



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus Araraquara

Eddyn Gabriel Solorzano Chavez

**PRÉ-TRATAMENTO DE SUBPRODUTOS DE CANA-DE-AÇÚCAR
UTILIZANDO-SE HIDROGENOSULFATO DE TRIETILAMÔNIO:
AVALIAÇÃO DA RECUPERAÇÃO DAS FRAÇÕES DE LIGNINA E
CELULOSE**

Araraquara
2023

Eddyn Gabriel Solorzano Chavez

PRÉ-TRATAMENTO DE SUBPRODUTOS DE CANA-DE-AÇÚCAR
UTILIZANDO-SE HIDROGENOSULFATO DE TRIETILAMÔNIO:
AVALIAÇÃO DA RECUPERAÇÃO DAS FRAÇÕES DE LIGNINA E
CELULOSE

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor junto ao Programa de Pós-Graduação Alimentos Nutrição e Engenharia de Alimentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus Araraquara.

Financiadora: CAPES Código 001

Orientador: Prof. Dr. Fernando Masarin
Coorientador: Prof. Dr. Jorge Fernando Brandão
Pereira

Araraquara
2023

S684p

Solorzano Chavez, Eddyn Gabriel.

Pré-tratamento de subprodutos de cana-de-açúcar utilizando-se hidrogenosulfato de trietilamônio: avaliação da recuperação das frações de lignina e celulose / Eddyn Gabriel Solorzano Chavez. – Araraquara, 2023.

108 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos, Nutrição e Engenharia de alimentos. Área de Concentração em Ciência dos Alimentos.

Orientador: Fernando Masarin.

Coorientador: Jorge Fernando Brandão Pereira.

1. Bagaço e palha de cana-de-açúcar. 2. Hidrogenosulfato de trietilamônio. 3. Pré-tratamento. 4. Polpa celulósica. 5. Hidrólise enzimática. 6. Lignina. I. Masarin, Fernando, orient. II. Pereira, Jorge Fernando Brandão, coorient. III. Título.



ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE EDDYN GABRIEL SOLORZANO CHAVEZ, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - CÂMPUS DE ARARAQUARA.

Aos 21 dias do mês de dezembro do ano de 2023, às 14:00 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de EDDYN GABRIEL SOLORZANO CHAVEZ, intitulada **PRÉ-TRATAMENTO DE SUBPRODUTOS DE CANA- DE- AÇÚCAR UTILIZANDO-SE HÍDROGENOSULFATO DE TRIETILAMÔNIO; AVALIAÇÃO DA RECUPERAÇÃO DAS FRAÇÕES DE LIGNINA E CELULOSE**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. FERNANDO MASARIN (Orientador(a) - Participação Virtual) do Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da Unesp, Prof. Dr. ELIAS DE SOUZA MONTEIRO FILHO (Participação Virtual) do Departamento de Engenharia, Física e Matemática / Instituto de Química - UNESP - Araraquara, Prof. Dr. ALVARO DE BAPTISTA NETO (Participação Virtual) do Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da Unesp, Prof. Dr. BOUTROS SARROUH (Participação Virtual) do Departamento de Química Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos / Universidade Federal de São João Del-Rei. Após a exposição pelo doutorando e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, o discente recebeu o conceito final: Aprovado. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo Presidente da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. FERNANDO MASARIN

Fernando Masarin:28153027808
2023.12.21 17:43:41 -03'00'

Eddyn Gabriel Solorzano Chavez

**PRÉ-TRATAMENTO DE SUBPRODUTOS DE CANA-DE-AÇÚCAR
UTILIZANDO-SE HIDROGENOSULFATO DE TRIETILAMÔNIO:
AVALIAÇÃO DA RECUPERAÇÃO DAS FRAÇÕES DE LIGNINA E
CELULOSE**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor, junto ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos, Nutrição e Engenharia de Alimentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus Araraquara.

Financiador: CAPES Código 001

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Fernando Masarin
UNESP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Câmpus de Araraquara
Orientador

Prof. Dr. Boutros Sarrouh
UFSJ - Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de
Bioprocessos, Campus Alto Paraopeba

Prof. Dr. Elias de Souza Monteiro Filho
UNESP - Instituto de Química, Araraquara-SP

Prof. Dr. Álvaro de Baptista Neto
UNESP - Departamento de Engenharia de Bioprocessos e
Biotecnologia, FCF, Câmpus de Araraquara

Araraquara
21 de dezembro de 2023

A Deus, fonte infinita de sabedoria e guia constante em minha jornada acadêmica,
dedico esta tese como expressão de gratidão pela força que recebi e pelas
oportunidades que me foram concedidas.

Aos meus amados pais, cujo amor incondicional e apoio constante foram alicerces
fundamentais neste caminho. A vocês dedico cada página, cada descoberta e cada
conquista, pois são a inspiração que impulsiona meu crescimento.

À minha querida família, que sempre esteve ao meu lado, compartilhando alegrias e
desafios. Cada membro é uma bênção e um motivo de orgulho. Este trabalho é
também um tributo a vocês, que são minha base sólida.

Que este esforço e aprendizado reverberem em honra a todos que me cercam. Que
cada palavra escrita seja uma expressão de gratidão e amor.

Com carinho e dedicação,
Eddyn Gabriel Solorzano Chavez

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha profunda gratidão a todas as pessoas e instituições que desempenharam um papel crucial na jornada que culminou na conclusão deste doutorado.

Aos meus amados pais e familiares, não há palavras suficientes para expressar minha gratidão. Seu apoio constante, amor e compreensão foram a âncora que sustentou cada desafio e manteve ao longo desta jornada. Vocês são a base de como construí meus sonhos, e por isso, meu sucesso é, em grande parte, resultado da inspiração que vocês proporcionaram.

Ao meu orientador, o Prof. Fernando Masarin. Sua orientação sábia, expertise acadêmica e incentivo constante foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho. Suas contribuições moldaram não apenas a minha pesquisa, mas também o meu crescimento como acadêmico.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Ao Prof. Dr. Jorge Brandão, meu coorientador, agradeço por sua orientação adicional e valiosas contribuições para o desenvolvimento desta tese. Sua expertise e dedicação enriqueceram significativamente o resultado final.

Expresso também meus agradecimentos à Universidade de Coimbra, Departamento de Engenharia Química, em Portugal, pela acolhida calorosa durante minha estadia. A experiência enriquecedora que tive em sua instituição contribuiu imensamente para o amadurecimento acadêmico e pessoal.

Cada um de vocês desempenhou um papel vital no meu percurso acadêmico, e por isso, meus sinceros agradecimentos por fazerem parte desta conquista significativa.

RESUMO

O Brasil dispõe-se de um enorme potencial para atuar em novas matrizes energéticas estabelecidas a partir de fontes renováveis. Para a obtenção de combustíveis renováveis, a partir de subprodutos agroindustriais, é necessário a realização de um pré-tratamento nos materiais lignocelulósicos para desestruturar sua matriz celular e proporcionar maior acesso as enzimas hidrolíticas à fração celulósica. Dentro do âmbito do conceito apresentado o objetivo deste trabalho foi avaliar o fracionamento do bagaço e da palha de cana-de-açúcar com hidrogenosulfato de trietilamônio [TEA][HSO₄] integrado à recuperação das frações de lignina e celulose. A parte experimental envolveu a síntese do [TEA][HSO₄] e sua aplicação no pré-tratamento de subprodutos de cana-de-açúcar (bagaço e palha em suas formas natura e termotratadas). As polpas obtidas foram caracterizadas quimicamente e hidrolisadas enzimaticamente com preparado enzimático *Cellic CTec 2*. Os licores foram recuperados, concentrados e a lignina precipitada. Os pré-tratamentos dos subprodutos de cana-de-açúcar com [TEA][HSO₄] foram seletivos para a remoção de lignina e hemicelulose, resultando em enriquecimento de celulose da polpa recuperada. As polpas celulósicas oriundas dos subprodutos de cana-de-açúcar em suas formas natura após os pré-tratamentos com [TEA][HSO₄] mostraram aumento significativo na conversão de celulose em glicose (atingindo-se 60-80%). A lignina foi precipitada com sucesso resultando em rendimento médio de 75% após 4 horas de pré-tratamento. No entanto, as polpas celulósicas oriundas dos subprodutos de cana-de-açúcar termotratados seguido de pré-tratamento com [TEA][HSO₄] não resultaram em aumento da conversão de celulose em glicose. A caracterização físico-química das ligninas obtidas mostrou que as mesmas sofreram alterações químicas estruturais, todavia, mantendo-se um padrão característico de lignina relatada na literatura. O pré-tratamento dos subprodutos de cana-de-açúcar com [TEA][HSO₄] apresentaram potencial de fracionamento recuperando-se a polpa rica em celulose e a lignina, portanto sendo tecnicamente viável.

Palavras chaves: Bagaço e palha de cana-de-açúcar; Hidrogenosulfato de trietilamônio; Pré-tratamento; Polpa celulósica; Hidrólise enzimática; Lignina.

ABSTRACT

Brazil has a vast potential to engage in new energy matrices established from renewable sources. To obtain renewable fuels from agro-industrial by-products, it is necessary to perform pretreatment on lignocellulosic materials to disrupt the cell matrix and provide greater access to hydrolytic enzymes for cellulosic fraction. Within the scope of the presented concept, the objective of this work was to evaluate the fractionation of sugarcane bagasse and straw with triethylammonium hydrogensulfate [TEA][HSO₄] integrated with the recovery of lignin and cellulose fractions. The experimental part involved the synthesis of [TEA][HSO₄] and its application in the pretreatment of sugarcane by-products (bagasse and straw, both in their natural and thermotreated forms). The obtained pulps were chemically characterized and enzymatically hydrolyzed with the *Cellic CTec 2* enzymatic preparation. The liquors were recovered, concentrated, and lignin was precipitated. [TEA][HSO₄] was successfully synthesized. The pretreatments of different sugarcane by-products with [TEA][HSO₄] were selective for lignin and hemicellulose removal. The pulps recovered after pretreatment with [TEA][HSO₄] were enriched with cellulose. The cellulose pulps from sugarcane by-products in their natural forms after pretreatments with [TEA][HSO₄] showed a significant increase in cellulose conversion to glucose (reaching 60-80%). However, cellulose pulps from thermotreated sugarcane by-products followed by pretreatment with [TEA][HSO₄] did not result in increased cellulose conversion to glucose. Lignin was successfully precipitated, resulting in an average yield of 75% after 4 hours of pretreatment. The physicochemical characterization of the obtained lignins showed that they underwent structural chemical changes while maintaining a characteristic lignin pattern reported in the literature. The pretreatment of sugarcane by-products with [TEA][HSO₄] showed potential for fractionation, recovering the cellulose-rich pulp and lignin, making it technically viable.

Keywords: Sugarcane bagasse and straw; Triethylammonium hydrogensulfate; Pretreatment; Cellulosic pulp; Enzymatic hydrolysis; Lignin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da estrutura de um fragmento de celulose.	19
Figura 2. Modelo de estrutura química de uma xilana de gramínea. Tipos de ligações presentes em uma molécula de xilana.	20
Figura 3. Representação de uma macromolécula de lignina, conforme previsto a partir da análise de lignina baseada em RMN.	21
Figura 4. Esquema mostrando resíduos de ferulato acoplados à lignina de gramíneas. Esquema mostrando resíduos de ferulato e cumarato acoplados à lignina de gramíneas.	22
Figura 5. (A) Corte ilustrativo do sistema de camadas na parede das células de madeira. (B) Microscopia eletrônica de transmissão das células de madeira mostrando as camadas da parede celular: ML = lamela média, P = parede primária, S1 = parede secundária, S2 = parede secundária e T = parede terciária	23
Figura 6. (A) Microscopia eletrônica de lignocelulósico. (B) Modelo didático que explica como as microfibras de celulose estão organizadas e encaixadas em uma matriz de hemicelulose e lignina presente em um lignocelulósico	24
Figura 7. Síntese do hidrogenosulfato de trietilamina ([TEA] [HSO ₄]) a partir de trietilamina e ácido sulfúrico.	25
Figura 8. Modo de ação das enzimas do complexo celulolítico de <i>Trichoderma reesei</i>	28
Figura 9. Equipamento composto de 4 reatores individuais de aço inoxidável	30
Figura 10. Espectro de RMN- 1H do [TEA][HSO ₄].	39
Figura 11. Bagaço de cana-de-açúcar em sua forma natura (tempo zero, 0h) e polpas recuperadas em função do tempo de reação após diferentes tempos de pré-tratamento com [TEA][HSO ₄].	42
Figura 12. Remoção dos componentes e rendimento em função do tempo de pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar em sua forma natura com [TEA][HSO ₄]. A barra do desvio padrão pode não ser visualizada quando for menor que o tamanho do marcador.	43

Figura 13. Bagaço de cana-de-açúcar termotratado (tempo zero, 0h) e polpas recuperadas após pré-tratamento com [TEA][HSO ₄] em diferentes tempos de reação.	46
Figura 14. Remoção dos componentes e rendimento em função do tempo de pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar termotratado e pré-tratado com [TEA][HSO ₄]. A barra do desvio padrão pode não ser visualizada quando for menor que o tamanho do marcador.	47
Figura 15. Palha de cana-de-açúcar em sua forma natura (tempo zero, 0 h) e polpas recuperadas após diferentes tempos de pré-tratamento com [TEA][HSO ₄].	50
Figura 16. Remoção dos componentes e rendimento em função do tempo de pré-tratamento de palha de cana-de-açúcar in natura com [TEA][HSO ₄]. A barra do desvio padrão pode não ser visualizada quando for menor que o tamanho do marcador.	51
Figura 17. Palha de cana-de-açúcar termotratada (tempo zero, 0 h) e polpas recuperadas após pré-tratamento com [TEA][HSO ₄] em diferentes tempos de reação	55
Figura 18. Remoção dos componentes e rendimento em função do tempo de pré-tratamento de palha de cana-de-açúcar termotratada e pré-tratada com [TEA][HSO ₄]. A barra do desvio padrão pode não ser visualizada quando for menor que o tamanho do marcador.	56
Figura 19. Hidrólise enzimática em função do tempo de pré-tratamento de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas natura e termotratadas com [TEA][HSO ₄] utilizando preparado enzimático comercial <i>Cellic CTec II</i> (Novozymes). A barra do desvio padrão pode não ser visualizada quando for menor que o tamanho do marcador.	57
Figura 20. Licores oriundos de bagaço de cana-de-açúcar em sua forma natura após pré-tratamento com [TEA][HSO ₄] por 6 h. (a) Licor concentrado. (b) Licor diluído e precipitação da lignina.	59
Figura 21. Espectros de varreduras na região do ultravioleta (UV) do licor concentrado e diluído após precipitação da lignina por diferentes tempos de pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar em sua forma natura com [TEA][HSO ₄].	60

Figura 22. Espectro de varreduras na região do ultravioleta (UV) do licor concentrado e diluído obtido após precipitação da lignina por diferentes tempos de pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar termotratado com [TEA][HSO ₄].	61
Figura 23. Espectro de varreduras na região do ultravioleta (UV) do licor concentrado e diluído após precipitação da lignina por obtido após diferentes tempos de pré-tratamento de palha de cana-de-açúcar em sua forma natura com [TEA][HSO ₄].	62
Figura 24. Espectros de varreduras na região do ultravioleta (UV) do licor concentrado e diluído obtido após precipitação da lignina por diferentes tempos de pré-tratamento de palha de cana-de-açúcar termotratada com [TEA][HSO ₄].	63
Figura 25. Rendimento de recuperação de lignina em função do tempo de pré-tratamento de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas natura e termotratada seguido de pré-tratamento com [TEA][HSO ₄].	64
Figura 26. Ligninas recuperadas de bagaço de cana-de-açúcar em sua forma natura após pré-tratamento com [TEA][HSO ₄] em diferentes tempos de reação.	65
Figura 27. Ligninas recuperadas de bagaço de cana-de-açúcar termotratado após pré-tratamento com [TEA][HSO ₄] em diferentes tempos de reação.	65
Figura 28. Ligninas recuperadas de palha de cana-de-açúcar em sua forma natura após pré-tratamento com [TEA][HSO ₄] em diferentes tempos de reação.	66
Figura 29. Ligninas recuperadas de palha de cana-de-açúcar termotratada após pré-tratamento com [TEA][HSO ₄] em diferentes tempos de reação.	66
Figura 30. Perfil de açúcares monoméricos, produtos de desidratação e ácidos carboxílicos da fração líquida após o pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos com [TEA][HSO ₄]. (a) Bagaço de cana-de-açúcar em sua forma natura. (b). Palha de cana-de-açúcar em sua forma natura	67
Figura 31. Perfil de açúcares monoméricos, produtos de desidratação e ácidos carboxílicos da fração líquida após o pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos com [TEA][HSO ₄]. (a) Bagaço de cana-de-açúcar	69

termotratado. (b). Palha de cana-de-açúcar termotratada.

Figura 32. Teor de lignina total em função do tempo de pré-tratamento de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas natura com [TEA][HSO₄]. A barra do desvio padrão pode não ser visualizada quando for menor que o tamanho do marcador 71

Figura 33. Lignina total em função do tempo de pré-tratamento de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas termotratadas com [TEA][HSO₄] por diferentes tempos. A barra do desvio padrão pode não ser visualizada quando for menor que o tamanho do marcador. 74

Figura 34. Atribuições de bandas de absorção na região do infravermelho médio (FTIR-ATR) de ligninas obtidas de bagaço de cana-de-açúcar em sua forma natura pré-tratada com [TEA][HSO₄] em diferentes tempos 75

Figura 35. Atribuições de bandas de absorção na região do infravermelho médio (FTIR-ATR) de ligninas obtidas de palha de cana-de-açúcar em sua forma natura pré-tratada com [TEA][HSO₄]. 76

Figura 36. Atribuições de bandas de absorção na região do infravermelho médio (FTIR-ATR) para ligninas obtidas de bagaço de cana-de-açúcar em sua forma termotratada e posteriormente pré-tratado com [TEA][HSO₄]. 77

Figura 37. Atribuições de bandas de absorção na região do infravermelho médio (FTIR-ATR) de para ligninas obtidas de palha de cana-de-açúcar e sua forma termotratada com [TEA][HSO₄]. 78

Figura 38. Curva termogravimétrica (TG) de decomposição de ligninas obtidas de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas natura seguido de pré-tratamento com [TEA][HSO₄]. (a) Bagaço de cana-de-açúcar. (b) Palha de cana-de-açúcar 80

Figura 39. Curva termogravimétrica (TG) de decomposição de ligninas obtidas de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas termotratadas seguido de pré-tratamento com [TEA][HSO₄]. (a) Bagaço de cana-de-açúcar. (b) Palha de cana-de-açúcar. 82

Figura 40. Perfil de distribuição de massa molar (Kd) em função da absorbância em 280 nm de ligninas obtidas de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas naturais seguidas de pré-tratamento com [TEA][HSO₄]. (a) Bagaço de cana-de-açúcar. (b) Palha de cana-de-açúcar 90

Figura 41. Perfil de distribuição de massa molar (Kd) em função da absorbância em 280 nm de ligninas obtidas de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas termotratadas seguidas de pré-tratamento com [TEA][HSO₄]. (a) Bagaço de cana-de-açúcar. (b) Palha de cana-de-açúcar. 92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição química e rendimento de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com [TEA][HSO ₄] por diferentes tempos. Teores apresentados em porcentagem (grama/100 gramas de material bruto, dados em base seca).	41
Tabela 2. Composição química e rendimento de bagaço de cana-de-açúcar previamente termotratado após e pré-tratamentodo com [TEA][HSO ₄] por diferentes tempos. Teores apresentados em porcentagem (grama/100 gramas de material bruto, dados em base seca).	44
Tabela 3. Composição química e rendimento de palha de cana-de-açúcar pré-tratada com [TEA][HSO ₄] por diferentes tempos. Teores apresentados em porcentagem (grama/100 gramas de material bruto, dados em base seca).	49
Tabela 4. Composição química e rendimento de palha de cana-de-açúcar termotratada e pré-tratada com [TEA][HSO ₄] por diferentes tempos. Teores apresentados em porcentagem (grama/100 gramas de material bruto, dados em base seca).	53
Tabela 5. Composição química de ligninas obtidas de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas natura após pré-tratamento com [TEA][HSO ₄] por diferentes tempos. Teores apresentados em porcentagem (grama/100 gramas de material bruto, dados em base seca).	69
Tabela 6. Composição química de ligninas obtidas de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas termotratadas após pré-tratamento com [TEA][HSO ₄] por diferentes tempos. Teores apresentados em porcentagem (grama/100 gramas de material bruto, dados em base seca)	72
Tabela 7. Atribuições de bandas de absorção na região do infravermelho médio (FTIR-ATR) para materiais lignocelulósicos.	79

Tabela 8. Análise elementar (C/H/O/N/S), fórmula empírica C ₉ e massa molar da fórmula C ₉ das ligninas obtidas de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas natura seguido de pré-tratamento com [TEA][HSO ₄] por diferentes tempos. Resultados reportados em porcentagem (grama//100 gramas de material bruto, dados em base seca).	86
Tabela 9. Análise elementar (C/H/O/N/S), fórmula empírica C ₉ e massa molar da fórmula C ₉ das ligninas obtidas de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas termotradas seguido de pré-tratamento com [TEA][HSO ₄] por diferentes tempos. Resultados reportados em porcentagem (grama//100 gramas de material bruto, dados em base seca).	89
Tabela 10. Massa molecular média de ligninas obtidas de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas natura seguido de pré-tratamento do com [TEA][HSO ₄] por diferentes tempos.	93
Tabela 11. Massa molecular média de ligninas obtidas de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas termotratada seguido de pré-tratado com [TEA][HSO ₄] por diferentes tempos.	94
Tabela 12. Absortividade, OH fenólico e carbonilas de ligninas de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas natura seguido de pré-tratamento com [TEA][HSO ₄] por diferentes tempos.	95
Tabela 13. Absortividade, OH fenólico e carbonilas de ligninas de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas termotratada seguido de pré-tratamento com [TEA][HSO ₄] por diferentes tempos.	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2G	Bioetanol celulósico
LIs	Líquidos iônicos
XyG	Xiloglucanos
GAX	Glucuronoarabinosilanos
MN	Mananos
H	p-hidroxifenilas
G	Guaiacilas
S	Siringilas
HMF	Hidroximetilfurfural
CBH	Celobiohidrolase
EC	Celobiase
RMN-H	Ressonância magnética nuclear de próton
DMSO	Dimetilsulfóxido
UV	Radiação ultravioleta
FTIR	Espectrometria no infravermelho com transformada de fourier
TG	Análise Termogravimétrica
Kd	Distribuição de massa molar
Mn	Massa molar média numérica
Mw	Massa molar média
PDI	Polidispersidade

LISTA DE SÍMBOLOS

[TEA][HSO₄]	Hidrogenosulfato de trietilamônio
L.ha⁻¹	Litros por hectare
mL	Mililitros
m/v	Massa por volume
h	hora
mol	Mol
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
v/v	Volume por volume
cm	centímetro
g.L⁻¹cm⁻¹	Gramos por litro por centímetro
W / m²	Potência por área
m/m	Massa por massa
C₉	Fórmula da lignina
C	Carbono
H	Hidrogênio
O	Oxigênio
N	Nitrogênio
S	Enxofre

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVO	17
2.1	Objetivo geral	17
2.2	Objetivos específicos	17
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1	Biomassa agroindustrial	18
3.2	Principais constituintes dos subprodutos agrícolas e agroindustriais	18
3.2.1	Celulose	18
3.2.2	Hemicelulose	19
3.2.3	Lignina	20
3.2.4	Bagaço e palha de cana-de-açúcar	21
3.3	Pré-tratamento de materiais lignocelulósicos com [TEA][HSO ₄]	24
3.4	Hidrólise enzimática de celulose	26
4	MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1	Obtenção dos materiais	29
4.2	Pré-tratamento hidrotérmico da palha e do bagaço de cana-de-açúcar	29
4.3	Síntese de [TEA][HSO ₄]	30
4.4	Ressonância magnética nuclear (RMN-H) de [TEA][HSO ₄]	31
4.5	Pré-tratamento de palha e bagaço de cana-de-açúcar com [TEA][HSO ₄]	32
4.6	Precipitação de lignina e recuperação da fração líquida e precipitação de lignina	32
4.7	Determinação dos teores de lignina e carboidratos	33
4.8	Caracterização química e estrutural das ligninas	34
4.9	Determinação de atividade de celulasas	37
4.10	Hidrólise enzimática com celulasas comerciais na polpa celulósica oriunda dos pré-tratamentos com [TEA][HSO ₄]	37

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1	Síntese de [TEA][HSO ₄]	39
5.2	Pré-tratamentos de subprodutos de bagaço de cana-de-açúcar com [TEA][HSO ₄]	40
5.3	Pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar com [TEA][HSO ₄] e caracterização química das polpas celulósicas obtidas	40
5.4	Pré-tratamento de palha de cana-de-açúcar com [TEA][HSO ₄] e caracterização química das polpas celulósicas obtidas	47
5.5	Hidrólise enzimática das polpas celulósicas recuperadas dos subprodutos de cana-de-açúcar após pré-tratamentos com [TEA][HSO ₄]	55
5.6	Obtenção das ligninas da fração líquida dos subprodutos de cana-de-açúcar após os pré-tratamentos com [TEA][HSO ₄]	57
5.7	Determinação da formação de compostos das frações líquidas obtidas dos subprodutos de cana-de-açúcar após os pré-tratamentos com [TEA][HSO ₄]	65
5.8	Caracterização química e estrutural das ligninas obtidas dos subprodutos de cana-de-açúcar após pré-tratamento com [TEA][HSO ₄]	68
5.8.1	Caracterização química	68
5.8.2	Espectroscopia de infravermelho com transformada de fourier com reflectância total atenuada (FTIR-ATR)	74
5.8.3	Análise termogravimétrica (TG)	80
5.8.4	Análise elementar e fórmula C ₉	83
5.8.5	Determinação da massa molar	88
5.8.6	Determinação de OH fenólico, carbonilas e absorvidade	94
6	CONCLUSÃO	98
7	REFERÊNCIAS	99

1. INTRODUÇÃO

Atualmente o uso extensivo de combustíveis fósseis tornou-se uma grande preocupação mundial, pois resulta na emissão de gases tóxicos que resultam a vários problemas ambientais. Além disso, nos últimos anos o mercado internacional apresentou um aumento substancial nos preços dos combustíveis fósseis. Esses fatos justificam a pesquisa científica para o uso eficiente de fontes renováveis para produção de biocombustíveis (ELGHARBAWY et al., 2016; GEORGE et al., 2014; LOLA et al., 2013). Nesse cenário, o Brasil tem uma excelente oportunidade para atuar em novas matrizes energéticas associadas à produção de biocombustíveis e produtos químicos através de fontes renováveis (MEINITA; HONG; JEONG, 2012; MENDES et al., 2011; SANTOS et al., 2012). A biomassa vegetal, de fontes variadas, é amplamente distribuída como subprodutos agroindustriais, como por exemplo, o bagaço e a palha de cana-de-açúcar que são fontes que tem potencial sustentável para a conversão em bioetanol e outros produtos de alto valor agregado (BRANDT et al., 2013; CHEN et al., 2015).

