an open reaction vessel. **Thermochimica Acta**, [s. l.], v. 424, n. 1–2, p. 131–142, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tca.2004.05.018>>

SHEN, X.; CHEN, T.; WANG, H.; MEI, Q.; YUE, F.; SUN, S. Structural and Morphological Transformations of Lignin Macromolecules during Bio-Based Deep Eutectic Solvent (DES) Pretreatment. **ACS Sustainable Chem Eng**, [s. l.], v. 8, n. 5, p. 2130–2137, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b05106>>

SHISHOV, A.; BULATOV, A.; LOCATELLI, M.; CARRADORI, S.; ANDRUCH, V. Application of deep eutectic solvents in analytical chemistry. A review. **Microchemical Journal**, [s. l.], v. 135, p. 33–38, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.07.015>>

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D. NREL/TP-510-42618 analytical procedure - Determination of structural carbohydrates and lignin in Biomass. **Laboratory Analytical Procedure (LAP)**, [s. l.], n. April 2008, p. 17, 2012. Disponível em: <<http://www.nrel.gov/docs/gen/fy13/42618.pdf>>

SMINK, D.; JUAN, A.; SCHUUR, B.; KERSTEN, S. R. A. Understanding the Role of Choline Chloride in Deep Eutectic Solvents Used for Biomass Delignification. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, [s. l.], v. 58, n. 36, p. 16348–16357, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acs.iecr.9b03588>>

SMITH, E. L.; ABBOTT, A. P.; RYDER, K. S. Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications. **Chemical Reviews**, [s. l.], v. 114, n. 21, p. 11060–11082, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/cr300162p>>

TAN, Y. T.; SEAK, A.; CHUA, M.; NGOH, G. C. Bioresource Technology Deep eutectic solvent for lignocellulosic biomass fractionation and the subsequent conversion to bio-based products – A review. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 297, n. November 2019, p. 122522, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122522>>

TANG, X.; ZUO, M.; LI, Z.; LIU, H.; XIONG, C.; ZENG, X.; SUN, Y.; HU, L.; LIU, S.; LEI, T.; LIN, L. Green Processing of Lignocellulosic Biomass and Its Derivatives in Deep Eutectic Solvents. **ChemSusChem**, [s. l.], v. 10, n. 13, p. 2696–2706, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/cssc.201700457>>

TORRES-VALENZUELA, L. S.; BALLESTEROS-GÓMEZ, A.; RUBIO, S. Green Solvents for the Extraction of High Added-Value Compounds from Agri-food Waste. **Food Engineering Reviews**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 83–100, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12393-019-09206-y>>

WANG, S.; PENG, X.; ZHONG, L.; JING, S.; CAO, X.; LU, F.; SUN, R. Choline chloride/urea as an effective plasticizer for production of cellulose films. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 117, p. 133–139, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.08.113>>

WANG, W.; LEE, D. Bioresource Technology Lignocellulosic biomass pretreatment by deep

eutectic solvents on lignin extraction and saccharification enhancement : A review. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 339, n. July, p. 125587, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125587>>

XU, H.; PENG, J.; KONG, Y.; LIU, Y.; SU, Z.; LI, B.; SONG, X.; LIU, S.; TIAN, W. Bioresource Technology Key process parameters for deep eutectic solvents pretreatment of lignocellulosic biomass materials : A review. **Bioresource Technology**, [s. l.], n. March, p. 123416, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123416>>

XU, J.; TOH, C. L.; LIU, X.; WANG, S.; HE, C.; LU, X. Synthesis and self-assembly of donor - Spacer - Acceptor molecules. Liquid crystals formed by single-component “complexes” via Intermolecular hydrogen-bonding interaction. **Macromolecules**, [s. l.], v. 38, n. 5, p. 1684–1690, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/ma047999l>>

ZDANOWICZ, M.; WILPISZEWSKA, K.; SPYCHAJ, T. Deep eutectic solvents for polysaccharides processing. A review. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 200, n. July, p. 361–380, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.07.078>>