A cana-de-açúcar é considerada uma alternativa para o setor de biocombustíveis, devido ao grande potencial para a produção de bioetanol. Além da produção de bioetanol e açúcar, as unidades de produção têm buscado operar com maior eficiência, inclusive com cogeração de energia elétrica, auxiliando na redução dos custos e contribuindo para a sustentabilidade da atividade (PENG et al., 2012; RAGANATI et al., 2013). O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, sendo que o aumento da demanda mundial por bioetanol oriundo de fontes renováveis, aliado às grandes áreas cultiváveis e condições edafoclimáticas favoráveis à cana-de-açúcar, tornam o Brasil um país promissor para a exportação desse bioproduto e seus derivados (PENG et al., 2012; RAGANATI et al., 2013).

De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2023), somente na safra 2023/24, foram obtidos 652,9 milhões de toneladas de cana-de-açúcar. A produção brasileira de etanol na safra 2023/24, foi acima de 33,8 bilhões de litros, com uma redução de 7,8% em razão da preferência pela produção de açúcar. Apesar do aumento no consumo de gasolina no ano de 2022, os preços favoráveis do açúcar incentivaram a produção deste produto em detrimento ao etanol.

O governo do estado de São Paulo criou uma lei estadual proibindo gradativamente a queima da palha de cana-de-açúcar no campo, além disso, disponibilizou recursos para viabilizar os queimadores das termoeletricas das usinas de açúcar-etanol (RIBEIRO; FICARELLI, 2010). Atualmente em média 80% do bagaço de cana-de-açúcar é queimado nas termoeletricas para cogeração de energia o que é fundamental para a viabilidade do processo de produção de açúcar-etanol. Desta forma, o bagaço e a palha de cana-de-açúcar podem ser melhores aproveitados (principalmente a palha que não é mais queimada no campo). Um exemplo seria a produção de bioetanol 2G (etanol celulósico) a partir de palha de cana-de-açúcar, que gera um “resíduo final” (rico em lignina) após a etapa de hidrólise enzimática que pode ser misturado ao bagaço e queimado para cogeração de energia, desta forma, proporcionando maior valor agregado à palha de cana-de-açúcar. Além disso, a utilização de bagaço e da palha de cana-de-açúcar pode aumentar substancialmente a produção de bioetanol sem aumentar a área de cultivo de cana-de-açúcar (FERREIRA-LEITAO et al., 2010; SANTOS et al., 2012).

Entretanto, o emprego de bagaço e palha de cana-de-açúcar para a produção de bioetanol 2G fica limitado devido à complexidade da estrutura desses materiais, que possuem como principais constituintes a celulose, hemicelulose e lignina (WAN et al., 2015). Desta forma, para ser possível a produção de bioetanol 2G a partir de bagaço e palha de cana-de-açúcar torna-se necessário a realização de um pré-tratamento para desestruturar a matriz celular do material para proporcionar acesso as enzimas hidrolíticas à fração celulósica. A etapa de pré-tratamento do processo de produção de bioetanol 2G é o principal gargalo desta tecnologia. Atualmente os principais pré-tratamentos utilizados em bagaço e palha de cana-de-açúcar são ácidos, bases e explosão a vapor. Os pré-tratamentos com ácido sulfúrico e/ou explosão a vapor não proporcionam uma disponibilidade suficiente da celulose sem a sua prévia degradação, sendo a eficiência da hidrólise enzimática da celulose limitada. Além disso, pré-tratamentos ácidos causam corrosão nos equipamentos (SANTOS et al., 2012; SANTOS et al., 2018). Em relação ao pré-tratamento alcalino é mais efetivo, porém, gera um efluente que não pode ser aproveitado totalmente devido à baixa carga de matéria orgânica, sendo necessário o tratamento do mesmo para o descarte (MENDES et al., 2011; SANTOS et al., 2012). Atualmente estudos recentes estão explorando novos produtos para serem aplicados em pré-tratamentos

de materiais lignocelulósicos. Dentre estes, destacam-se os líquidos iônicos (LIs), que podem ser uma alternativa para disponibilizar a lignina e tornar a celulose disponível para ser hidrolisada enzimaticamente. O pré-tratamento com LIs é uma tecnologia recente que proporciona a desestruturação dos materiais lignocelulósicos com sais de baixo ponto de fusão. Os LIs se destacam através da obtenção de altos rendimentos e seletividade sobre as frações de hemicelulose e lignina. Além disso, os LIs podem ser recuperados após o pré-tratamento, sendo uma alternativa que pode viabilizar este processo (BRANDT-TALBOT et al., 2017; GSCHWEND et al., 2016).

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho é avaliar o fracionamento de bagaço e palha de cana-de-açúcar com hidrogenosulfato de trietilamônio [TEA][HSO₄] integrado à recuperação das frações de lignina e celulose. Para isso foram definidos os seguintes objetivos específicos.

2.2. Objetivos específicos

- Sintetizar o líquido iônico [TEA][HSO₄];
- Determinar condições ótimas de processo para selecionar variáveis de operação (tempo) no pré-tratamento de bagaço e palha de cana-de-açúcar (em suas formas natura e termotrada) com [TEA][HSO₄];
- Recuperar as frações: sólida (polpa celulósica) e líquida (licor) após o pré-tratamento com [TEA][HSO₄];
- Caracterizar quimicamente e hidrolisar enzimaticamente as polpas celulósicas recuperadas anteriormente;
- Precipitar a lignina do licor recuperado anteriormente, recuperar as ligninas e caracterizá-las quimicamente e estruturalmente;
- Avaliar o potencial técnico de obtenção da polpa de celulose e da lignina via pré-tratamento de subprodutos de cana-de-açúcar com [TEA][HSO₄];

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Biomassa agroindustrial

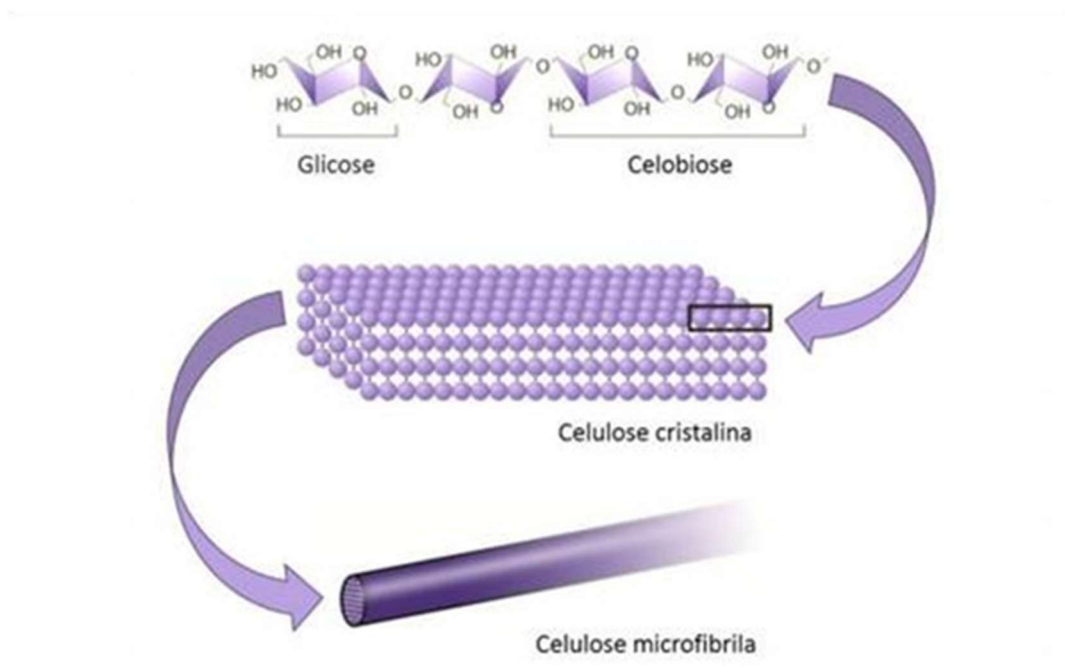
O Brasil, um dos maiores produtores agrícolas do mundo, gera quantidades significativas de subprodutos de biomassa em atividades decorrentes da colheita e transformação de produtos como arroz, algodão, cana-de-açúcar, milho, soja, dentre outros. Subprodutos agrícolas são oriundos da fase do cultivo de determinadas espécies, enquanto os subprodutos agroindustriais resultam do processamento industrial de biomassa (VICTOR et al., 2018). Três diferentes subprodutos sólidos são produzidos no processamento da cana-de-açúcar: palha (durante a colheita), bagaço e torta de filtro (no processo de bioetanol) (SCARAMUCCI et al., 2006).

3.2. Principais constituintes dos subprodutos agrícolas e agroindustriais

3.2.1. Celulose

A estrutura da celulose pode ser classificada em três níveis organizacionais. O primeiro é definido pela sequência de resíduos β -D-glicopiranosídicos unidos por ligações covalentes, formando o homopolímero de anidroglicose com ligações do tipo β -D (1 $\rightarrow$ 4) glicosídicas (Figura 1), de fórmula geral $(C_6H_{10}O_5)_n$. O segundo nível descreve a conformação molecular, isto é, a organização espacial das unidades repetitivas, sendo caracterizado pelas distâncias das ligações e respectivos ângulos e pelas ligações de hidrogênio intramoleculares (Figura 1). O terceiro nível define a associação das moléculas, formando agregados com uma determinada estrutura cristalina. Estes agregados conferem elevada resistência à tensão, tornando a celulose insolúvel em água e em um grande número de solventes orgânicos (Figura 1) (SANTOS et al., 2012).

Figura 1. Representação da estrutura de um fragmento de celulose.



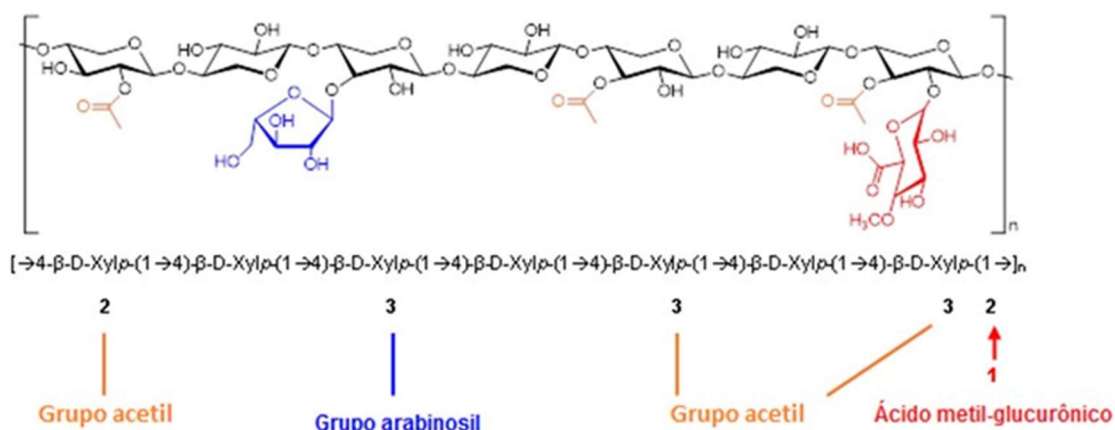
Fonte: (FONSECA et al., 2016).

3.2.2. Hemicelulose

As hemiceluloses, também denominadas de polioses, são polissacarídeos constituintes da parede celular das plantas, as quais ocupam segunda posição de polímero renovável mais abundante nos materiais lignocelulósicos, depois da celulose. Elas representam um tipo de polissacarídeo linear de menor grau de polimerização (100-200 unidades) contendo grupos pendentes. A estrutura complexa contém como constituintes a xilose, glicose, manose, galactose, arabinose, ramnose, ácido metil-glucurônico e ácido galacturônico, em variadas quantidades, dependendo da fonte do vegetal (PAZ-CEDENO et al., 2022; PENG et al., 2012; SANTOS et al., 2012). As hemiceluloses são normalmente ligadas covalentemente a outros componentes da parede celular dos lignocelulósicos como a lignina e compostos fenólicos (PENG et al., 2012). As principais hemiceluloses encontradas em plantas são os xiloglucanos (XyG), os glucuronoarabinoxilanos (GAX) e os mananos (MN). A maioria das plantas de folhosas possui o XyG como hemicelulose principal. Entretanto, as gramíneas apresentam como principal hemicelulose os glucuronoarabinoxilanos (GAX) (FONSECA et al., 2016; PENG et al., 2012) (Figura 2), embora também possuam, em pequenas proporções,

xiloglucanos e mananos. Além dos GAX, os β - glucanos também são encontrados em tecidos de cana-de-açúcar (PAZ-CEDENO et al., 2022; PENG et al., 2012).

Figura 2. Modelo de estrutura química de uma xilana de gramínea. Tipos de ligações presentes em uma molécula de xilana.

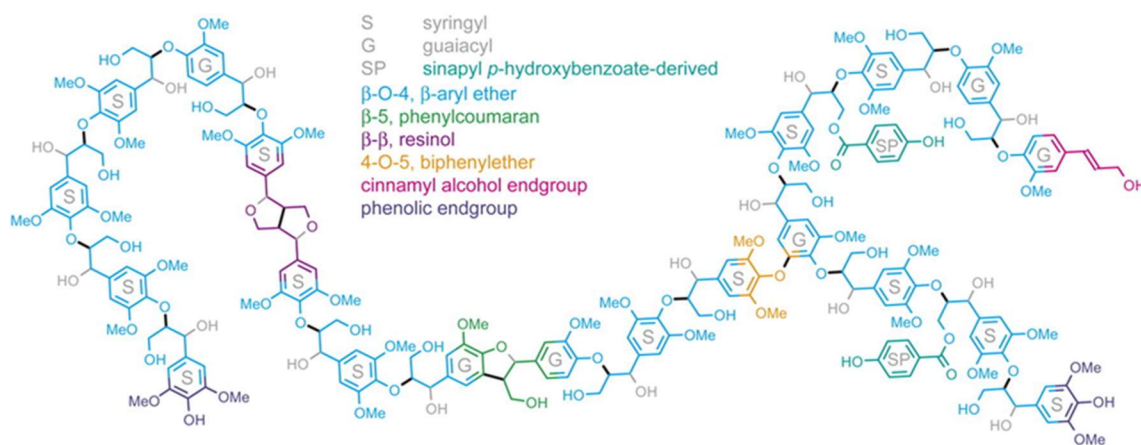


Fonte: (PAZ-CEDENO et al., 2022).

3.2.3. Lignina

A lignina é uma macromolécula amorfa complexa constituída de unidades de fenilpropano derivadas de três unidades monoméricas básicas: p-hidroxifenilas (H), guaiacilas (G), e siringilas (S) que variam em quantidade entre as espécies e de acordo com o tipo de tecido das células. A lignina é uma macromolécula formada pela polimerização desidrogenativa de álcoois hidroxicinâmicos (p-cumarílico, coniferílico e sinapílico). Devido ao processo de polimerização ser aleatório, a macromolécula de lignina possui estrutura bastante complexa, como mostra o modelo da Figura 3 (LEE et al., 2009)

Figura 3. Representação de uma macromolécula de lignina, conforme previsto a partir da análise de lignina baseada em RMN.



Fonte: (LEE et al., 2009).

A estrutura da lignina não é homogênea uma vez que se apresenta na forma amorfa com estrutura globular (SANTOS et al., 2012; ZHANG et al., 2016). A hipótese da estrutura de lignina surge a partir da polimerização dos radicais fenil (ligação do tipo éter β -O-4 ligado são as mais comuns) formados através da ação de enzimas oxidativas na parede celular. As ligninas de madeira de folhosas são predominantes G e S com vestígios de unidades H. As ligninas de madeira de coníferas são maioritariamente compostas por unidades G (STEWART et al., 2009; ZHANG et al., 2016), enquanto que as gramíneas (exemplo: palha de milho, palha e bagaço de cana-de-açúcar) incorporam quantidades equivalentes de unidades G e S, juntamente com quantidades significativamente mais elevadas de unidades H (STEWART et al., 2009).

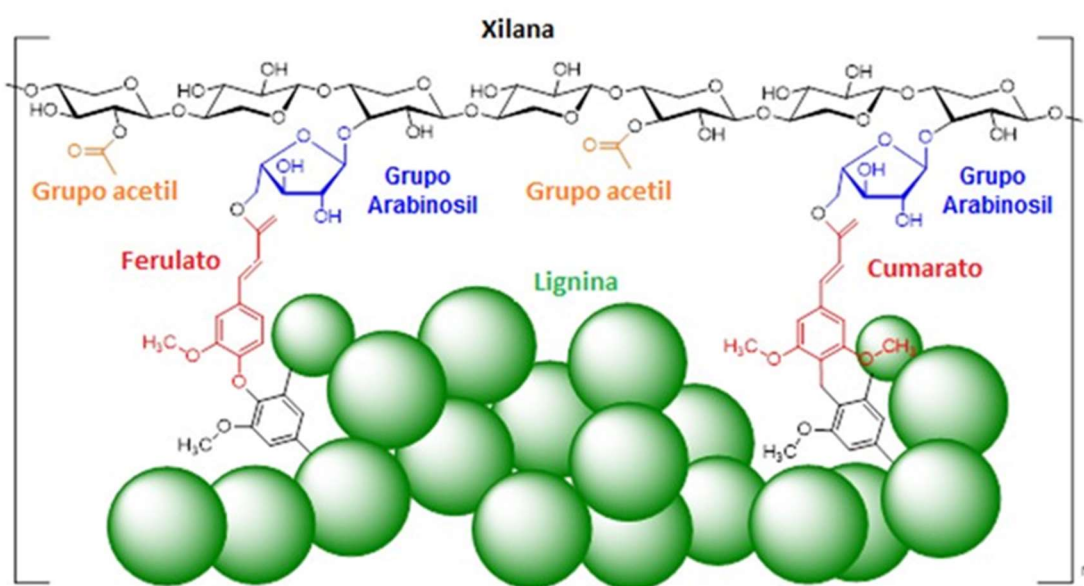
3.2.4. Bagaço e palha de cana-de-açúcar

Em média 80% do bagaço de cana-de-açúcar é queimado/oxidado pelas usinas para cogeração de energia. Desta forma, o bagaço em excesso (em torno de 20% do montante) e a palha de cana-de-açúcar, podem ser utilizadas para a produção de bioetanol 2G. Assim, o rendimento de bioetanol por hectare de cana-de-açúcar poderia aumentar de 6000 L.ha⁻¹ para 10000 L.ha⁻¹. A produção de bioetanol 2G a partir de bagaço e palha de cana-de-açúcar também pode ser integrada a uma usina de etanol 1G de primeira geração já existente, resultando em

menores investimentos e custos de transporte (MARTINS et al., 2008; SANTOS et al., 2012).

O bagaço e a palha de cana-de-açúcar têm uma estrutura e composição química altamente complexa. A microestrutura está ligada a substâncias de baixa massa molecular que incluem substâncias orgânicas e inorgânicas. Entretanto, a macroestrutura compreende à celulose, hemicelulose e lignina (BORTOLAZZO, 2011; MOHAN et al., 2006). A lignina em gramíneas encontra-se intimamente ligada a hemicelulose através dos ácidos ferúlico e p-cumárico. Esses ácidos fenólicos encontram-se ligados no carbono 5 de uma molécula de arabinose, por uma ligação do tipo éster. O grupo arabinosil está acoplado à hemicelulose (xilana) através de uma ligação do tipo éter (Figura 4) (DEL RÍO et al., 2015; RABELO, 2010; SZCZERBOWSKI et al., 2014). A lignina está conectada aos ácidos fenólicos através de cadeias propanóicas no carbono α , sendo essas ligações do tipo éter. Os ácidos fenólicos são acoplados na lignina via processos radicalares (DEL RÍO et al., 2015; PIN et al., 2021). No entanto, os ácidos ferúlico e p-cumárico são somente acoplados a monômeros (alcoóis coníferílico e sinapílico) e não a oligômeros de lignina, sendo sua principal função atuar como pontos de nucleação na biossíntese de lignina em gramíneas (MARTONE et al., 2009).

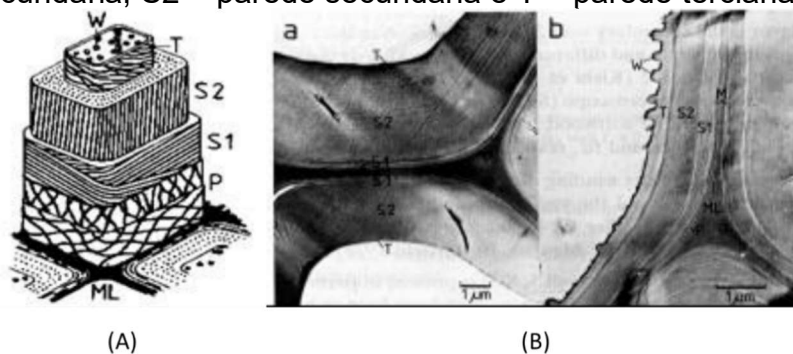
Figura 4. Esquema mostrando resíduos de ferulato acoplados à lignina de gramíneas. Esquema mostrando resíduos de ferulato e cumarato acoplados à lignina de gramíneas.



Fonte: (PAZ-CEDENO et al., 2022).

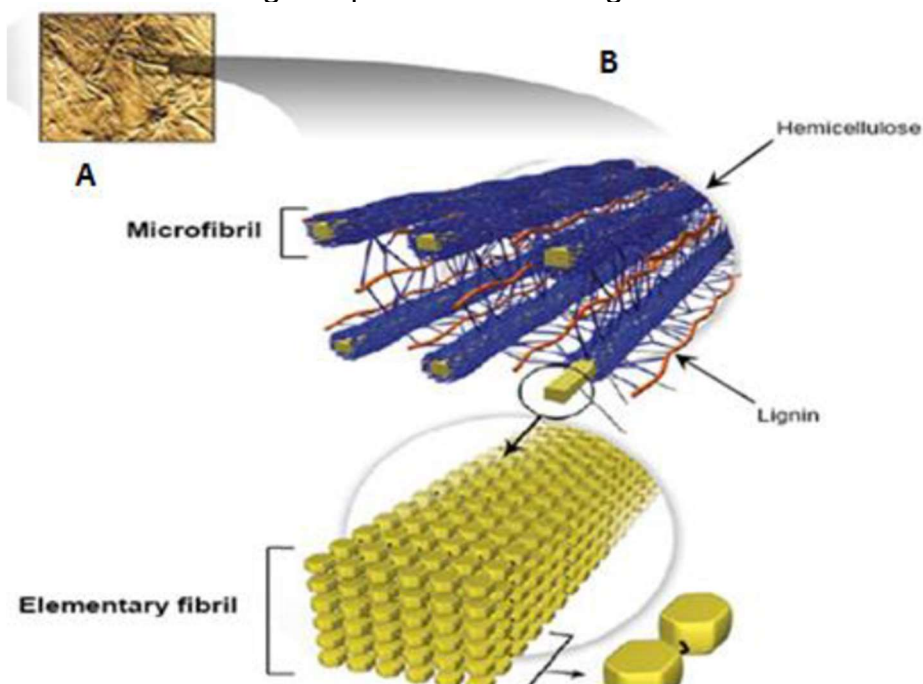
É importante ressaltar que os componentes do bagaço e da palha de cana-de-açúcar se encontram intimamente associados, para assim constituir o complexo celular da biomassa vegetal. Na parede celular do vegetal, tais compostos se organizam formando diferentes camadas. Desde a lamela média (LM) até o lúmen da célula, encontram-se as paredes primária (P), secundária, formada pelas camadas S1, S2 e terciária T ou S3. A lignina ocorre, em maior quantidade, na parede S2 e apresenta concentração elevada na LM. As hemiceluloses dispõem-se rodeando as microfibrilas de celulose (SANTIAGO; RODRIGUES, 2017). As microscopias eletrônicas (Figuras 5 AB) mostram as várias camadas da parede celular e ilustram como a LM envolve as células, funcionando como sustentador do complexo celular que forma uma planta. As Figuras 6A (microscopia eletrônica) e 6B (modelo didático) demonstram como as microfibrilas de celulose estão organizadas e encaixadas em uma matriz de hemicelulose e lignina (SANTIAGO; RODRIGUES, 2017).

Figura 5. (A) Corte ilustrativo do sistema de camadas na parede das células de madeira. (B) Microscopia eletrônica de transmissão das células de madeira mostrando as camadas da parede celular: ML = lamela média, P = parede primária, S1 = parede secundária, S2 = parede secundária e T = parede terciária.



Fonte: (FENGEL; WEGENER, 1983; GELLERSTEDT; EK; HENRIKSSON, 2009).

Figura 6. (A) Microscopia eletrônica de lignocelulósico. (B) Modelo didático que explica como as microfibras de celulose estão organizadas e encaixadas em uma matriz de hemicelulose e lignina presente em um lignocelulósico.



Fonte: (EK et al., 2009).

3.3. Pré-tratamento de materiais lignocelulósicos com [TEA][HSO₄]

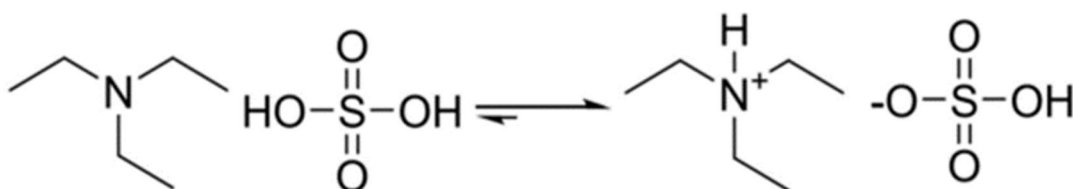
O pré-tratamento utilizando-se [TEA][HSO₄] que é um LI de sais de baixo ponto de fusão, é uma tecnologia recente que resulta na desestruturação do material e consequentemente seu fracionamento. O uso de LIs como solventes de processamento de biomassa se iniciou através da descoberta do potencial da dissolução de celulose pelos LIs, seguido por investigações sobre o uso de LIs identificados como solventes alternativos para fiação de fibras celulósicas artificiais (por exemplo, o processo tecnológico de *loncell-F*). Outra área que se mostrou promissora é a transformação de açúcares na plataforma química de hidroximetilfurfural (HMF), processo que os LIs se destacam por seus altos rendimentos e seletividades (BRANDT-TALBOT et al., 2017). Existem duas estratégias principais para o pré-tratamento de biomassa lignocelulósica com LIs em desenvolvimento: o pré-tratamento de dissolução e o pré-tratamento *ionosolv*. A primeira envolve a dissolução completa do material lignocelulósico, incluindo a

celulose cristalina. A segunda estratégia, mais recente, utiliza os LIs para fracionar os materiais lignocelulósicos, dissolvendo as frações hemicelulósica e de lignina seletivamente, enquanto a celulose é recuperada na forma sólida (polpa celulósica). As características distintivas do pré-tratamento com LIs incluem baixas pressões de processo, redução do atrito e abrasão, além de técnicas inovadoras de separação de produtos (EMINOV et al., 2014).

Embora a celulose mantenha sua cristalinidade, os rendimentos de sacarificação são aumentados para 70-90% do valor teórico máximo, devido à exposição de suas fibrilas. Estudos anteriores demonstraram que a adição de 10-40% de água aos LIs é essencial para um fracionamento eficaz. Isso se deve à necessidade de água para diversas reações, incluindo hidrólise de ligações di tipo éter da lignina, ligações do tipo éster de ácido ferúlico e ligações glicosídicas da fração hemicelulósica. Além disso, a água ajuda a reduzir a viscosidade do solvente, facilitando o processo (SEDDON et al., 2008).

Em resumo, o pré-tratamento com LIs apresenta duas estratégias distintas, sendo a técnica *ionosolv* uma abordagem mais recente que fraciona o material lignocelulósico na presença de água, resultando em altos rendimentos de fração celulósica. Isso oferece vantagens significativas em relação a outros métodos de pré-tratamento, com potencial para melhorar a eficiência e a viabilidade econômica do processo de conversão da biomassa lignocelulósica em produtos de alto valor agregado. Neste contexto o [TEA][HSO₄] foi selecionado devido à sua seletividade na dissolução das frações de lignina e hemicelulose (BRANDT-TALBOT et al., 2017; BRANDT et al., 2011; VERDÍA et al., 2014) (Figura 7).

Figura 7. Síntese do hidrogenosulfato de trietilamina [TEA][HSO₄] a partir de trietilamina e ácido sulfúrico.



Fonte: (Brandt-Talbot et al., 2017).

3.4. Hidrólise enzimática de celulose

O uso de enzimas na hidrólise dos materiais lignocelulósicos é vantajoso pela alta especificidade das reações enzimáticas, pelas condições amenas de reação, pouca modificação química e não formação de subprodutos. Apesar de décadas já terem sido dedicadas a esses estudos, ainda não estão totalmente compreendidas as características do substrato que atribuem maior eficiência de hidrólise. A hidrólise enzimática não leva à formação de compostos tóxicos a processo fermentativos, como por exemplo, furfural e HMF (BALAT, 2011; ZHANG et al., 2013).

A hidrólise enzimática requer o contato direto entre a enzima e o substrato. A enzima deve ultrapassar barreiras físicas para adsorver a superfície do substrato e finalmente catalisar a reação. A celulose pode ser hidrolisada em oligossacarídeos e/ou glicose via tratamento enzimático e/ou ácido. Existem algumas propriedades físico-químicas que dificultam a hidrólise enzimática e devem ser entendidas. No caso da hidrólise enzimática, a reação é realizada sob condições mais amenas, porém requer tempos mais longos de reação (até 72 h) (MARTINS et al., 2008; PIN et al., 2021).

A acessibilidade de enzimas para o substrato é crítica durante a hidrólise enzimática. Por outro lado, a adsorção de celulasas na superfície do substrato tem uma importante função (MARTINS et al., 2008). Celulasas que adsorvem no substrato ampliam sua extensão mostrando um aumento na velocidade de hidrólise da celulose cristalina comparada a celulasas que adsorvem menos. A descoberta de domínios de ligação para celulose (CBDs) em algumas enzimas celulolíticas explica em parte as diferenças da habilidade de celulasas em adsorver na celulose (BERLIN et al., 2005). Durante a hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos com celulasas, acima de 70% do total da enzima adicionada pode não ser produtiva devido à adsorção na lignina, conhecida como adsorção improdutiva (BERLIN et al., 2005). Por isso, é muito importante a remoção de porções da lignina na parede celular do material.

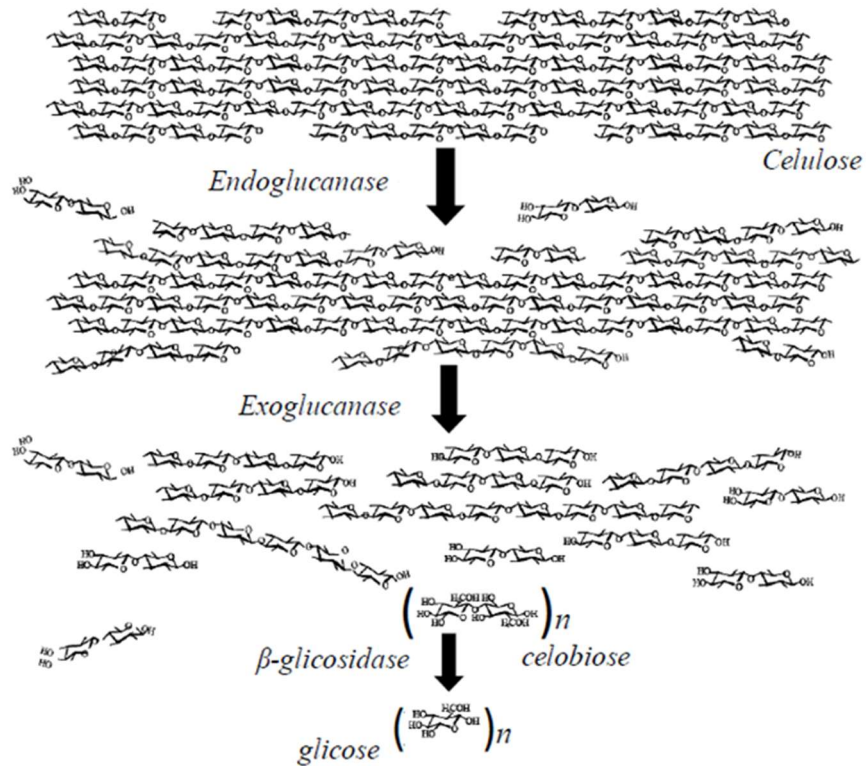
As celulasas são atualmente a terceira categoria de enzimas industriais mais comercializada em todo o mundo, devido à sua aplicação em processamento de algodão, reciclagem de papel, como enzimas detergentes, na extração de suco e como aditivos para alimentação animal. No entanto, as celulasas poderão se tornar as enzimas mais comercializadas no mundo, se o bioetanol e outros biocombustíveis

obtidos pela fermentação de açúcares, produzidos a partir de biomassa vegetal. (JEOH, et al., 2006).

Existem três tipos de celulases: endocelulase (também conhecidas como endoglucanase), exocelulase (também conhecidas como celobiohidrolase) e celobiase ou β -glicosidase. Todos os domínios catalíticos da endocelulase têm um local ativo aberto que são capazes de se ligar ao interior de moléculas de celulose. Em contraste, a exocelulase têm seus sítios ativos localizados em um túnel, proporcionando uma atividade processual. Existem duas classes de exocelulases: a primeira classe cliva a extremidade não redutora de uma molécula de celulose, liberando a celobiose. Todas as exocelulases conhecidas desta classe estão na família GH-6. A exocelulase da segunda classe cliva a extremidade redutora da cadeia de celulose, liberando celobiose. A exocelulases fúngica desta classe estão na família GH-7, enquanto as bacterianas estão na família GH-48 (JEOH, et al., 2006).

Para a hidrólise da celulose ser eficiente é necessária a ação sinérgica das três celulases: endo-1,4- β -D-glucanase (EC 3.2.1.4), que clivam aleatoriamente o interior da cadeia de celulose; exo-1,4- β -D-glucanase ou celobiohidrolase (CBH) (EC 3.2.1.91), que clivam as extremidades redutoras e não redutoras da cadeia de celulose e liberam unidades de celobiose; e 1,4- β -D-glicosidase, ou celobiase, (EC 3.2.1.21), que hidrolisam oligossacarídeos e celobiose em glicose. Os três grupos catalisam a hidrólise de ligações β -1,4 glicosídicas, e atuam sinergicamente, criando sítios para hidrólise, além de reduzir a inibição pelo produto (DIAS et al., 2023; JØRGENSEN; OLSSON, 2006) (Figura 10).

Figura 8. Modo de ação das enzimas do complexo celulolítico de *Trichoderma reesei*.



Fonte: (MARTINS et al., 2008).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Obtenção dos materiais

Os subprodutos de bagaço e palha de cana-de-açúcar foram obtidos na Destilaria Seis Lagoas localizada em Brotas, São Paulo, Brasil (safra 2015/2016). O bagaço e a palha de cana-de-açúcar foram previamente lavados com água destilada, secos e moídos em um moinho de facas com uma tela de retenção de 0,84 mm. Os materiais que passaram pela tela foram coletados. Aproximadamente 2 g (base seca) de bagaço e palha de cana-de-açúcar foram adicionados a um filtro de cartucho de papel e inseridos em extrator do tipo *Soxhlet* acoplados a um balão volumétrico contendo 1 L de etanol aquecido a 95% (v/v) sob aquecimento contínuo. O sistema foi mantido por aproximadamente 6 h. Os filtros de cartuchos de papel incluindo os subprodutos extraídos foram secos a 25°C até que o etanol evaporasse completamente e a massa atingisse um valor constante (MASARIN et al., 2011; FERRAZ et al., 2000). A porcentagem de extrativos foi calculada com base na diferença de massa inicial e final.

4.2. Pré-tratamento hidrotérmico de palha e bagaço de cana-de-açúcar

O pré-tratamento hidrotérmico foi realizado em aproximadamente 50 g de bagaço e palha de cana-de-açúcar (base seca) previamente lavados com água destilada (item 4.1). Cada fração foi adicionada a reatores individuais de aço inoxidável (®Regmed, Osasco-SP, Brasil). Cada reator é equipado com dispositivos de controle mecânico de agitação, temperatura e pressão, compostos por quatro digestores com capacidade de 1500 mL (Figura 9).

Figura 9. Equipamento composto de 4 reatores individuais de aço inoxidável (®Regmed, Osasco-SP, Brasil).



Assim, 500 mL de água destilada foram usados para fixar a razão massa/água em 10% (m/v). Portanto, 50 g de bagaço e palha de cana-de-açúcar (base seca) e 500 mL de água destilada foram transferidos para os digestores, os quais foram fechados e a temperatura ajustada para 161 e 177°C por 75,3 e 65 min, para o bagaço e palha de cana-de-açúcar, respectivamente. A agitação foi fixada em 4 rpm. Ao atingir a temperatura desejada (atingida em média em 40 min), foi iniciado o tempo de reação. Ao final das reações, o equipamento foi desligado e resfriado naturalmente por 24 h. O material pré-tratado resfriado foi filtrado através de filtros de vidro sinterizado de porosidade número 3 de 100 mL (Schott, Alemanha). O material retido nos filtros (sólidos recuperados) foi lavado com água destilada até atingir pH neutro. O material foi então retirado do filtro e seco em estufa com circulação de ar à temperatura de 50°C por 72 h. Os rendimentos dos pré-tratamentos foram calculados como a diferença da massa inicial prévio ao pré-tratamento e a massa final após o pré-tratamento. O material retido nos filtros (sólidos recuperados) foi armazenado até o momento de seu uso.

4.3. Síntese de [TEA][HSO₄]

A síntese foi realizada com trietilamina e ácido sulfúrico (H_2SO_4). Desta forma, utilizando-se uma capela munida de exaustão, pesou-se o equivalente a 1 mol de trietilamina em um balão de fundo redondo de 1 L contendo uma barra de agitação magnética. O balão foi colocado em um banho de gelo em uma placa de um agitador magnético. Foi colocado um funil de adição de 250 mL imediatamente para minimizar a evaporação da trietilamina. Na sequência foi adicionado 1 mol de H_2SO_4 usando uma solução de concentração conhecida (neste experimento foi de 5 M). Então, foi transferido o H_2SO_4 para um funil de adição, assim foi adicionando o mesmo H_2SO_4 gota a gota à trietilamina, mantendo-se a agitação vigorosamente. Na sequência foi lavado o interior do funil de adição usando água destilada para garantir que o H_2SO_4 foi transferido quantitativamente. Ao final da formação do $[\text{TEA}][\text{HSO}_4]$, o excesso de água foi removido em rotaevaporador a 70°C por 6 h. Ao final das 6 h o $[\text{TEA}][\text{HSO}_4]$ foi recuperado e sua umidade corrigida para 20% (v/v) (BRANDT-TALBOT et al., 2017).

O pH do $[\text{TEA}][\text{HSO}_4]$ foi mensurado através da diluição de 1 mL de solução de $[\text{TEA}][\text{HSO}_4]$ em 9 mL de água destilada (1:9, respetivamente). O pH da solução diluída e mensurada usando um medidor de pH Jenway 3510 equipado com um eletrodo VWR Ag/AgCl SympHony (0,02 pH de precisão).

A umidade do $[\text{TEA}][\text{HSO}_4]$ foi mensurada em *Karl Fischer*, para isso adicionou-se algumas gotas do $[\text{TEA}][\text{HSO}_4]$ ao titulador *Karl Fischer* usando uma seringa pré-pesada. Digitou-se o peso do $[\text{TEA}][\text{HSO}_4]$ adicionado ao titulador e aguardou-se até que o mesmo apresentasse a leitura, e assim registrou-se o conteúdo de água.

4.4. Ressonância magnética nuclear (RMN-H) do $[\text{TEA}][\text{HSO}_4]$

Para a realização das análises de RMN-H, as amostras foram preparadas da seguinte maneira: Foi medido cerca de 500 μL de solvente deuterado dimetilsulfóxido (DMSO) e transferido para um $^{\circ}\text{Eppendorf}$ de 1 mL. Assim, foi pipetado cerca de 10 μL de amostra, e adicionamos ao $^{\circ}\text{Eppendorf}$ contendo o DMSO. Após a homogeneização, (obtenção de uma solução límpida sem turbidez). A solução obtida foi vertida em $^{\circ}\text{Tubo}$ de RMN (5 milímetros de diâmetro, mínimo de 17 cm de altura e máximo 19 cm) da marca Wilmad tampado e verificado se o mesmo estava com cerca de e 4,5-5,0 cm de altura. Posteriormente o $^{\circ}\text{Tubo}$ de

RMN foi limpo com um papel macio para retirar as marcas de impressão digital e identificado com etiquetas. Os espectros de RMN-H foram registrados em equipamento da Bruker 400 MHz espectrômetro.

4.5. Pré-tratamento de palha e bagaço de cana-de-açúcar com [TEA][HSO₄]

Os pré-tratamentos foram realizados em um reator (@Regmed, Osasco-SP, Brasil) (Figura 9). Foram pesados aproximadamente 20 g (base seca) de palha ou bagaço de cana-de-açúcar (previamente lavado com água destilada, porém sem moagem e extração alcóolica, item 4.1 e previamente pré-tratado hidrotermicamente, item 4.2) em cada reator e adicionado 200 g de [TEA][HSO₄] 80% (BRANDT-TALBOT et al., 2017). A consistência final da reação foi de 10% (m/m). Os reatores foram fechados e foi selecionada a temperatura de 120°C e agitação de 4 rpm no display do equipamento. O equipamento foi acompanhado até atingir 120°C, e então foi disparado um cronômetro. Os tempos de reação foram de 1, 2, 4, 6 e 8 h e ao completar cada tempo o equipamento foi desligado. As válvulas dos reatores foram abertas para a saída de vapor, e os reatores foram resfriados. Após o resfriamento, os reatores foram abertos e o material foi coletado e filtrado. A fração líquida (licor) foi coletada e separada, a fração insolúvel retida no filtro vidro sinterizado de porosidade número 3 de 100 mL foi lavada e extraída com etanol. Para isso foi transferido o conteúdo da fração insolúvel para um Erlenmeyer de 1 L, adicionado 400 mL de etanol 95% (v/v) e colocado em shaker a 120 rpm a 45°C por 1 h. Ao final da extração foi separada a fração líquida da sólida por decantação. Foi coletado o líquido em um frasco de fundo redondo de 1 L, a extração foi repetida 3 vezes. Por fim o material foi recolhido (quantitativamente) e colocado em estufa de circulação de ar a 40°C, por 24 h (massa constante). Assim, foram determinados os rendimentos dos pré-tratamentos. A fração líquida obtida na extração com etanol foi misturada a fração líquida obtida após o pré-tratamento (licor), gerando uma fração líquida final que foi estocada a 5°C até o momento de seu uso.

4.6. Precipitação de lignina e recuperação da fração líquida e precipitação de lignina

A fração líquida final obtida no item 4.5 foi utilizada para a precipitação da lignina. Desta forma, o licor foi vertido em um balão de 1 L o qual foi evaporado em rotaevaporador (tipo *heidolph*) a 80°C por 3 h com uma pressão de 200 mbar. O licor concentrado foi transferido para um béquer de 1 L e adicionada água destilada na proporção de 3:1 (3 partes de água para 1 parte de licor concentrado) e deixado em repouso por 1 h para precipitar a lignina. A suspensão obtida foi transferida em tubos de centrifuga de 50 mL (previamente secos e pesados), centrifugado por 20 min a 5000 rpm e vertido o sobrenadante (o qual foi recolhido, mensurado seu volume total e coletada uma fração que foi congelada a -20°C até o momento de seu uso). Na sequência, foi adicionada 50 mL de água deionizada ao *pellet* de lignina, centrifugado novamente e o sobrenadante descartado, o procedimento foi repetido 5 vezes. Por fim, a lignina foi seca no tubo em estufa a 45 °C durante 24 h (massa constante). Ao final os tubos contendo a lignina seca foram pesados e determinado o rendimento de obtenção.

Os licores concentrados e diluídos de cada amostra e tempo de pré-tratamento foram previamente diluídos e submetidos a determinação do espectro de varredura na região do ultravioleta (UV) utilizando-se espectrofotômetro e determinada a concentração de lignina utilizando-se a absorvidade de 20 g.L⁻¹cm⁻¹ (MASARIN et al., 2011).

4.7. Determinação dos teores de lignina e carboidratos

As amostras obtidas nos itens 4.1 (material moído e extraído com etanol), 4.2, 4.5 e 4.6 foram hidrolisadas com ácido sulfúrico 72% (m/m) (MASARIN et al., 2011). Os experimentos foram realizados em duplicata. Assim, 300 mg de amostra foram tratadas com 3 mL de ácido sulfúrico 72% (m/m) por 1 h a 30°C. Em seguida, os conteúdos dos tubos de ensaio foram transferidos, quantitativamente, para Erlenmeyers de 250 mL com auxílio de 79 mL de água. A mistura foi autoclavada por 1 h, a 121 °C, resfriada e filtrada em filtros de vidro sinterizados de porosidade número 3 de 30 mL, (previamente secos em estufa a 105 °C por 1 h e meia e pesados). O material retido foi lavado, com 2 porções de 5 mL de água, e seco até massa constante. Esse resíduo seco correspondeu à lignina insolúvel em ácido (lignina *Klason* insolúvel). Os filtrados foram avolumados, a 100 mL, e uma pequena alíquota passada através de cartuchos do tipo SEP-PACK C18 para a retenção de

compostos fenólicos e analisados quanto aos teores de carboidratos (glicose, xilose, arabinose e ácido acético) em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (SHIMADZU, modelo NEXERA XR). A análise cromatográfica foi realizada utilizando-se uma coluna BIORAD AMINEX HPX-87H a 60 °C, com H₂SO₄ 5 mM a 0,6 ml.min⁻¹ como eluente, volume de amostra de 20 µL e detecção por índice de refração (SHIMADZU RID-20A) a 60 °C. As concentrações dos compostos foram determinadas através de curva analítica preparada com padrões, de grau analítico, secos sob pentóxido de fósforo e vácuo. O teor de lignina solúvel em ácido foi determinado através da leitura da absorbância em 205 nm de uma diluição (usualmente 1:100) do hidrolisado, tomando-se como padrão uma absortividade de 105 L.g⁻¹.cm⁻¹.

4.8. Caracterização química e estrutural das ligninas

As ligninas precipitadas obtidas no item 4.6 foram caracterizadas conforme os procedimentos a seguir.

Espectrometria no infravermelho com transformada de fourier com reflectância total atenuada (FTIR-ATR): As amostras foram submetidas a um processo de secagem, e em seguida, pesadas, resultando em um peso médio de aproximadamente 5 mg. A análise FTIR-ATR foi realizada usando um Spectrum TM 400 série FTIR/NIR, espectrômetro equipado com um cristal de seleneto de zinco ATR. A resolução espectral foi de 4,0 cm⁻¹ e 16 varreduras/amostras foram acumuladas na região de 600 e 2400 cm⁻¹.

Análise Termogravimétrica (TG): A temperatura de decomposição térmica das amostras de lignina foi determinada por um analisador termogravimétrico Q500 V20.13 Build 39 (TA Instruments). Aproximadamente 5 mg de amostras foram pesadas e em seguida, foi aquecido a uma taxa de 25 °C.min⁻¹ em uma faixa de temperatura de 10 até 600 °C, sob atmosfera de nitrogênio (atmosfera não oxidante) usando um fluxo taxa de 60 mL.min⁻¹

Análise Elementar: As amostras foram submetidas a um processo de secagem, e em seguida, pesadas, resultando em um peso médio de aproximadamente 1 mg. A análise elementar de amostras de lignina foi determinada usando um PerkinElmer CHNS Analyzer 2400. Aproximadamente 3 mg de lignina foram usados para determinar os teores de carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre.

Determinação da massa molecular: A massa molecular média (M_n e M_w) das ligninas foi determinado utilizando-se um sistema de CLAE (SHIMADZU, modelo NEXERA XR) equipado com uma coluna de separação de polímeros PolySep-SEC 2000 e detecção por índice de refração (SHIMADZU PDA-20A-UV). Foi utilizado um tampão Fosfato com pH 12 para preparação amostras de lignina. Foi usada como eluente a uma vazão de $1,5 \text{ mL min}^{-1}$ a 60°C . A curva analítica foi elaborada com padrões analíticos de polímeros (intervalo 0,13 até 12,4 kDa) de massa molecular conhecida. Os cálculos das massas molares (M_n e M_w) e da dispersibilidade (PD) foram realizados através da resolução da Equação 1.

Equação 1

$$\begin{aligned} M_n &= \sum x_i M_i \\ M_w &= \sum w_i M_i \\ PD &= \frac{M_w}{M_n} \end{aligned}$$

Onde:

M_i = Massa molar média da faixa de tamanhos i .

X_i = Fração do número total de cadeias com esse tamanho.

W_i = Fração em peso das moléculas nesse intervalo de tamanho.

PD= Índice de polidispersão ou polidispersividade.

Determinação de carbonilas: As amostras de lignina foram dissolvidas em 1,4-dioxano 85% (v/v) na concentração de 20 mg.L^{-1} . Foram misturados 2 mL de uma solução de lignina e 1 mL de uma solução de 0,05 M de boroidreto de sódio. A mistura foi deixada no escuro por 45 h, a temperatura de 25°C e, em seguida, os espectros diferenciados foram registrados na região de 200-400 nm, contra uma solução não reduzida da amostra nas mesmas condições (MARTONE et al., 2009). Os cálculos dos teores de grupos carbonila foram realizados através da resolução da Equação 2 (FERRAZ et al., 2000);

Equação 2

$$\Delta E_{310\text{nm}} = 10500x + 9400y$$

$$\Delta E_{342nm} = 19800x + 2020y$$

Onde:

$\Delta E_{310nm} = A_{310} \times \text{massa molar da fórmula } C_9 \text{ da lignina em questão} / Clig$

$\Delta E_{342nm} = A_{342} \times \text{massa molar da fórmula } C_9 \text{ da lignina em questão} / Clig$

$X = n^\circ \text{ de } \gamma\text{-carbonilas } \alpha\text{-}\beta \text{ insaturadas} / C_9$

$Y = n^\circ \text{ de } \alpha\text{-carbonilas} / C_9$

A_{310} e A_{342} = Absorbância nos respectivos comprimentos de ondas, no espectro da solução sem redução contra a solução reduzida (ambas em mesma concentração).

$Clig$ = concentração de lignina, em $g.L^{-1}$.

Os índices numéricos das equações são valores obtidos a partir da determinação de carbonilas em compostos modelos de lignina (MARTONE, 2009).

Determinação de hidroxílicas fenólicas: Foi utilizado o método da espectroscopia UV/ diferencial que consiste na varredura, em espectrofotômetro, de uma solução de lignina em meio básico contra a mesma solução em meio ácido. A determinação de OH fenólico foi feita com base na absortividade média de compostos modelos de lignina (WEXLER, 1964). As amostras de ligninas foram dissolvidas em 1,4-dioxano 85% (v/v) na concentração de 20 mg. L^{-1} . O pH das soluções foi ajustado em 13, com hidróxido de sódio 1 M. Um branco de cada amostra foi feito na mesma diluição, porém em pH 1, ajustado pela adição de ácido clorídrico 1 M. A varredura da solução alcalina contra a solução ácida foi realizada utilizando-se um espectrofotômetro. O teor de hidroxilas fenólicas foi calculado através da Equação 3:

Equação 3

$$\%OH_{\text{fenólico}} = (\Delta Abs_{250nm} \times 0,192) / C_{lig}$$

Onde:

$\%OH_{\text{fenólico}}$ = porcentagem de hidroxilas fenólicas.

ΔAbs_{250nm} = Absorbância da solução em 250 nm, subtraída da absorbância relativa à linha de base do espectro.

0,192 = relação de porcentagem de OH fenólico por absortividade em 250 nm ($L.g^{-1}.cm^{-1}$), determinada para vários compostos modelos de lignina.

Determinação de absortividade: As amostras de lignina foram dissolvidas em 1,4 dioxano 85% (v/v) na concentração de 20 mg.L⁻¹. Essas soluções foram sucessivamente diluídas com solução de dioxano 85% (v/v) e mensurada a absorbância em 280 nm em um espectrofotômetro (MARTONE, 2009).

4.9. Determinação de atividade de celulases

A determinação da atividade enzimática foi realizada para o preparado enzimático comercial *Cellic CTec II* (Novozymes). A atividade de celulases totais foi determinada segundo a metodologia descrita por (GHOSE, 1987). A reação enzimática foi conduzida em tubos de ensaio de 30 mL contendo 1 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8, uma tira de papel de filtro 1 cm x 5 cm (aproximadamente 50 mg) e 0,5 mL de extrato enzimático. Os tubos de ensaios foram aquecidos em banho maria a 50°C por 60 min. Em seguida, foi adicionado 3 mL de DNS e a mistura foi fervida por 5 min. Foram adicionados 20 mL de água destilada em cada tubo e homogeneizou-se a mistura em agitador *vortex*. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 540 nm. Foram realizados controles, adicionando o reagente de DNS antes do preparado enzimático. Para o branco foi adicionada água destilada no lugar da amostra. Os experimentos foram realizados em triplicata. As concentrações dos compostos foram determinadas através de uma curva analítica.

4.10. Hidrólise enzimática com celulases comerciais na polpa celulósica oriunda dos pré-tratamentos com [TEA][HSO₄]

Os materiais não tratados e hidrotermicamente pré-tratados (itens 4.1, 4.2, 4.5 e 4.6), foram moídos em moinho de facas com uma tela de retenção de 0.84 mm. Foi pesado aproximadamente 200 mg de material (base seca) em Erlenmeyers de 125 mL. Os materiais foram hidrolisados com celulases comerciais (*Cellic Cetec II*). A hidrólise enzimática foi realizada com 20 FPU de celulases por grama de substrato (base seca). As reações foram realizadas em 10 mL de uma solução de tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,8). Nesta condição os experimentos foram realizados a 1% de consistência (relação massa: massa de 100 mg da amostra:10 mL de solução (MASARIN et al., 2011). Os experimentos foram realizados sob agitação de

120 rpm, a 45°C, por 72 h. Após o tempo de hidrólise foi amostrada uma alíquota que foi tratada termicamente a 100°C por 5 min e analisado em sistema de CLAE (item 4.7) para a determinação de glicose e xilose (PAZ-CEDENO et al., 2021; BRANDT-TALBOT et al., 2017b). A conversão de celulose e xilana foi calculada conforme a Equação 4:

Equação 4

$$A = \left[\frac{\text{glicose ou xilose} * f}{m} \right] * 100\%$$

Onde:

A = converção de celulose ou xilana em glicose ou xilose, respectivamente (%).

Glicose ou Xilose = massa de glicose ou xilose, respectivamente (g).

f= fator de hidrólise: 0,90 e 0,88 para celulose e xilana, respectivamente (g.g⁻¹).

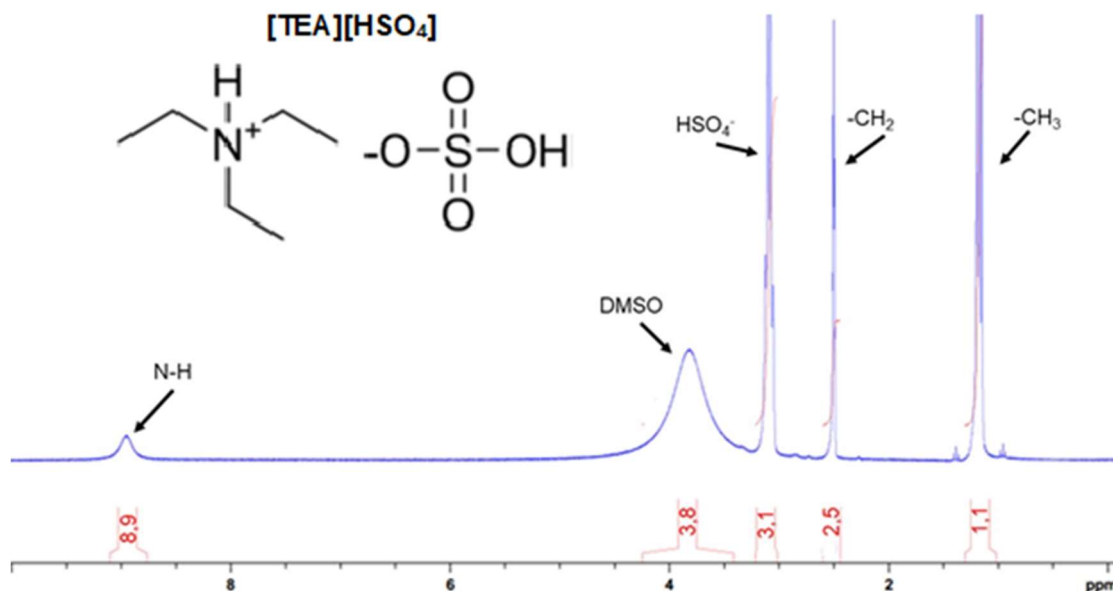
m = massa em base seca inicial de celulose ou xilana no material (g).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Síntese de [TEA][HSO₄]

Após a mistura de ácido sulfúrico e trietilamina foi observado aumento da temperatura (o qual foi controlado pela adição de gelo para resfriamento) caracterizando-se uma reação do tipo exotérmica. Também foi averiguado através do aspecto visual a formação de líquido homogêneo corroborando com o sucesso da formação do [TEA][HSO₄]. Ao final da reação o [TEA][HSO₄] apresentou umidade média de 15% (v/v), a qual foi padronizada para 20% (v/v). O [TEA][HSO₄] apresentou pH=1. O espectro de RMN-H apresentou a banda de ligação do tipo N-H (δ =8,97), a qual é característica do [TEA][HSO₄] confirmando o sucesso de sua síntese. Outras bandas do [TEA][HSO₄] também foram verificadas, por exemplo, -CH₃, -CH₂, e HSO₄⁻, além da banda relativa ao solvente utilizado na análise (DMSO) (Figura 10).

Figura 10. Espectro de RMN-H de [TEA][HSO₄].



Todas essas características verificadas no [TEA][HSO₄] corroboram com os estudos da síntese do mesmo reportados recentemente na literatura (BRANDT-TALBOT et al., 2017b; GSCHWEND et al., 2019; GSCHWEND et al., 2018).

5.2. Pré-tratamentos de subprodutos de bagaço de cana-de-açúcar com [TEA][HSO₄]

Neste estudo, o bagaço e a palha de cana-de-açúcar (em suas formas natura e tratada hidrotermicamente) foram pré-tratadas com [TEA][HSO₄]. O pré-tratamentos de bagaço e palha de cana-de-açúcar foram realizados em reatores individuais de aço inoxidável (®Regmed, Osasco-SP, Brasil) (Figura 9).

5.3. Pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar com [TEA][HSO₄] e caracterização química das polpas celulósicas obtidas

A Tabela 1 apresenta a caracterização química das polpas celulósicas recuperadas após o pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar em sua forma natura com [TEA][HSO₄]. A análise da composição química confirmou o enriquecimento da polpa celulósica e dissolução das frações de hemicelulose e lignina. As amostras exibiram variações significativas nas porcentagens de rendimento, abrangendo uma faixa entre 66-41%. Vale destacar que não foram detectados os grupos laterais nas polpas recuperadas, arabinosil e acetil, que são normalmente encontrados na hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar em sua forma natura (Tabela 1), conforme relatado na literatura (MASARIN et al., 2011). Os resultados da somatória das análises apontaram para uma média de 83-87%. É importante mencionar que o ácido 4-O-metil-glucurônico, comumente identificado como cadeias laterais na hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar, não foi quantificada nas amostras avaliadas, o que pode explicar parte do conteúdo classificado como "composto indeterminado". Além disso, a presença de cinzas e os produtos resultantes da degradação de açúcar durante a hidrólise ácida das amostras também podem ter contribuído de forma limitada para essa fração (MASARIN, et al., 2011).

Tabela 1. Composição química e rendimento de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com [TEA][HSO₄] por diferentes tempos. Teores apresentados em porcentagem (grama/100 gramas de material bruto, dados em base seca).

Amostras	Rendimento (%)	Celulose (%)	Xilana (%)	Grupo Arabinosil (%)	Grupo Acetil (%)	Lignina (%)	Soma (%)
<i>Componentes amostras (g/100g polpa básica)</i>							
Não tratado (<i>in natura</i>) (0h)	-	33,3 ± 0,3	21,2 ± 0,2	1,3 ± 0,0	2,1 ± 0,2	25,1 ± 0,3	83,0
Tratado 1 h	66,0 ± 0,7	49,1 ± 0,5	3,4 ± 0,2	nd	nd	33,2 ± 0,4	85,7
Tratado 2 h	49,7 ± 0,8	59,6 ± 0,2	1,5 ± 0,1	nd	nd	23,6 ± 0,3	84,7
Tratado 4 h	44,0 ± 3,1	65,4 ± 0,2	1,3 ± 0,0	nd	nd	18,9 ± 0,0	85,6
Tratado 6 h	46,3 ± 0,5	70,4 ± 0,1	1,1 ± 0,1	nd	nd	14,1 ± 0,0	85,6
Tratado 8 h	41,0 ± 0,1	76,0 ± 1,1	1,0 ± 0,1	nd	nd	10,6 ± 0,6	87,6
<i>Componentes da biomassa (g/100g de material original, balanço de massa)</i>							
Não tratado (<i>in natura</i>) (0h)	-	33,3 ± 0,3 ^{a,b,c,d,e,f}	21,2 ± 0,2	1,3 ± 0,0	2,1 ± 0,2	25,1 ± 0,3	83,0
Tratado 1 h	66,0 ± 0,7	32,4 ± 0,3 ^{b,c}	2,3 ± 0,20	nd	nd	21,9 ± 0,3	56,6
Tratado 2 h	49,7 ± 0,8	29,6 ± 0,1 ^{c,d}	0,8 ± 0,01	nd	nd	11,7 ± 0,2	42,1
Tratado 4 h	44,0 ± 3,1	28,8 ± 0,1 ^{d,e}	0,6 ± 0,02	nd	nd	8,3 ± 0,0	37,7
Tratado 6 h	46,3 ± 0,5	32,6 ± 0,0 ^e	0,5 ± 0,01	nd	nd	6,5 ± 0,3	39,4
Tratado 8 h	41,0 ± 0,1	31,2 ± 0,4 ^f	0,4 ± 0,01	nd	nd	4,3 ± 0,2	35,9

Todos os dados apresentados são a média aritmética seguida pelo desvio padrão amostral.

O bagaço de cana-de-açúcar não tratado (*natura*) contém 2,2% (m/m) de extrativos (base seca).

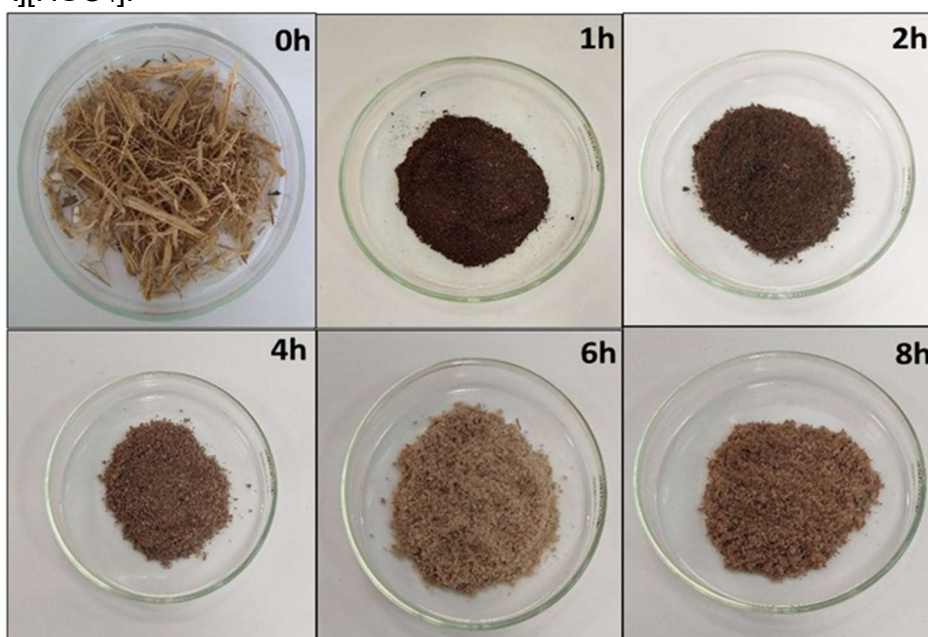
Após o pré-tratamento com [TEA][HSO₄] as polpas recuperadas não apresentaram teores significativos de extrativos.

nd = não detectado.

Os dados são média ± desvio padrão. Em cada coluna, os valores com as mesmas letras sobrescritas não diferem entre si, a um nível de significância de 0,05 (teste de Tukey).

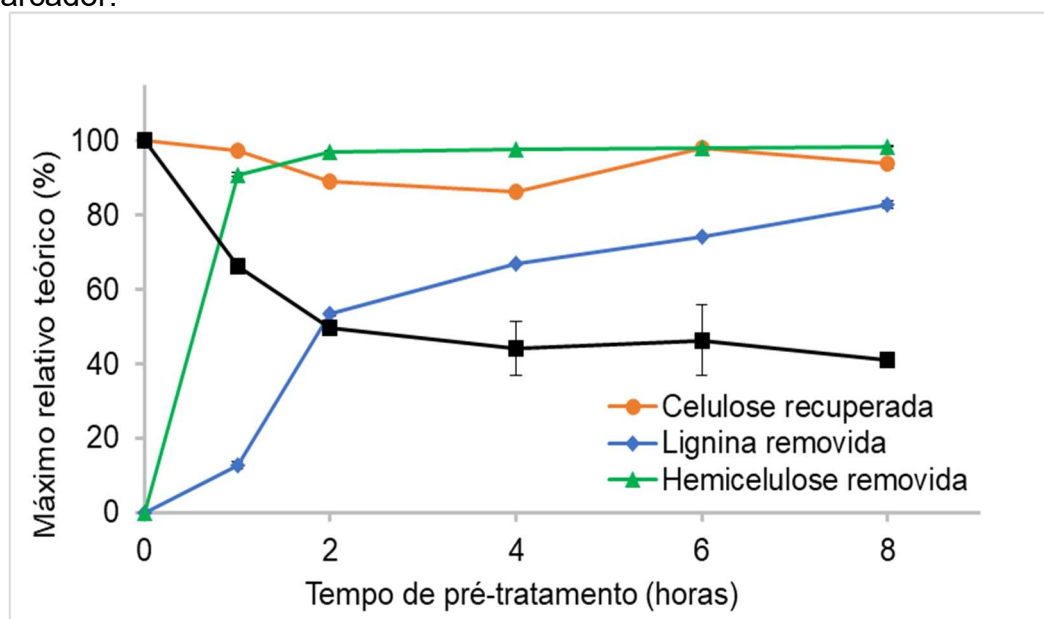
A Figura 11 apresenta o aspecto visual das polpas celulósicas recuperadas de bagaço de cana-de-açúcar em sua forma natura (tempo 0 h) e após o pré-tratamento com [TEA][HSO₄] em função do tempo (1-8 h). As polpas mostraram um aspecto mais escuro, principalmente nos tempos mais curtos de pré-tratamento 1-2 h, tornando-se mais esbranquiçadas após 4 h de reação.

Figura 11. Bagaço de cana-de-açúcar em sua forma natura (tempo zero, 0h) e polpas recuperadas em função do tempo de reação após diferentes tempos de pré-tratamento com [TEA][HSO₄].



A Figura 12 apresenta o rendimento do pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar em sua forma natura com [TEA][HSO₄], os índices de remoção das frações de lignina e hemicelulose, além da recuperação da polpa em função do tempo.

Figura 12. Remoção dos componentes e rendimento em função do tempo de pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar em sua forma natura com [TEA][HSO₄]. A barra do desvio padrão pode não ser visualizada quando for menor que o tamanho do marcador.



As amostras provenientes de bagaço de cana-de-açúcar em suas formas natura apresentaram variação nos teores dos componentes, conforme o tempo de pré-tratamento. Foi verificada remoção da fração hemicelulósica de 91% (m/m) após 1 h de reação, permanecendo neste patamar até 8 h de reação em função do tempo de pré-tratamento. Além disso, foi verificado um aumento gradual do índice no nível da dissolução da lignina em função do tempo do pré-tratamento, atingindo 83% (m/m) em 8 h de reação. No caso da fração celulósica (polpa recuperada) não houve diferenças significativas em seu teor entre as polpas recuperadas e o bagaço de cana-de-açúcar em sua forma natura, evidenciadas por meio do teste de *Tukey* (Tabela 1).

A Tabela 2 apresenta a caracterização química das polpas celulósicas obtidas após o pré-tratamento com [TEA][HSO₄] em bagaço de cana-de-açúcar previamente termotratado. O bagaço de cana-de-açúcar previamente termotratado apresentou teores superiores de celulose (40,4%) e lignina (30,6%) quando comparado ao bagaço de cana-de-açúcar em sua forma natura (33,3 e 25,1%, respectivamente) (Tabelas 1 e 2). O enriquecimento destas frações ocorreu devido a seletividade do termotratamento em dissolver a fração hemicelulósica (DIAS et al., 2023; PAZ-CEDENO et al., 2021).

Tabela 2. Composição química e rendimento de bagaço de cana-de-açúcar previamente termotratado após e pré-tratamentado com [TEA][HSO₄] por diferentes tempos. Teores apresentados em porcentagem (grama/100 gramas de material bruto, dados em base seca).

Amostras	Rendimento (%)	Celulose (%)	Xilana (%)	Grupo Arabinosil (%)	Grupo Acetil (%)	Lignina (%)	Soma (%)
<i>Componentes amostras (g/100g polpa básica)</i>							
Termotratado (0h)	-	40,4 ± 1,9	12,6 ± 0,7	0,3 ± 0,01	0,7 ± 0,03	30,6 ± 0,7	84,6
Tratado 1 h	64,5	49,0 ± 0,1	2,2 ± 0,1	nd	nd	34,8 ± 0,5	86,0
Tratado 2 h	66,3	63,4 ± 0,1	2,6 ± 0,1	nd	nd	22,2 ± 0,1	88,2
Tratado 4 h	66,3	67,4 ± 0,4	3,0 ± 0,0	nd	nd	15,3 ± 0,5	85,7
Tratado 6 h	66,6	69,8 ± 0,1	3,3 ± 0,4	nd	nd	12,1 ± 0,0	85,2
Tratado 8 h	68,0	67,1 ± 0,0	3,9 ± 0,0	nd	nd	15,2 ± 0,3	86,2
<i>Componentes da biomassa (g/100g material original - balanço de massa)</i>							
Termotratado (0h)	-	40,4 ± 1,9	12,6 ± 0,7	0,3 ± 0,01	0,7 ± 0,03	30,6 ± 0,7	84,6
Tratado 1 h	64,5	31,6 ± 0,1	1,4 ± 0,1	nd	nd	22,4 ± 0,3	55,4
Tratado 2 h	66,3	32,3 ± 0,1	1,3 ± 0,1	nd	nd	11,3 ± 0,0	44,9
Tratado 4 h	66,3	30,3 ± 0,3	1,3 ± 0,0	nd	nd	6,9 ± 0,3	38,5
Tratado 6 h	66,6	29,3 ± 0,1	1,4 ± 0,2	nd	nd	5,1 ± 0,0	35,8
Tratado 8 h	68,0	26,9 ± 0,0	1,6 ± 0,0	nd	nd	6,1 ± 0,2	34,6

Todos os dados apresentados são a média aritmética seguida pelo desvio padrão amostral.

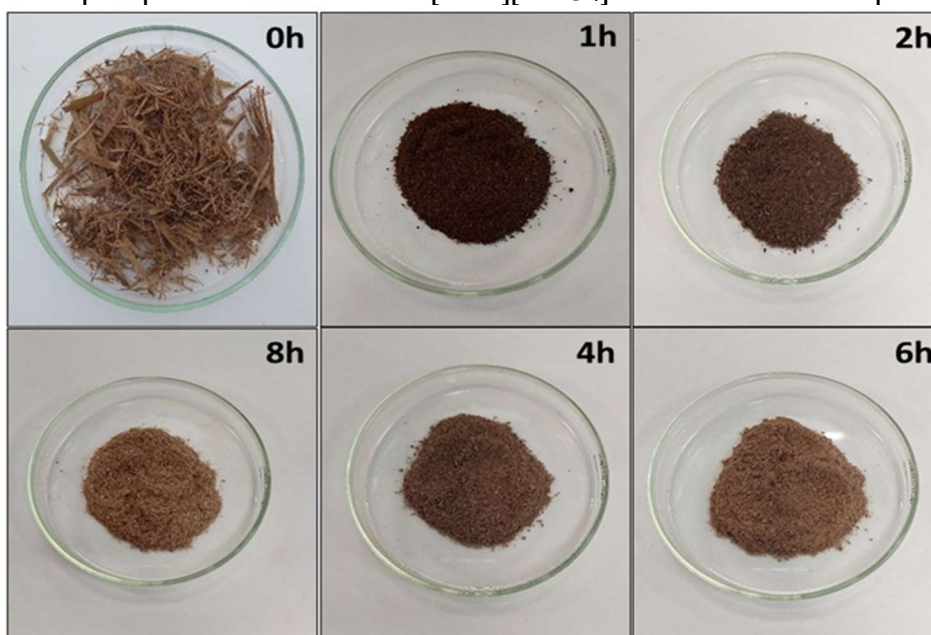
O bagaço de cana-de-açúcar previamente termotratado não apresentou teor significativo de extrativos.

nd = não detectado.

No geral os níveis de enriquecimento da polpa celulósica e de remoção das frações de hemicelulose e lignina pela ação do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar termotratado com $[\text{TEA}][\text{HSO}_4]$ foram semelhantes aos resultados reportados para o bagaço de cana-de-açúcar em sua forma natura. Entretanto, apesar de o bagaço de cana-de-açúcar em sua forma natura apresentar um teor menor de celulose (33,3%) o enriquecimento desta fração ao longo do tempo do pré-tratamento com $[\text{TEA}][\text{HSO}_4]$ foi superior quando comparado ao bagaço de cana-de-açúcar previamente termotratado (Tabelas 2 e 3).

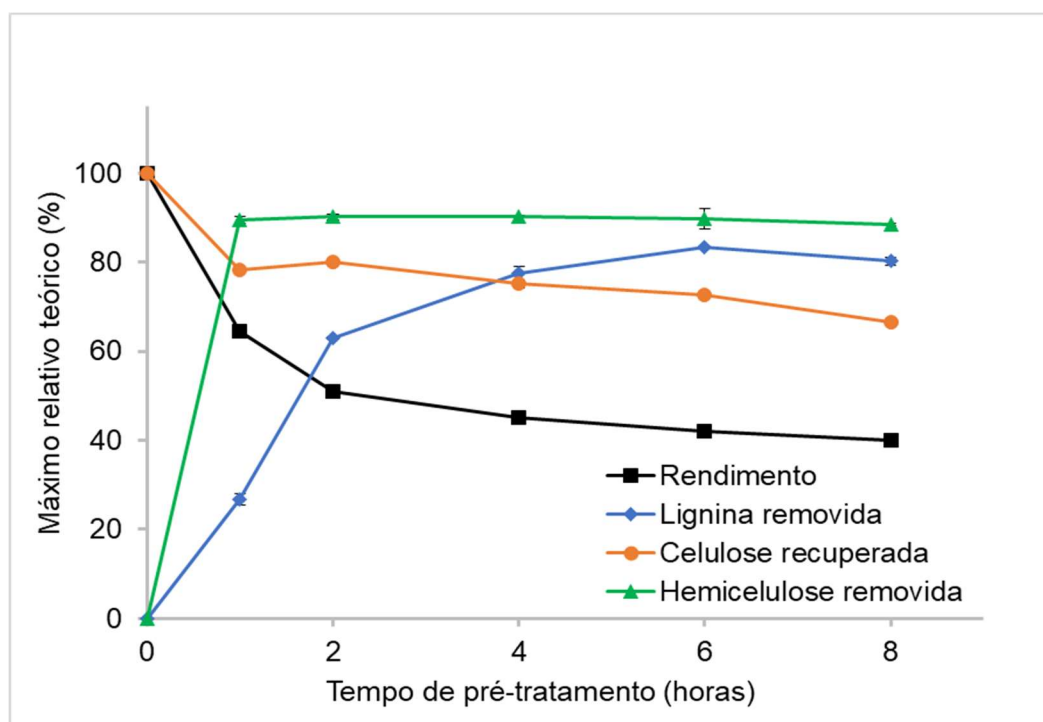
A Figura 13 apresenta o aspecto visual das polpas celulósicas recuperadas de bagaço de cana-de-açúcar previamente (termotratadoa) após o pré-tratamento com $[\text{TEA}][\text{HSO}_4]$ em função do tempo. O bagaço de cana-de-açúcar termotratado apresentou um leve escurecimento em comparação ao previamente termotratamento comparado ao bagaço de cana-de-açúcar em sua forma natura (1-2 h), isto pode ocorrer devido a dissolução e alteração estrutural da lignina catalisada por ácido. As polpas mostraram um aspecto mais escuro, principalmente nos tempos mais curtos de pré-tratamento (1-2 h), tornando-se mais esbranquiçadas após 4 h de reação (GEORGE et al., 2015).

Figura 13. Bagaço de cana-de-açúcar termotratado (tempo zero, 0h) e polpas recuperadas após pré-tratamento com $[\text{TEA}][\text{HSO}_4]$ em diferentes tempos de reação.



A Figura 14 apresenta o rendimento do pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar termotratado com [TEA][HSO₄], o índice de remoção das frações de lignina e hemicelulose, além da recuperação da polpa celulósica em função do tempo.

Figura 14. Remoção dos componentes e rendimento em função do tempo de pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar termotratado e pré-tratado com [TEA][HSO₄]. A barra do desvio padrão pode não ser visualizada quando for menor que o tamanho do marcador.



Analisando os resultados é possível observar que o índice de solubilização das frações de lignina e hemicelulose aumentam em função do tempo de reação. Os perfis dos níveis de remoção das frações de lignina e hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar termotratado foram semelhantes ao reportado para bagaço de cana-de-açúcar em sua forma natura, entretanto, destaca-se uma diferença substancial no caso da recuperação da polpa de celulósica ao longo do tempo de reação (até 8 h) do bagaço previamente termotratado, ocorrendo perda deste componente, diferentemente do bagaço de cana cana-de-açúcar em sua forma natura o qual não apresentou remoção significativa (Tabela 1), uma explicação para este efeito estaria associado ao índice de cristalinidade da celulose tornando esta fração mais susceptível a degradação pelo pré-tratamento com [TEA][HSO₄].

5.4. Pré-tratamento de palha de cana-de-açúcar com [TEA][HSO₄] e caracterização química das polpas celulósicas obtidas

A Tabela 3 apresenta a caracterização química dos componentes macromoleculares das polpas celulósicas após o pré-tratamento da palha de cana-de-açúcar em sua forma natura com [TEA][HSO₄]. As análises de composição química confirmam o enriquecimento da polpa celulósica e dissolução das frações de hemicelulose e lignina. Os resultados obtidos foram semelhantes ao pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar em sua forma natura com [TEA][HSO₄]. No entanto, para o bagaço de cana-de-açúcar em sua forma natura foi verificada uma sutil superioridade no enriquecimento da polpa celulósica recuperada quando comparado com a polpa recuperada de palha de cana-de-açúcar, além dos níveis de dissolução de lignina (por exemplo, após 8 h de reação a polpa celulósica do bagaço de cana-de-açúcar atingiu 76% de celulose, enquanto para a palha 70,5%) (Tabelas 1 e 3). Isso ocorreu devido a degradação da fração celulósica da palha de cana-de-açúcar ao longo do pré-tratamento com [TEA][HSO₄] (Tabelas 2 e 3).

Tabela 3. Composição química e rendimento de palha de cana-de-açúcar pré-tratada com [TEA][HSO₄] por diferentes tempos. Teores apresentados em porcentagem (grama/100 gramas de material bruto, dados em base seca).

Amostras	Rendimento (%)	Celulose (%)	Xilana (%)	Arabinosil (%)	Acetil (%)	Lignina (%)	Soma (%)
<i>Componentes amostras (g/100g polpa básica)</i>							
Não tratado (<i>in natura</i>)	-	34,7 ± 0,5	20,4 ± 0,3	2,2 ± 0,0	2,7 ± 0,3	25,3 ± 0,3	85,3
Tratado 1 h	66,0 ± 0,7	47,3 ± 0,7	4,0 ± 0,2	nd	nd	34,5 ± 0,8	85,8
Tratado 2 h	49,7 ± 0,8	61,1 ± 1,2	2,6 ± 0,1	nd	nd	26,1 ± 0,1	89,8
Tratado 4 h	44,0 ± 3,1	67,5 ± 0,4	3,5 ± 0,1	nd	nd	22,2 ± 0,2	93,2
Tratado 6 h	46,3 ± 0,5	70,8 ± 0,6	1,6 ± 0,1	nd	nd	16,5 ± 0,3	88,9
Tratado 8 h	41,0 ± 0,1	70,5 ± 0,4	1,9 ± 0,0	nd	nd	16,4 ± 0,3	88,8
<i>Componentes da biomassa (g/100g material original, balanço de massa)</i>							
Não tratado (<i>in natura</i>)	-	34,7 ± 0,5 ^{a,b,c,d,e,f}	20,4 ± 0,3	2,2 ± 0,0	2,7 ± 0,3	25,3 ± 0,3	85,3
Tratado 1 h	66,0 ± 0,7	27,6 ± 0,4 ^{b,c}	2,3 ± 0,1	nd	nd	20,1 ± 0,5	49,4
Tratado 2 h	49,7 ± 0,8	25,9 ± 0,5 ^c	1,1 ± 0,1	nd	nd	11,1 ± 0,0	38,1
Tratado 4 h	44,0 ± 3,1	27,0 ± 0,2 ^{d,e}	1,4 ± 0,1	nd	nd	8,9 ± 0,1	37,3
Tratado 6 h	46,3 ± 0,5	24,8 ± 0,2 ^{e,f}	0,6 ± 0,02	nd	nd	5,8 ± 0,1	31,2
Tratado 8 h	41,0 ± 0,1	22,6 ± 0,1 ^f	0,6 ± 0,01	nd	nd	5,2 ± 0,1	28,4

Todos os dados apresentados são a média aritmética seguida pelo desvio padrão amostral.

A palha de cana-de-açúcar não tratada (*in natura*) contém 2,2% de extrativos (base seca).

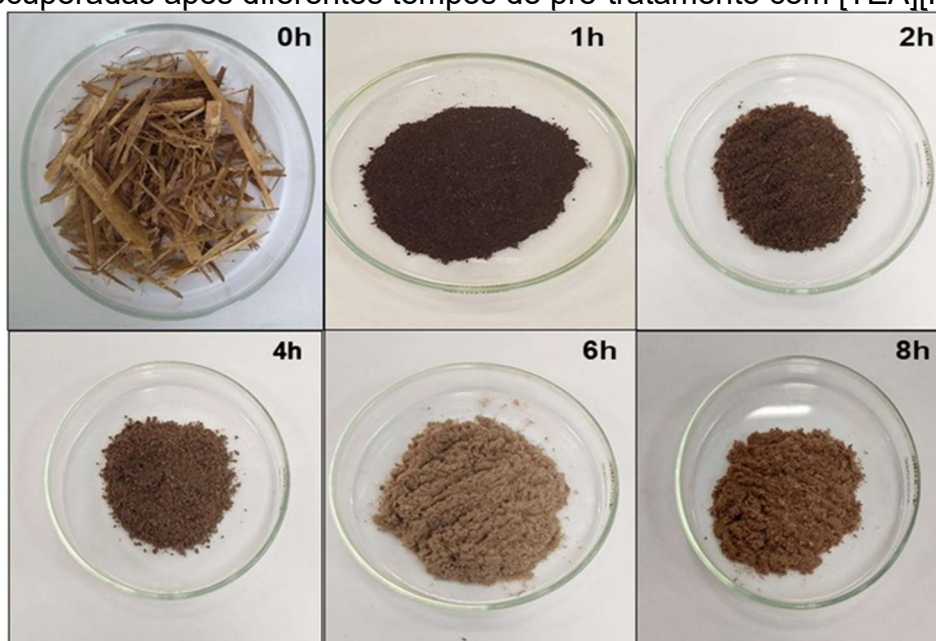
Após o pré-tratamento com [TEA][HSO₄] as polpas recuperadas não apresentaram teores significativos de extrativos.

nd = não detectado.

Os dados são média ± desvio padrão. Em cada coluna, os valores com as mesmas letras sobrescritas não diferem entre si, a um nível de significância de 0,05 (teste de Tukey).

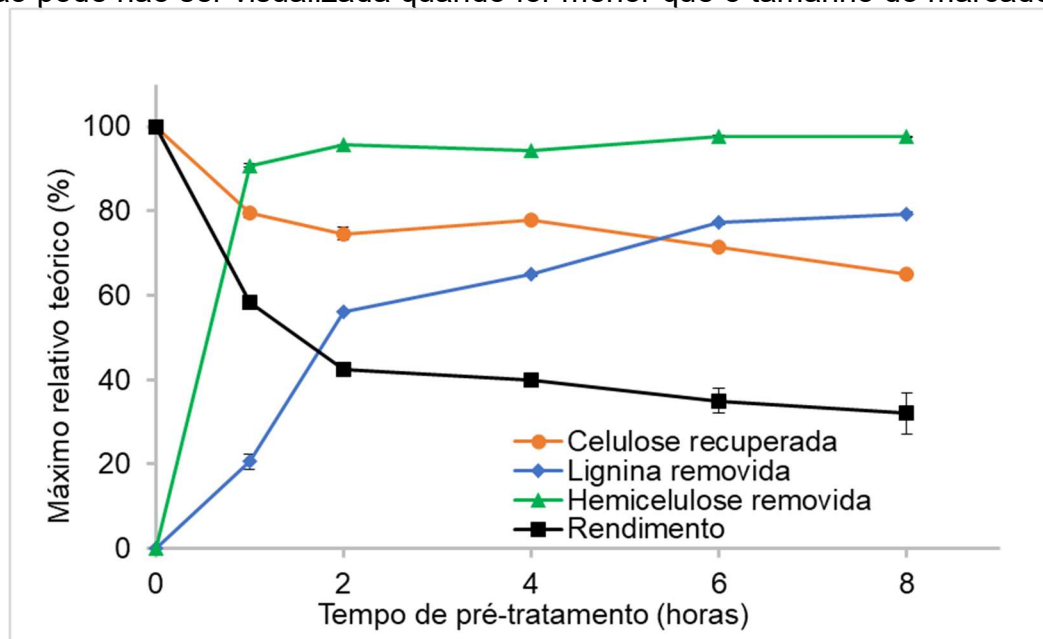
A Figura 15 apresenta o aspecto visual das polpas celulósicas recuperadas da palha de cana-de-açúcar (em sua forma natura) após o pré-tratamento com [TEA][HSO₄] em função do tempo. Os resultados foram similares ao bagaço de cana-de-açúcar em sua forma natura, ou seja, um aspecto mais escuro, principalmente nos tempos mais curtos de pré-tratamento (1-2 h), tornando-se mais esbranquiçadas após 4 h de reação.

Figura 15. Palha de cana-de-açúcar em sua forma natura (tempo zero, 0 h) e polpas recuperadas após diferentes tempos de pré-tratamento com [TEA][HSO₄].



A Figura 16 apresenta o rendimento do pré-tratamento da palha de cana-de-açúcar em sua forma natura com [TEA][HSO₄], o índice de remoção das frações de lignina e hemicelulose, além da recuperação da polpa celulósica em função do tempo.

Figura 16. Remoção dos componentes e rendimento em função do tempo de pré-tratamento de palha de cana-de-açúcar natura com [TEA][HSO₄]. A barra do desvio padrão pode não ser visualizada quando for menor que o tamanho do marcador.



Os dados mostram que o nível de remoção da fração hemicelulósica atinge um platô em 2 h de reação (aproximadamente 95%), com alterações mínimas entre 2-8 h de reação. Entretanto, a dissolução da fração de lignina não apresentou um platô definido, sendo verificado um aumento do índice de remoção desta fração, todavia, com uma diminuição da taxa de dissolução ao longo do tempo (verificandose uma maior taxa até 2h de reação), resultando em um máximo de dissolução desta fração de aproximadamente 80% em 8 h de reação. A Figura 16 também destaca uma degradação ao longo do tempo de reação da fração celulósica (recuperação média da polpa de 64% em 8 h de reação). Desta forma, os resultados obtidos com palha de cana-de-açúcar foram semelhantes aos do bagaço de cana-de-açúcar (Figura 12), ambos em suas formas natura, a exceção foi uma leve superioridade nos índices de recuperação da fração celulósica do bagaço de cana-de-açúcar quando comparado a palha de cana-de-açúcar (por exemplo 85% e 63% (m/m) em 8 h de reação, respectivamente).

A Tabela 4 apresenta a caracterização química das polpas celulósicas obtidas após o pré-tratamento com [TEA][HSO₄] em palha de cana-de-açúcar termotratada.

Tabela 4. Composição química e rendimento de palha de cana-de-açúcar termotratada e pré-tratada com [TEA][HSO₄] por diferentes tempos. Teores apresentados em porcentagem (grama/100 gramas de material bruto, dados em base seca).

Amostras	Rendimento (%)	Celulose (%)	Xilana (%)	Arabinosil (%)	Acetil (%)	Lignina (%)	Soma (%)
<i>Componentes amostras (g/100g polpa básica)</i>							
Termotratado (0h)	-	50,7 ± 1,6	7,6 ± 0,2	0,1 ± 0,02	0,1 ± 0,1	38,9 ± 1,1	97,4
Tratado 1 h	65,8	48,6 ± 0,2	3,1 ± 0,1	nd	nd	34,3 ± 0,3	86,0
Tratado 2 h	57,7	56,3 ± 0,4	3,4 ± 0,2	nd	nd	28,5 ± 0,1	88,2
Tratado 4 h	57,7	57,3 ± 0,2	3,5 ± 0,5	nd	nd	24,4 ± 0,3	85,2
Tratado 6 h	60,6	62,0 ± 0,2	3,4 ± 0,1	nd	nd	20,3 ± 0,7	85,7
Tratado 8 h	46,6	60,9 ± 0,1	5,0 ± 0,2	nd	nd	22,4 ± 0,7	88,3
<i>Componentes da biomassa (g/100g material original, balanço de massa)</i>							
Termotratado (0h)	-	50,7 ± 1,6	7,6 ± 0,2	0,1 ± 0,01	0,1 ± 0,1	38,9 ± 1,1	97,4
Tratado 1 h	65,8	31,9 ± 0,1	2,0 ± 0,0	nd	nd	22,6 ± 0,2	56,5
Tratado 2 h	57,7	27,0 ± 0,2	1,6 ± 0,1	nd	nd	13,7 ± 0,0	42,3
Tratado 4 h	57,7	25,8 ± 0,1	1,6 ± 0,3	nd	nd	11,0 ± 0,2	38,4
Tratado 6 h	60,6	26,0 ± 0,2	1,4 ± 0,0	nd	nd	8,6 ± 0,4	36,0
Tratado 8 h	46,6	24,4 ± 0,0	2,0 ± 0,1	nd	nd	9,0 ± 0,3	35,4

Todos os dados apresentados são a média aritmética seguida pelo desvio padrão de amostragem.

A palha de cana-de-açúcar previamente termotratada não apresentou teor significativo de extrativos.

nd = não detectado.

A palha de cana-de-açúcar termotratada apresentou teores superiores de celulose e lignina (50,7 e 38,9%, respectivamente) quando comparado a palha de cana-de-açúcar em sua forma natura (34,7 e 25,3%, respectivamente) (Tabelas 3 e 4). O enriquecimento destas frações ocorreu devido a seletividade do termotratamento na dissolução da fração hemicelulósica (DIAS et al., 2023; PAZ-CEDENO et al., 2021). No entanto, o enriquecimento da polpa celulósica após o pré-tratamento com [TEA][HSO₄] em palha de cana-de-açúcar termotratada foi inferior quando comparado a palha de cana-de-açúcar em sua forma natura, independente do teor de celulose da mesma (Tabelas 3 e 4). Além disso, o presente resultado não corrobora com os dados obtidos no pré-tratamento com [TEA][HSO₄] em bagaço de cana-de-açúcar termotratado, sugerindo que o termotratamento na palha de cana-de-açúcar culminou em alterações substanciais na estrutura da molécula de celulose resultando em comportamento distinto no pré-tratamento com [TEA][HSO₄] (SAHA et al., 2017) (Tabelas 2 e 4).

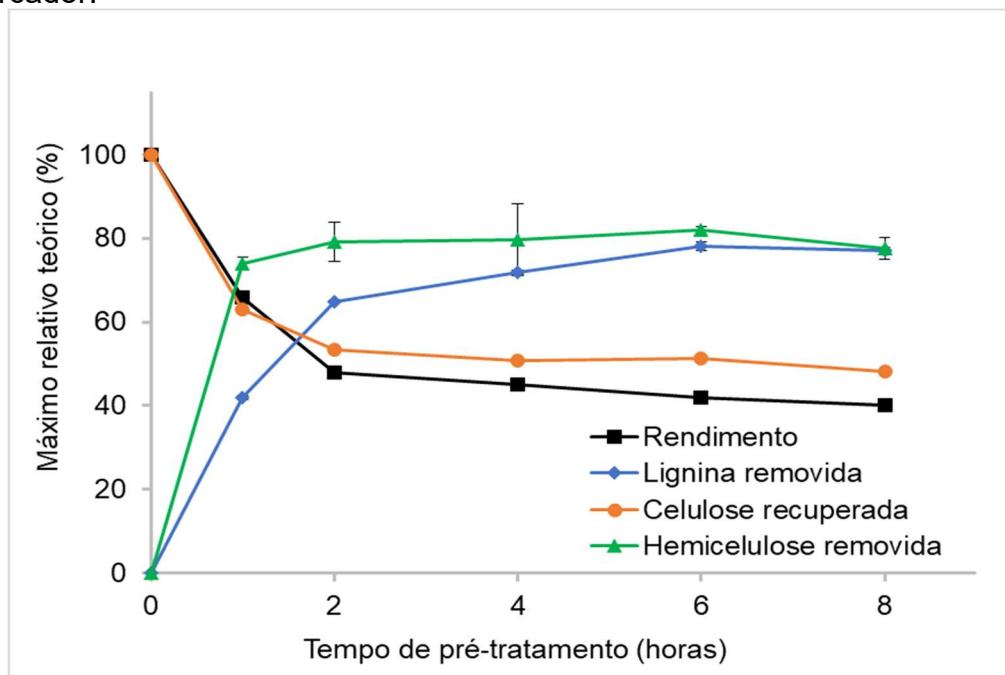
A Figura 17 apresenta o aspecto visual das polpas celulósicas recuperadas de palha de cana-de-açúcar (termotratada) após o pré-tratamento com [TEA][HSO₄] em função do tempo. A palha de cana-de-açúcar termotratada mostrou um escurecimento substancial após o termotratamento quando comparado a palha de cana-de-açúcar em sua forma natura (Figura 15). As polpas recuperadas após o pré-tratamento com [TEA][HSO₄] mostraram um aspecto mais escuro, principalmente nos tempos mais curtos de pré-tratamento (1-2 h), tornando-se mais esbranquiçadas após 4 h de reação. Além disso, quando se compara as polpas obtidas de bagaço e palha de cana-de-açúcar termotratados seguidas de pré-tratamento com [TEA][HSO₄] observa-se um aspecto mais escuro das polpas oriundas de palha de cana-de-açúcar termotratada (Figuras 13 e 17, respectivamente).

Figura 17. Palha de cana-de-açúcar termotratada (tempo zero, 0 h) e polpas recuperadas após pré-tratamento com [TEA][HSO₄] em diferentes tempos de reação.



A Figura 18 apresenta o rendimento do pré-tratamento da palha de cana-de-açúcar termotratada com [TEA][HSO₄], o índice de remoção das frações de lignina e hemicelulose, além da recuperação da polpa celulósica em função do tempo.

Figura 18. Remoção dos componentes e rendimento em função do tempo de pré-tratamento de palha de cana-de-açúcar termotratada e pré-tratada com [TEA][HSO₄]. A barra do desvio padrão pode não ser visualizada quando for menor que o tamanho do marcador.

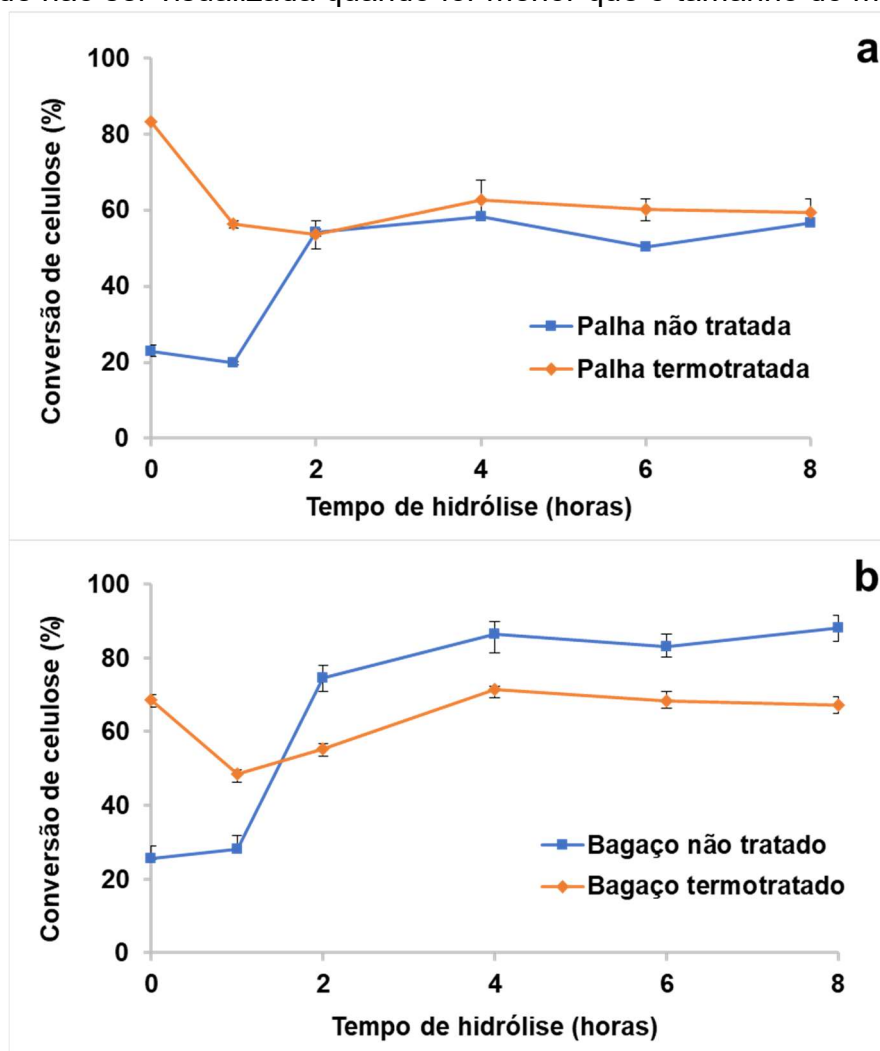


Os dados mostram que o nível de remoção da fração hemicelulósica atinge um platô em 1 h de reação (aproximadamente 78%), com alterações mínimas entre 4-8 h de reação. Entretanto, a remoção da fração de lignina não apresentou um platô definido, mas sim um aumento substancial do índice de remoção após 1 h de reação, com uma maior taxa até 2 h de reação, resultando em aproximadamente 78% de remoção em 8 h de reação. A Figura 18 também destaca remoção da fração celulósica ao longo do tempo de reação, resultando em degradação substancial a partir de 1 h de reação (recuperação média da polpa de 62%), corroborando com o menor nível de enriquecimento da polpa celulósica verificado anteriormente (Tabela 4). Desta forma, a palha de cana-de-açúcar termotratada apresentou um resultando incomum na dissolução da fração hemicelulósica e na recuperação da polpa celulósica, não corroborando com os resultados oriundos do pré-tratamento em palha e bagaço de cana-de-açúcar (em suas formas natura), bem como o bagaço de cana-de-açúcar termotratado, no entanto, o perfil de dissolução da lignina foi semelhante aos outros materiais previamente avaliados.

5.5. Hidrólise enzimática das polpas celulósicas recuperadas dos subprodutos de cana-de-açúcar após os pré-tratamentos com [TEA][HSO₄]

A Figura 19 apresenta o perfil de hidrólise enzimática de celulose em glicose das polpas obtidas após os pré-tratamentos com [TEA][HSO₄] em bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas natura e termotradas.

Figura 19. Hidrólise enzimática em função do tempo de pré-tratamento com [TEA][HSO₄]. a) Palha de cana-de-açúcar em suas formas natura e termotradas. b) Bagaço de cana-de-açúcar em suas formas natura e termotradas. Foi utilizado preparado enzimático comercial *Cellic CTec II* (Novozymes). A barra do desvio padrão pode não ser visualizada quando for menor que o tamanho do marcador.



O perfil de hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar foi semelhante para o bagaço de cana-de-açúcar, ambos em suas formas natura, com exceção que o platô de conversão para palha de cana-de-açúcar estabelecido em 2 h de reação,

atingiu uma conversão média de celulose em glicose de 55,3%, enquanto o bagaço de cana-de-açúcar atingiu uma conversão de celulose em glicose de 90%, nas mesmas condições.

Entretanto, o perfil de hidrólise enzimática do bagaço e da palha de cana-de-açúcar termotratadas seguido de pré-tratamento com [TEA][HSO₄] apresentaram resultados distintos quando comparado ao bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas natura. No tempo zero o bagaço de cana-de-açúcar (biomassa natura e termotratada) apresentaram conversões médias de celulose em glicose de 25,5 e 68,7%, respectivamente, enquanto a palha de cana-de-açúcar de 23,0 e 83,1%, respectivamente. Desta forma, as biomassas previamente termotratadas resultaram em aumento substancial da conversão de celulose em glicose.

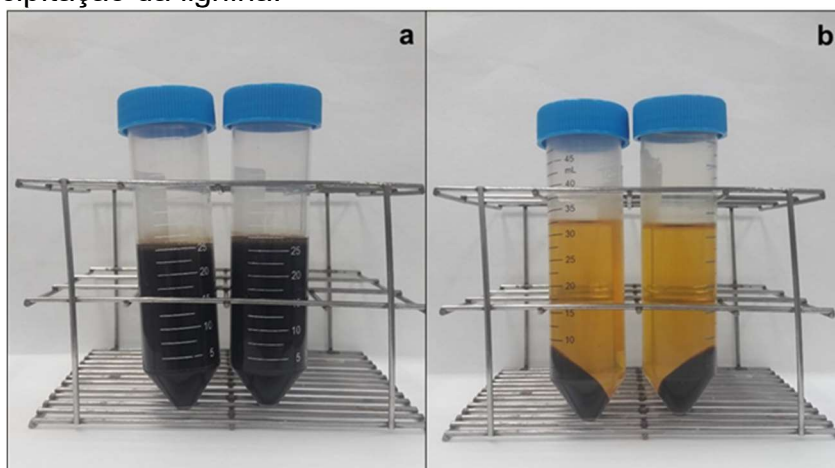
O bagaço e a palha de cana-de-açúcar em suas formas natura apresentaram um aumento na conversão de celulose em glicose ao longo do pré-tratamento com [TEA][HSO₄] atingindo-se um platô em 4 h de reação (conversão média de celulose em glicose de 86,4 e 58,3%, respectivamente). O bagaço de cana-de-açúcar termotratado apresentou uma ligeira diminuição na hidrólise enzimática após o pré-tratamento com [TEA][HSO₄] em até 2 h de reação, entretanto, recuperando-se o patamar do tempo zero após 4 h de reação. No entanto, a palha de cana-de-açúcar termotratada apresentou uma diminuição substancial na conversão de celulose em glicose após 1 h de reação (conversão média de celulose em glicose de 58,4%) permanecendo neste patamar até 8 h de reação.

Os resultados de hidrólise enzimática das polpas celulósicas em estudo corroboram com a literatura (BRANDT-TALBOT et al., 2017; GSCHWEND et al., 2016). Os autores reportaram uma conversão de celulose em glicose média de 75% em 9 h de pré-tratamento de biomassa de *Miscanthus* em sua forma natura com [TEA][HSO₄] sendo verificado um platô a partir deste tempo de reação, enquanto para o bagaço de cana-de-açúcar em sua forma natura foi conferido uma conversão de celulose em glicose média de 90% em 8 h de pré-tratamento com [TEA][HSO₄].

5.6. Obtenção das ligninas da fração líquida dos subprodutos de cana-de-açúcar após os pré-tratamentos com [TEA][HSO₄]

Ao final dos pré-tratamentos dos subprodutos de cana-de-açúcar com [TEA][HSO₄] foram recuperados os licores (fração líquida) e os líquidos oriundos das extrações alcóolicas na etapa de recuperação das polpas celulósicas. Esses líquidos foram misturados e concentrados (licor concentrado) e posteriormente diluídos com água para precipitação da lignina (obtendo-se o licor diluído e a lignina precipitada). A Figura 20 apresenta o aspecto visual do licor concentrado e diluído, além da lignina precipitada de bagaço de cana-de-açúcar em sua forma natura após 6 h de pré-tratamento com [TEA][HSO₄], outras amostras e tempos de reação apresentaram aspecto semelhante.

Figura 20. Licores oriundos de bagaço de cana-de-açúcar em sua forma natura após pré-tratamento com [TEA][HSO₄] por 6 h. (a) Licor concentrado. (b) Licor diluído e precipitação da lignina.



As Figuras 21, 22, 23 e 24 apresentam os espectros de varredura na região do ultravioleta (UV) dos licores (concentrado e diluído) obtidos de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas natura e termotratada.

Figura 21. Epectros de varreduras na região do ultravioleta (UV) do licor concentrado e diluído após precipitação da lignina por diferentes tempos de pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar em sua forma natura com [TEA][HSO₄].

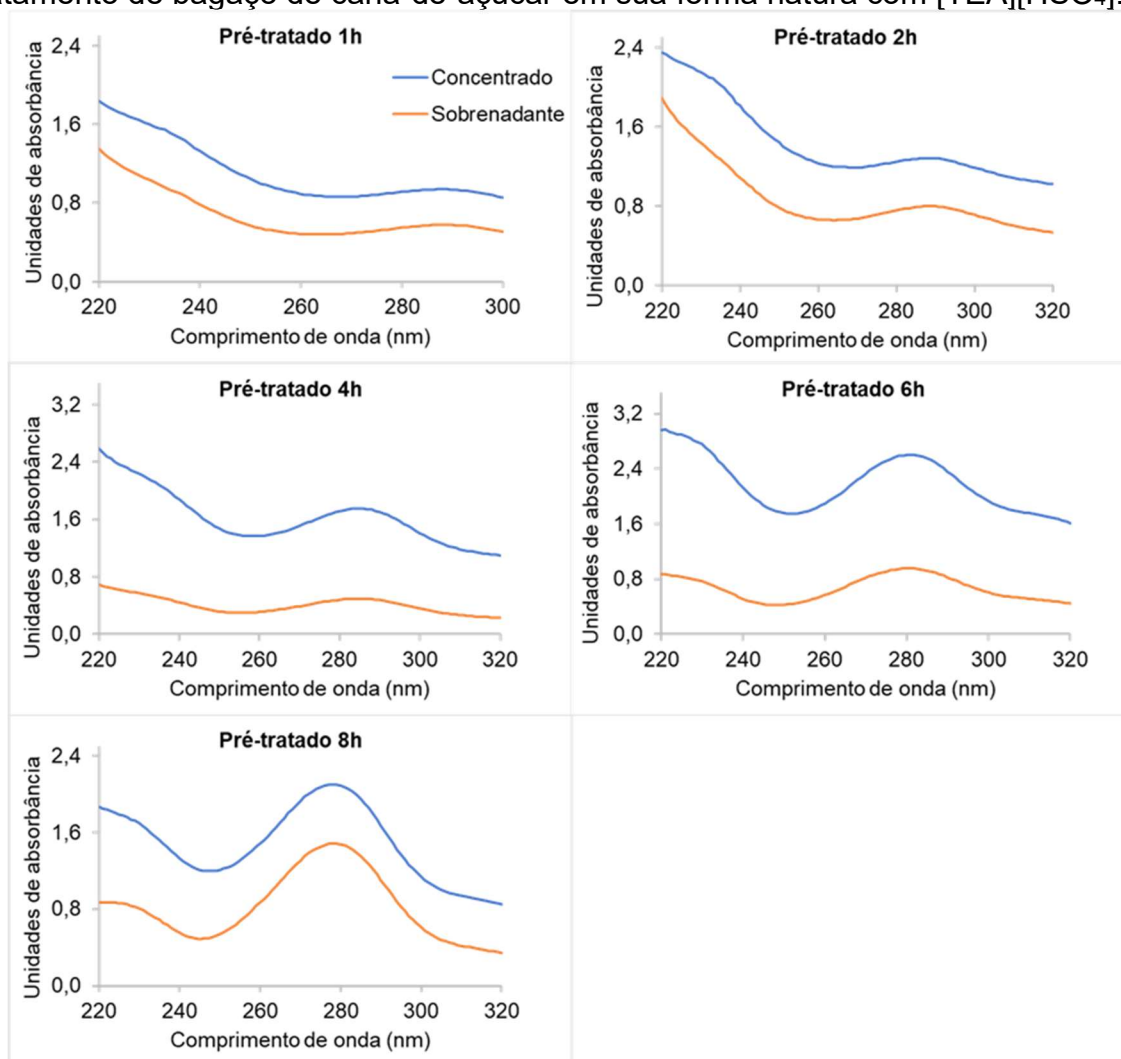


Figura 22. Espectros de varreduras na região do ultravioleta (UV) do licor concentrado e diluído obtido após precipitação da lignina por diferentes tempos de pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar termotratado com $[\text{TEA}][\text{HSO}_4]$.

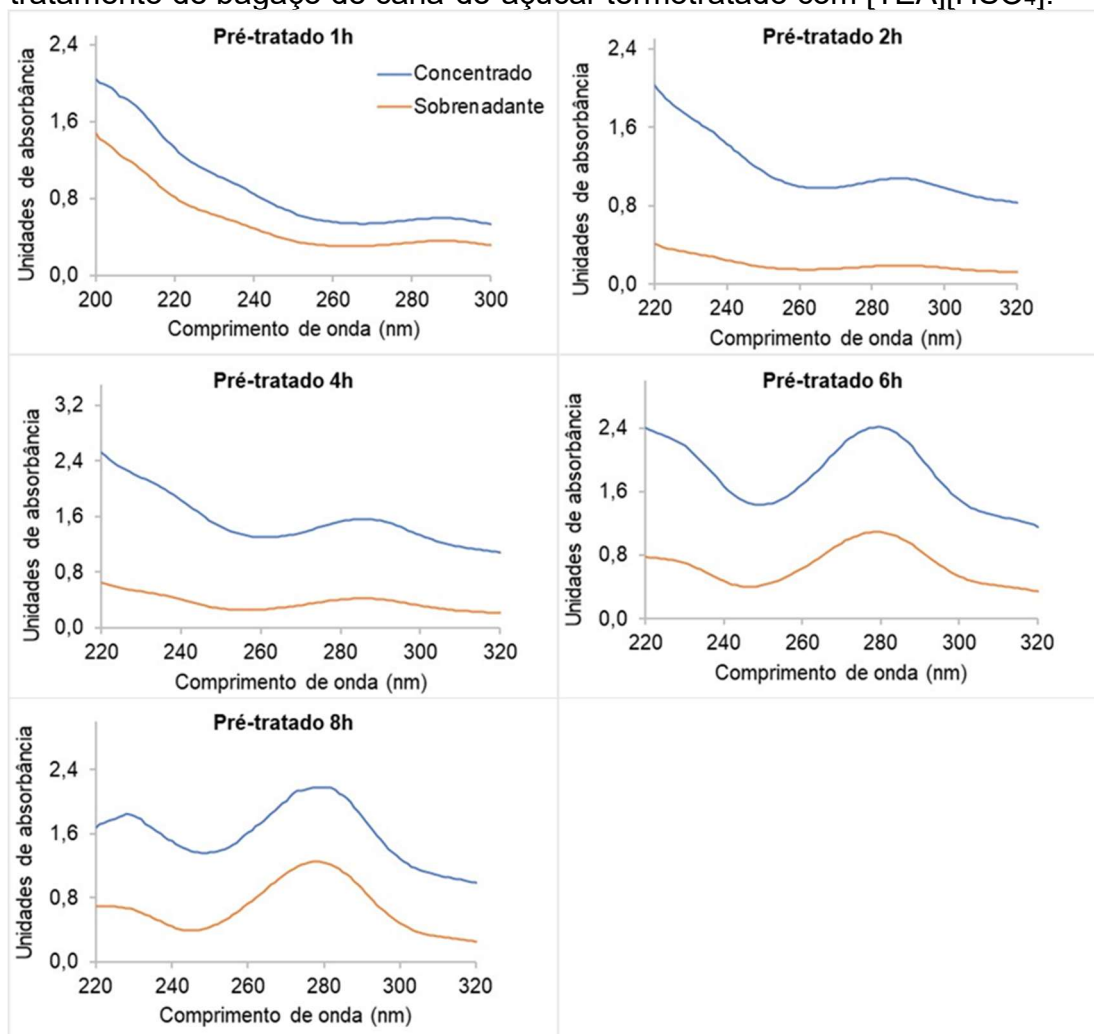


Figura 23. Espectros de varreduras na região do ultravioleta (UV) do licor concentrado e diluído após precipitação da lignina por obtido após diferentes tempos de pré-tratamento de palha de cana-de-açúcar em sua forma natura com [TEA][HSO₄].

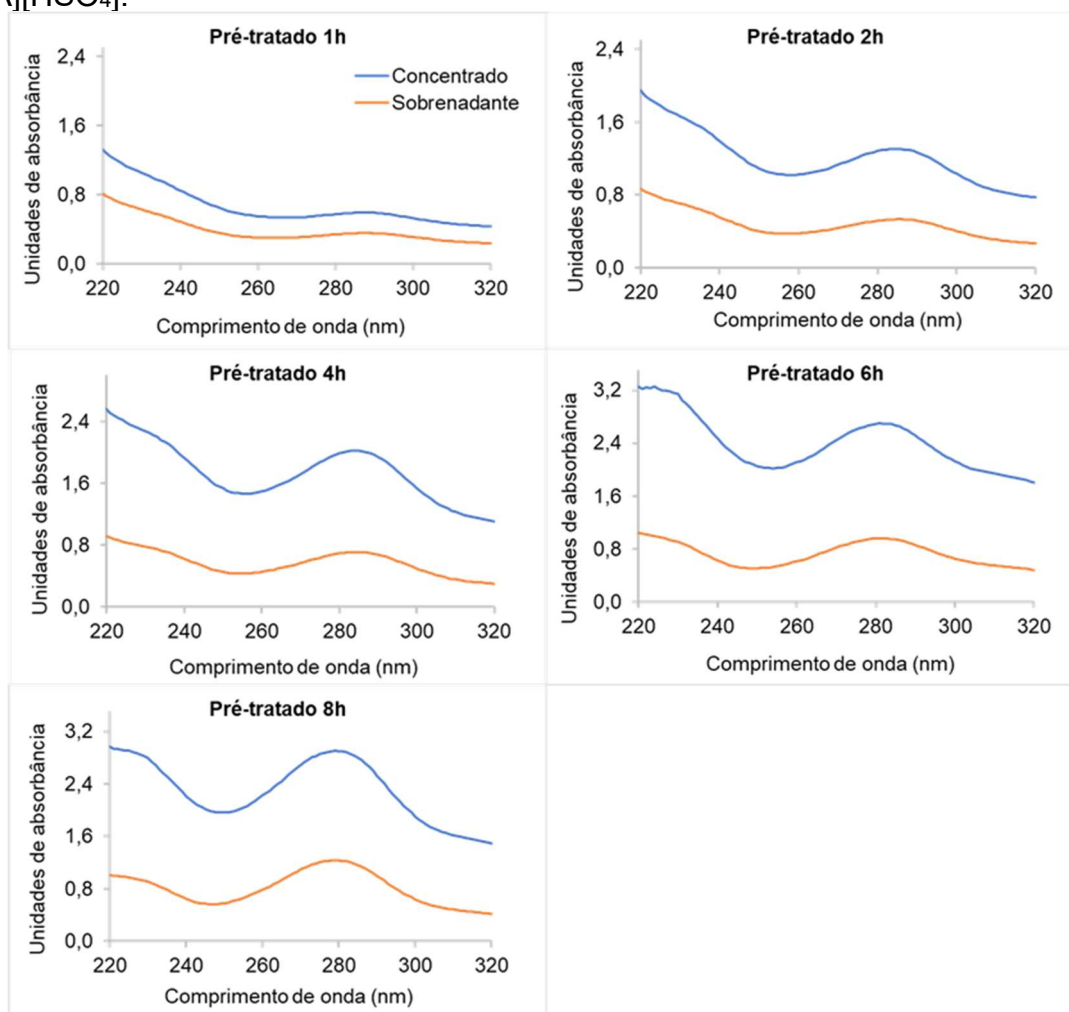
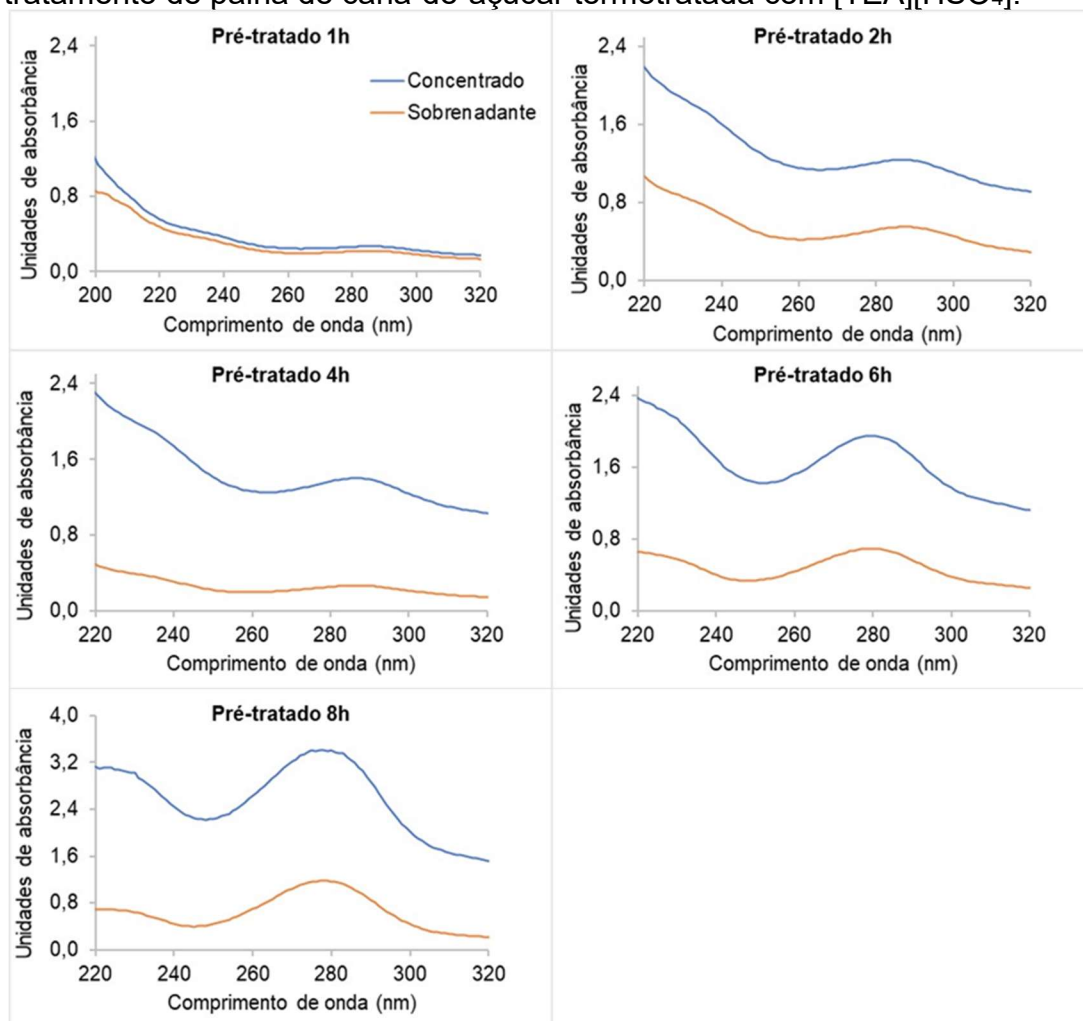


Figura 24. Espectros de varreduras na região do ultravioleta (UV) do licor concentrado e diluído obtido após precipitação da lignina por diferentes tempos de pré-tratamento de palha de cana-de-açúcar termotratada com [TEA][HSO₄].

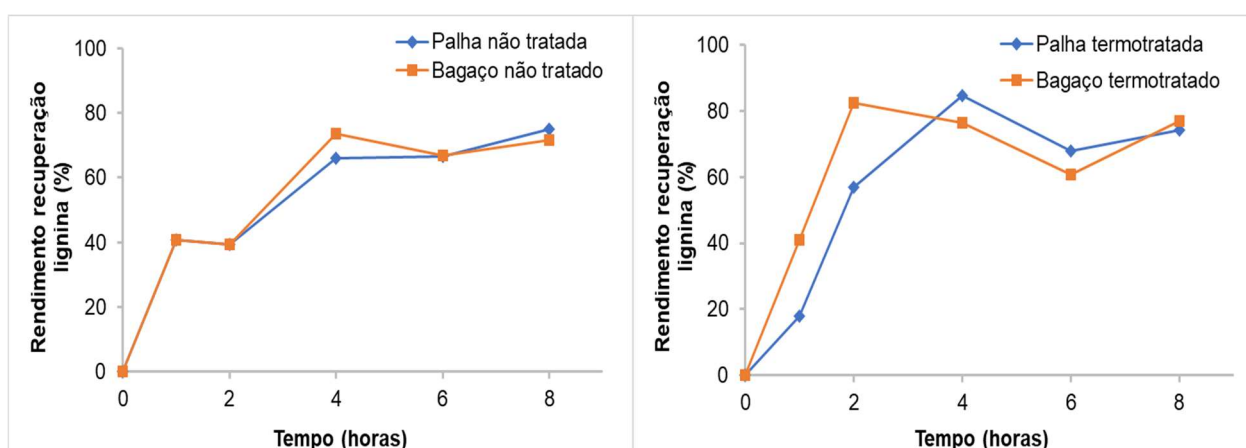


Os espectros foram característicos de lignina de bagaço de cana-de-açúcar apresentando duas bandas principais na região do UV (máximo em 220 e 280 nm) (FENGEL; WEGENER, 1989; EK et al., 2009; MAHMOUD et al., 2021). Foi averiguado um aumento substancial na intensidade das bandas características de lignina após 4 h de reação. Além disso, é notável a diminuição da intensidade das mesmas bandas no licor diluído quando comparado ao licor concentrado resultando na precipitação da lignina corroborando com os resultados de dissolução da mesma (Figuras 12, 14, 6 e 18).

A Figura 25 apresenta os rendimentos de recuperação da lignina em função do tempo de pré-tratamento com [TEA][HSO₄] das amostras em estudo. O rendimento de recuperação de lignina do bagaço e da palha de cana-de-açúcar em suas formas natura foram semelhantes atingido um platô em 4 h de reação

(rendimentos médios de 69,3 e 70,8%, respectivamente). A palha de cana-de-açúcar termotratada mostrou um resultado similar à palha de cana-de-açúcar em sua forma natura atingindo um rendimento médio de recuperação de lignina de 75,6%. O bagaço de cana-de-açúcar termotratado mostrou um platô em 2 h de pré-tratamento atingindo um rendimento médio de recuperação de lignina de 74,3%. Os resultados obtidos corroboram com os reportados pela literatura (BRANDT-TALBOT et al., 2017; GSCHWEND et al., 2016). Os autores reportaram um rendimento médio de recuperação de lignina de 75% após 9 h de pré-tratamento de biomassa de *Miscanthus* com [TEA][HSO₄] sendo averiguado um platô a partir deste tempo de reação, enquanto para o bagaço de cana-de-açúcar em sua forma natura foi conferido um rendimento médio de recuperação de lignina de 75% após 8 h de pré-tratamento com [TEA][HSO₄].

Figura 25. Rendimento de recuperação de lignina em função do tempo de pré-tratamento de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas natura e termotratada seguido de pré-tratamento com [TEA][HSO₄].



As Figuras 26, 27, 28 e 29 apresentam os aspectos visuais das ligninas recuperadas das amostras em estudo. No geral as aparências das ligninas foram semelhantes para todas as amostras em estudo, apresentando um aspecto marrom claro o que indica alta pureza (FENGEL; WEGENER, 1983; EK et al., 2009; MAHMOUD et al., 2021).

Figura 26. Ligninas recuperadas de bagaço de cana-de-açúcar em sua forma natura após pré-tratamento com [TEA][HSO₄] em diferentes tempos de reação.

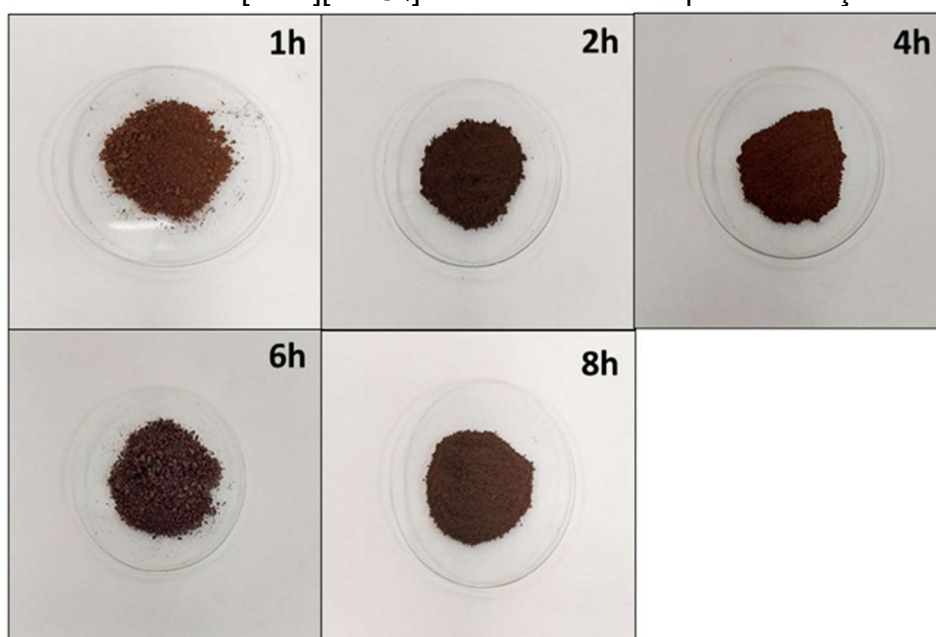


Figura 27. Ligninas recuperadas de bagaço de cana-de-açúcar termotratado após pré-tratamento com [TEA][HSO₄] em diferentes tempos de reação.

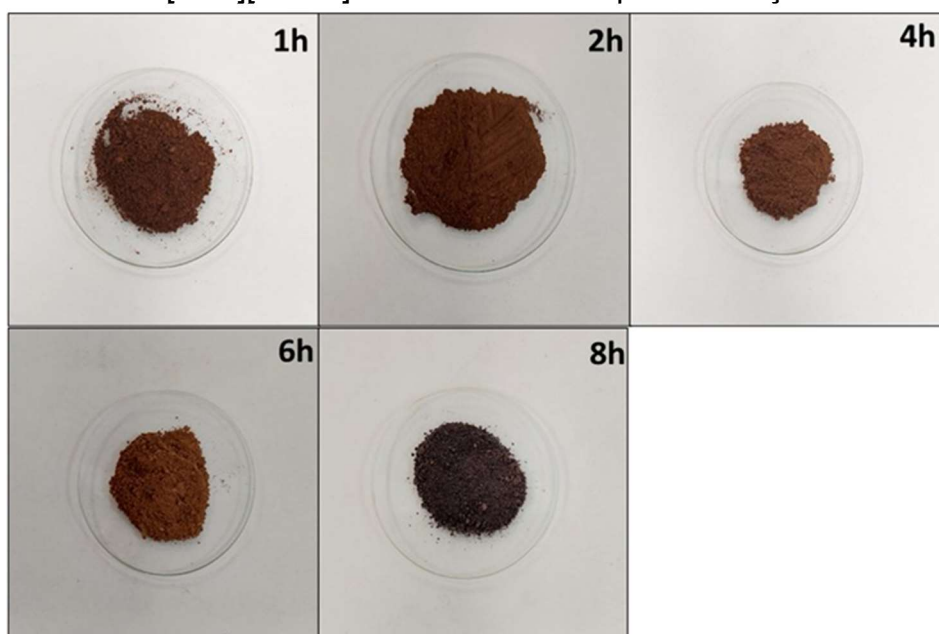


Figura 28. Ligninas recuperadas de palha de cana-de-açúcar em sua forma natura após pré-tratamento com [TEA][HSO₄] em diferentes tempos de reação.

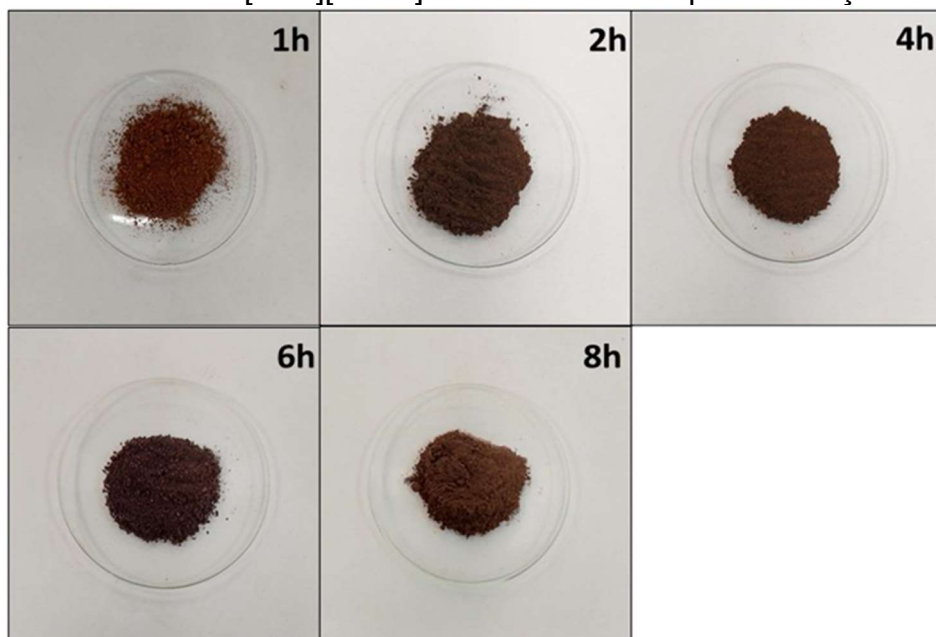
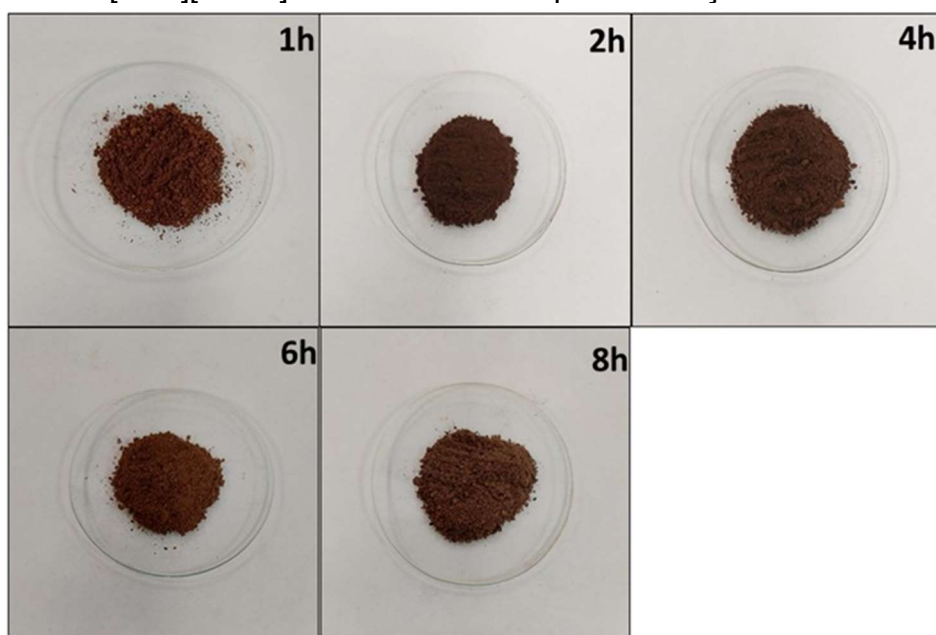


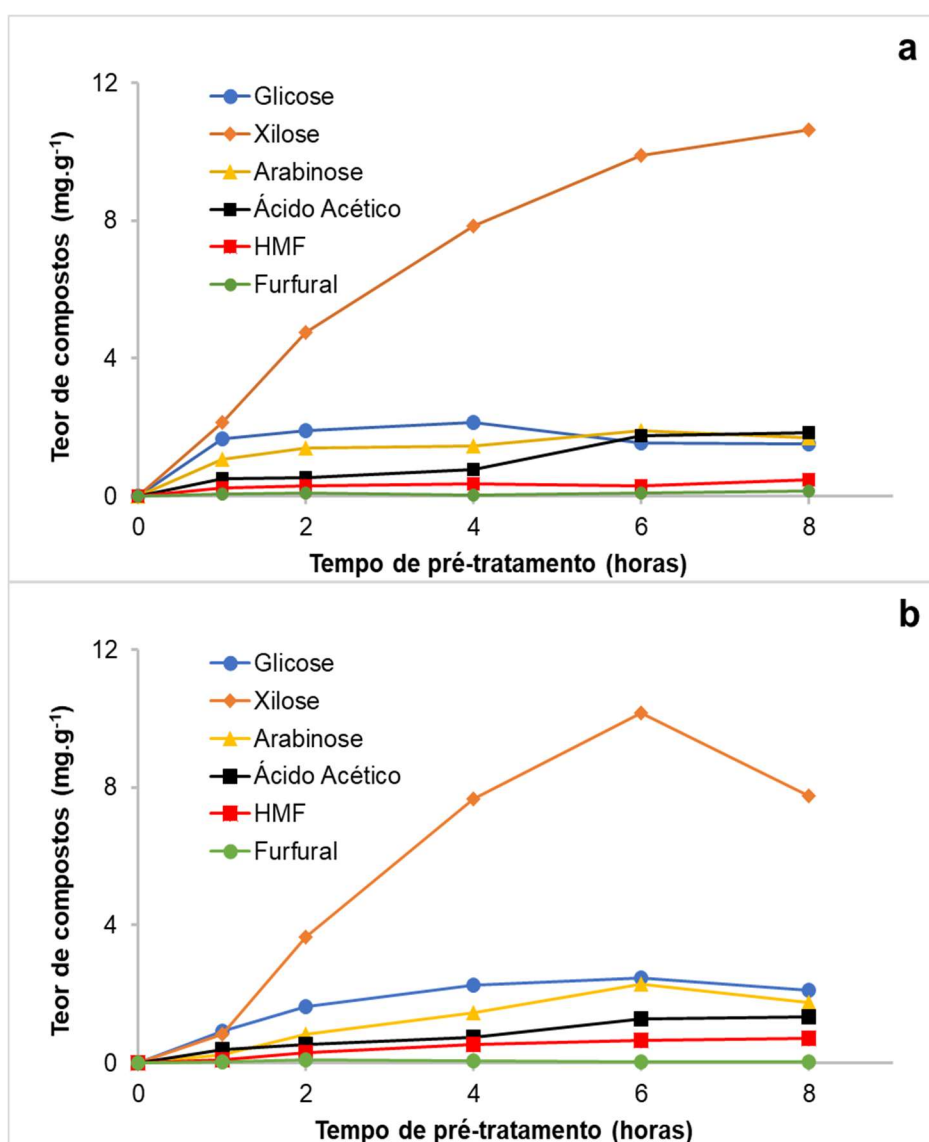
Figura 29. Ligninas recuperadas de palha de cana-de-açúcar termotratada após pré-tratamento com [TEA][HSO₄] em diferentes tempos de reação.



5.7. Determinação da formação de compostos das frações líquidas obtidas dos subprodutos de cana-de-açúcar após os pré-tratamentos com [TEA][HSO₄]

A Figura 30 apresenta os teores de produtos formados na fração líquida (licor) obtida após os pré-tratamentos com [TEA][HSO₄] do bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas livres.

Figura 30. Perfil de açúcares monoméricos, produtos de desidratação e ácidos carboxílicos da fração líquida após o pré-tratamento dos subprodutos de cana-de-açúcar com [TEA][HSO₄]. (a) Bagaço de cana-de-açúcar em sua forma natural. (b). Palha de cana-de-açúcar em sua forma natural. Teores apresentados em miligramas de composto por grama de biomassa pré-tratada (base seca).

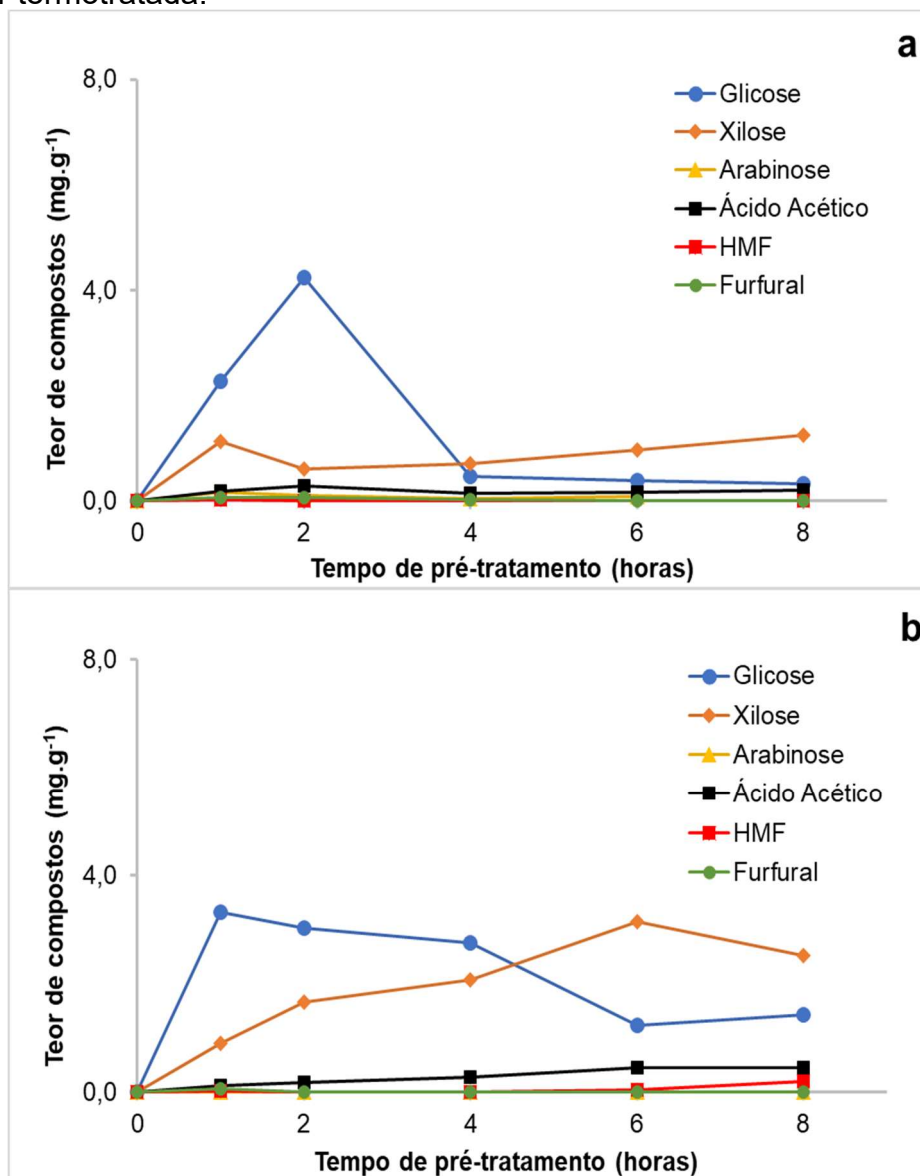


O perfil dos teores de glicose, arabinose, ácido acético, HMF e furfural na fração líquida (licor) oriunda dos pré-tratamentos com [TEA][HSO₄] em bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas naturais foram relativamente pequenos, se destacou o teor de xilose o qual foi observado um ligeiro aumento ao longo do tempo (Figuras 30ab). O teor máximo de xilose no licor oriundo do pré-tratamento com [TEA][HSO₄] em bagaço de cana-de-açúcar em sua forma natural foi de aproximadamente 10,6 (mg.g⁻¹) o que ocorreu em 8 h de reação (Figura 30a). Esse máximo corrobora com a diminuição significativa do teor de xilana na polpa (Tabela 1 e Figura 12). O teor máximo de xilose no licor oriundo do pré-tratamento com [TEA][HSO₄] em palha de cana-de-açúcar em sua forma natural foi também de aproximadamente 10,6 (mg.g⁻¹) porém, ocorreu em 6 h de reação (Figura 30b), pois em 8 h de reação houve diminuição do teor de xilose o que pode ser explicado pelo seu consumo em reações de desidratação em meio ácido e outras reações secundárias (BRANDT-TALBOT et al., 2017; GSCHWEND et al., 2016; EK et al., 2009; FENGEL; WEGENER, 1983).

É importante ressaltar que foram detectadas apenas pequenas quantidades de glicose, HMF e furfural, além disso, não foi detectado a presença de ácido levulínico no licor. As pequenas quantidades de glicose no licor corroboram com o alto rendimento de recuperação da fração celulósica da polpa obtida após o pré-tratamento com [TEA][HSO₄] (Tabelas 1 e 2 e Figuras 12 e 14) (BRANDT-TALBOT et al., 2017). Além disso, um balanço de massa revelou que os grupos arabinosil e acetil foram completamente removidos durante o pré-tratamento com [TEA][HSO₄] (Figura 30 e Tabelas 1 e 2).

A Figura 31 apresenta os teores de produtos formados na fração líquida (licor) obtida após os pré-tratamentos com [TEA][HSO₄] no bagaço e palha de cana-de-açúcar previamente termotratados.

Figura 31. Perfil de açúcares monoméricos, produtos de desidratação e ácidos carboxílicos da fração líquida após o pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos com [TEA][HSO₄]. (a) Bagaço de cana-de-açúcar termotratado. (b). Palha de cana-de-açúcar termotratada.



A Figura 31ab apresenta teores de glicose maiores quando comparado aos licores do bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas natura (Figura 30). Esse resultado corrobora com a degradação parcial da fração celulósica do bagaço e da palha de cana-de-açúcar previamente termotratados (Tabelas 2 e 4; Figuras 14 e 18). Entretanto, os teores de xilose, arabinose, HMF e furfural culminaram em valores inferiores comparado aos licores do bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas natura (Figura 31). Os teores inferiores destes compostos nos licores

oriundos do bagaço e palha de cana-de-açúcar termotratados corroboram com a remoção da fração hemicelulósica dos materiais após a etapa de termotratamento (Tabelas 3 e 4 e Figuras 14 e 16) (EK et al., 2009; FENGEL; WEGENER, 1983).

5.8. Caracterização química e estrutural das ligninas obtidas dos subprodutos de cana-de-açúcar após pré-tratamento com [TEA][HSO₄]

Os estudos de caracterização visam identificar as alterações químicas e estruturais das ligninas após os pré-tratamentos dos subprodutos de cana-de-açúcar com [TEA][HSO₄]. As ligninas recuperadas foram apresentadas nas Figuras 26, 27, 28 e 29.

5.8.1 Caracterização química

A Tabela 5 apresenta a caracterização química das ligninas recuperadas após o pré-tratamento de bagaço e palha de cana-de-açúcar com [TEA][HSO₄]. A análise da composição química apresenta uma diferença na porcentagem dos teores de lignina, celulose, xilana e cinzas das amostras em estudo quando comparados com uma a lignina comercial (lignina *Kraft*). Podemos observar que os grupos pendentes (arabinosil e acetil) não foram detectados nas ligninas obtidas dos subprodutos de cana-de-açúcar após o pré-tratamento com [TEA][HSO₄].

Tabela 5. Composição química de ligninas obtidas de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas natura após pré-tratamento com [TEA][HSO₄] por diferentes tempos. Teores apresentados em porcentagem (grama/100 gramas de material bruto, dados em base seca).

Amostra ligninas	Lignina Total (%)	Celulose (%)	Xilana (%)	Cinzas (%)	Total (%)
Lignina Kraft*	50,00 ± 2,00 ^{a,b,c,d,e,f}	0,60 ± 0,00	1,60 ± 0,00	49,20 ± 0,40	101,04
Lignina Bagaço 1 h	79,39 ± 0,14 ^b	8,72 ± 0,15	0,90 ± 0,04	5,47 ± 0,04	94,48
Lignina Bagaço 2 h	86,44 ± 0,20 ^{c,b}	5,31 ± 0,07	0,53 ± 0,00	6,47 ± 0,19	98,74
Lignina Bagaço 4 h	81,55 ± 0,43 ^{d,b}	8,84 ± 0,15	0,47 ± 0,01	4,66 ± 0,05	95,53
*Lignina Bagaço 6 h	79,26 ± 0,24 ^{e,c}	7,88 ± 0,06	0,84 ± 0,00	5,10 ± 0,06	93,08
Lignina Bagaço 8 h	92,50 ± 0,33 ^f	1,59 ± 0,16	0,83 ± 0,01	2,18 ± 0,14	97,11
Lignina Palha 1 h	83,37 ± 0,23 ^{b,c,d,e,f}	9,74 ± 0,14	0,52 ± 0,01	3,44 ± 0,05	97,07
Lignina Palha 2 h	79,33 ± 0,12 ^{c,b}	10,01 ± 0,02	0,94 ± 0,02	9,11 ± 0,04	99,39
Lignina Palha 4 h	76,49 ± 0,36 ^{d,b,c}	10,12 ± 0,08	0,45 ± 0,02	7,35 ± 0,19	94,41
Lignina Palha 6 h	84,14 ± 0,31 ^{e,c,d}	7,76 ± 0,06	0,46 ± 0,01	4,52 ± 0,13	96,88
Lignina Palha 8 h	89,32 ± 0,24 ^f	3,41 ± 0,08	0,46 ± 0,03	3,46 ± 0,03	96,65

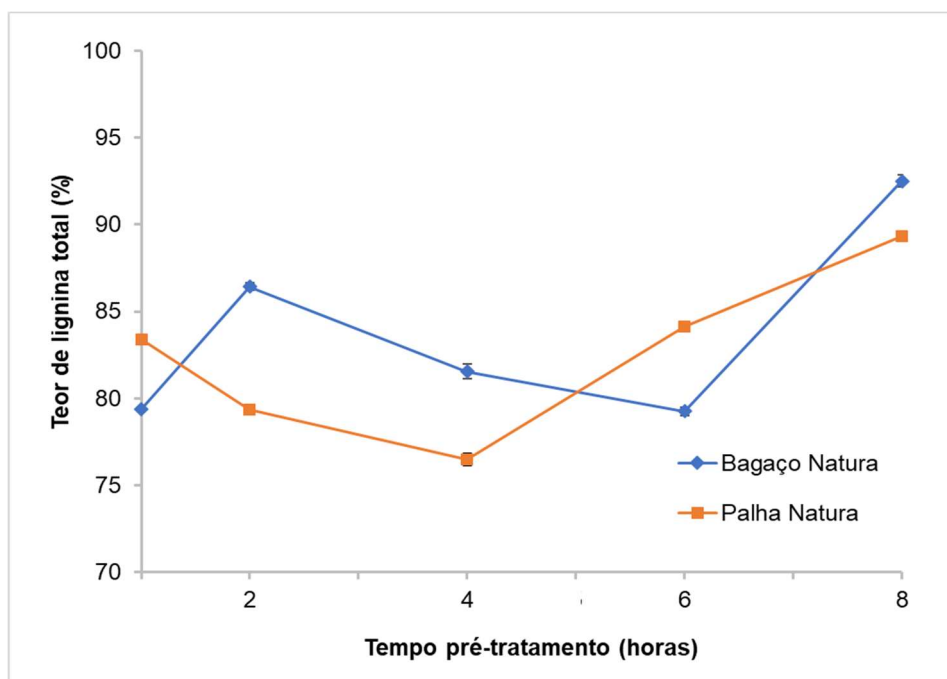
*Lignina Kraft comercial (Sigma-Aldrich).

Os dados são média ± desvio padrão. Em cada coluna, os valores com as mesmas letras sobrescritas não diferem entre si, a um nível de significância de 0,05 (teste de Tukey).

A determinação da estrutura das ligninas requer a utilização de amostras purificadas, desprovidas de carboidratos e extrativos, como no caso da lignina *Kraft*. Esta última apresenta uma composição com aproximadamente 50% de lignina total, além de baixos teores de celulose (0,6%) e xilana (1,6%). Em comparação com as ligninas provenientes de bagaço de cana-de-açúcar deste trabalho, observa-se uma variação nos teores, entre 79-92% de lignina total, conforme o tempo de pré-tratamento, com diferenças estatisticamente significativas evidenciadas por meio do teste de *Tukey* (Tabela 5). As ligninas obtidas da palha de cana-de-açúcar apresentam percentuais de lignina total que variaram de 76-89%, superando os valores obtidos para a lignina *Kraft* (Tabela 5). Entretanto, os teores de celulose revelam-se progressivamente superiores, com variações de 1,6-8,7% e 3,4-10,1% para as ligninas obtidas de bagaço e palha de cana-de-açúcar, respectivamente. No que diz respeito à fração de xilana, os valores situaram-se entre 0,5-0,9% e 0,4-0,9% para as ligninas de bagaço e palha de cana-de-açúcar, respectivamente. Esses teores de celulose e xilana são relativamente baixos e estão associadas ao método de pré-tratamento empregado (BRANDT-TALBOT et al., 2017; SALIBA et al., 2001). Os teores de cinzas variam entre 2,2-6,5% e 3,4-9,1% para as ligninas de bagaço e palha de cana-de-açúcar, respectivamente, valores muito menores ao encontrando na lignina *Kraft* (49,2%), portanto, as ligninas obtidas no presente trabalho resultando em maior pureza.

A Figura 32 apresenta as porcentagens de lignina total, ou seja, a pureza das ligninas obtidas em função do tempo de pré-tratamento com [TEA][HSO₄]. As ligninas obtidas de bagaço e de palha de cana-de-açúcar atingiram um teor máximo em 8 h de pré-tratamento (92% e 85%), respectivamente, com diferenças estatisticamente significativas evidenciadas por meio do teste de *Tukey*. Entretanto, a palha de cana-de-açúcar mostrou um aumento significativo em 1 h de reação, atingindo 85% de pureza (Tabela 5).

Figura 32. Teor de lignina total em função do tempo de pré-tratamento de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas natura com [TEA][HSO₄]. A barra do desvio padrão pode não ser visualizada quando for menor que o tamanho do marcador.



A Tabela 6 apresenta a caracterização química das ligninas recuperadas após o pré-tratamento de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas previamente termotratadas com [TEA][HSO₄]. A análise da composição química apresenta distintos teores e mostra diferença na porcentagem de lignina, celulose, xilana e cinzas das amostras em estudo quando comparado com a lignina comercial (lignina *Kraft*). Podemos observar que os grupos pendentes (arabinosil e acetil) não foram detectados nas ligninas em estudo após o pré-tratamento com [TEA][HSO₄].

Tabela 6. Composição química de ligninas obtidas de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas termotratadas após pré-tratamento com [TEA][HSO₄] por diferentes tempos. Teores apresentados em porcentagem (grama/100 gramas de material bruto, dados em base seca)

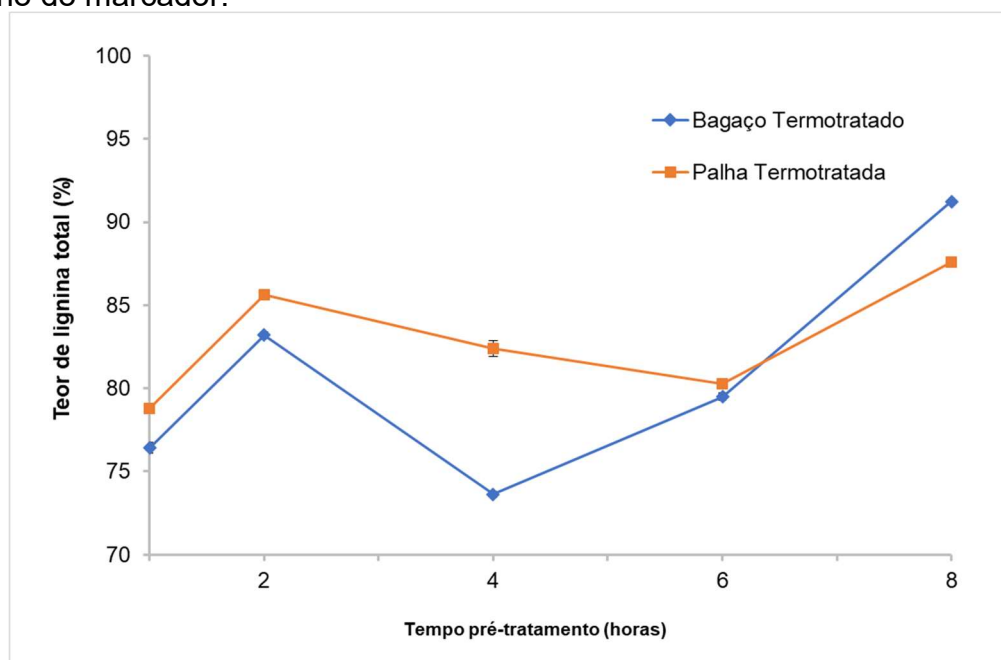
Amostras ligninas	Lignina Total (%)	Celulose (%)	Xilana (%)	Cinzas (%)	Total (%)
Lignina Kraft*	50,00 ± 2,00 ^{a,b,c,d,e,f}	0,60 ± 0,00	1,60 ± 0,00	49,20 ± 0,40	101,04
Lignina Bagaço termotratada 1 h	76,43 ± 0,33 ^b	10,45 ± 0,12	1,07 ± 0,02	8,58 ± 0,17	96,52
Lignina Bagaço termotratada 2 h	83,19 ± 0,16 ^{c,b}	8,41 ± 0,04	0,72 ± 0,01	3,05 ± 0,04	95,38
Lignina Bagaço termotratada 4 h	73,64 ± 0,16 ^{d,c}	14,36 ± 0,30	1,04 ± 0,02	5,19 ± 0,14	94,22
Lignina Bagaço termotratada 6 h	79,50 ± 0,20 ^{e,d}	9,34 ± 0,11	0,96 ± 0,01	4,59 ± 0,09	94,38
Lignina Bagaço termotratada 8 h	91,25 ± 0,09 ^f	4,20 ± 0,07	0,26 ± 0,01	2,29 ± 0,07	98,01
Lignina Palha termotratada 1 h	78,81 ± 0,24 ^{b,c,d,e}	6,19 ± 0,01	0,62 ± 0,00	6,60 ± 0,01	92,23
Lignina Palha termotratada 2 h	85,64 ± 0,25 ^{c,b}	4,14 ± 0,02	0,73 ± 0,01	5,87 ± 0,09	96,37
Lignina Palha termotratada 4 h	82,38 ± 0,49 ^{d,b}	5,08 ± 0,10	0,52 ± 0,01	4,20 ± 0,09	92,19
Lignina Palha termotratada 6 h	80,29 ± 0,24 ^{e,d}	6,27 ± 0,10	0,61 ± 0,01	5,65 ± 0,27	92,82
Lignina Palha termotratada 8 h	87,60 ± 0,11 ^f	3,16 ± 0,04	0,62 ± 0,00	5,57 ± 0,09	96,96

*Lignina Kraft comercial (Sigma-Aldrich).

As ligninas provenientes de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas termotradas pré-tratadas com [TEA][HSO₄] apresentaram variação nos teores de lignina total de 76-91% e 78,8-87,6%, respectivamente, conforme o tempo de pré-tratamento, com diferenças estatísticas significativas evidenciadas por meio do teste de *Tukey*. As ligninas obtidas de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas termotradas resultaram em maior pureza quando comparado a lignina *Kraft*. Entretanto, os teores de celulose nas ligninas de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas termotradas revelaram-se progressivamente superiores, com variações de 4,2-10,4% e 3,2-6,3%, respectivamente. No que diz respeito à fração de xilana, os valores situaram-se entre 0,3-1,1% e 0,5-0,7% para as ligninas de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas termotradas, respectivamente. Os teores de cinzas variaram entre 2,3-8,6% e 4,2-6,6% para as ligninas de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas termotradas, respectivamente, valores muito menores ao encontrando na lignina *Kraft* (49,2%), portanto, as ligninas obtidas resultaram em maior pureza. Além disso, é possível verificar que os teores dos componentes das ligninas de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas natura (Tabela 5) foram semelhantes às ligninas de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas termotradas (Tabela 6).

A Figura 33 apresenta as porcentagens de lignina total, ou seja, a pureza das ligninas obtidas em função do tempo de pré-tratamento com [TEA][HSO₄]. As ligninas obtidas de bagaço e de palha de cana-de-açúcar em suas formas termotradas atingiram um teor máximo em 8 h de pré-tratamento (92% e 87%), respectivamente, com diferenças estatisticamente significativas evidenciadas por meio do teste de *Tukey*. Entretanto, a palha de cana-de-açúcar mostrou um aumento significativo em 2 h de reação, atingindo 85% de pureza (Tabela 6).

Figura 33. Lignina total em função do tempo de pré-tratamento de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas termotratadas com [TEA][HSO₄] por diferentes tempos. A barra do desvio padrão pode não ser visualizada quando for menor que o tamanho do marcador.



A pureza máxima das amostras de lignina obtidas coincidiu para o bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas natura e termotratadas. Esses resultados mostram o potencial do pré-tratamento com [TEA][HSO₄], o qual foi seletivo para solubilização da lignina culminando em eficiência no fracionamento dos subprodutos em estudo (Figuras 32 e 33).

5.8.2. Espectroscopia de infravermelho com transformada de fourier com refletância total atenuada (FTIR-ATR)

A análise de infravermelho é amplamente empregada para caracterização de macromoléculas, devido à sua capacidade de fornecer informações diretas e acessíveis sobre as alterações químicas que ocorrem durante diversos procedimentos prévios. As Figuras 34, 35, 36 e 37 representam os espectros das ligninas obtidas após os pré-tratamentos de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas natura e termotratadas com [TEA][HSO₄], além de uma lignina *Kraft*. A partir da análise de cada espectro observou-se as bandas de absorção entre 1600 e 837 cm⁻¹ (com as letras representando cada banda de absorção, Tabela 7) que são atribuídas ao estiramento C=C dos anéis aromáticos da macromolécula de lignina (OLIVEIRA et al., 2022; ROLDÁN, 2014; SUN et al., 2013).

Figura 34. Atribuições de bandas de absorção na região do infravermelho médio (FTIR-ATR) de ligninas obtidas de bagaço de cana-de-açúcar em sua forma natura pré-tratada com [TEA][HSO₄] em diferentes tempos.

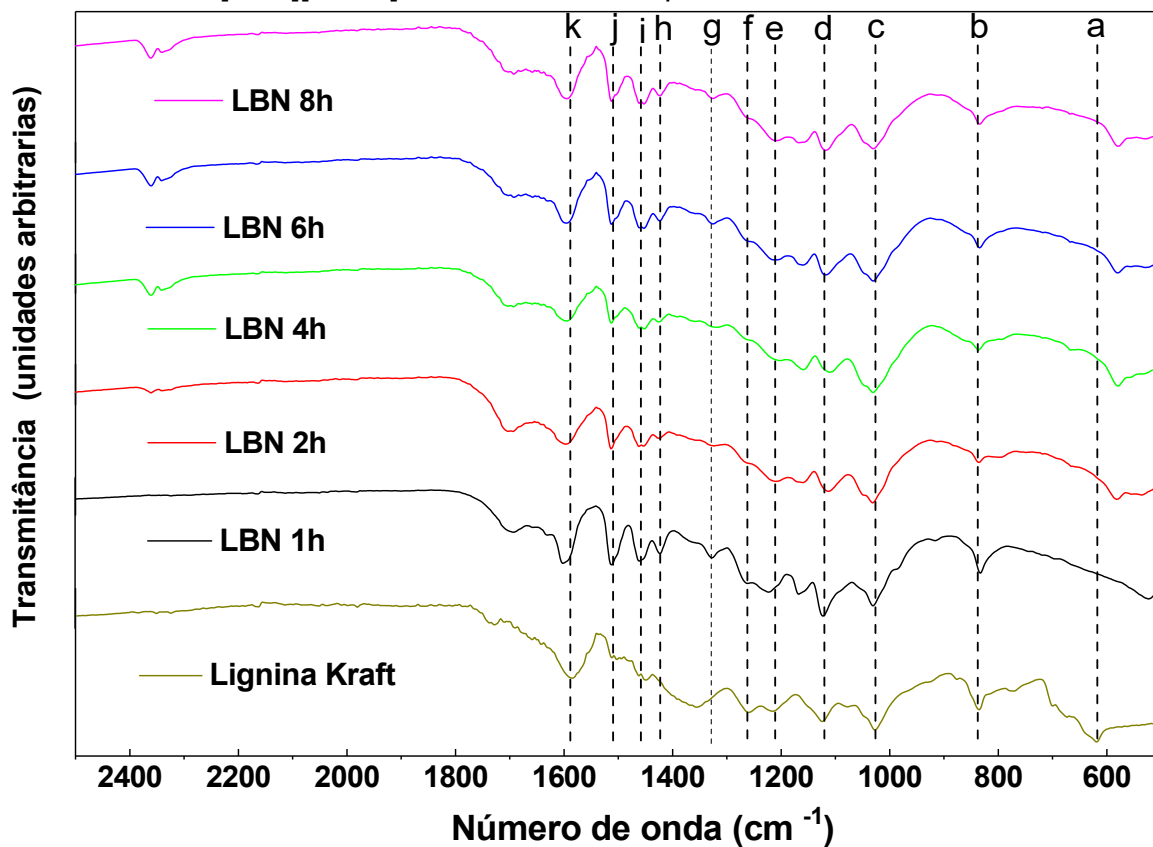


Figura 35. Atribuições de bandas de absorção na região do infravermelho médio (FTIR-ATR) de ligninas obtidas de palha de cana-de-açúcar em sua forma natura pré-tratada com [TEA][HSO₄].

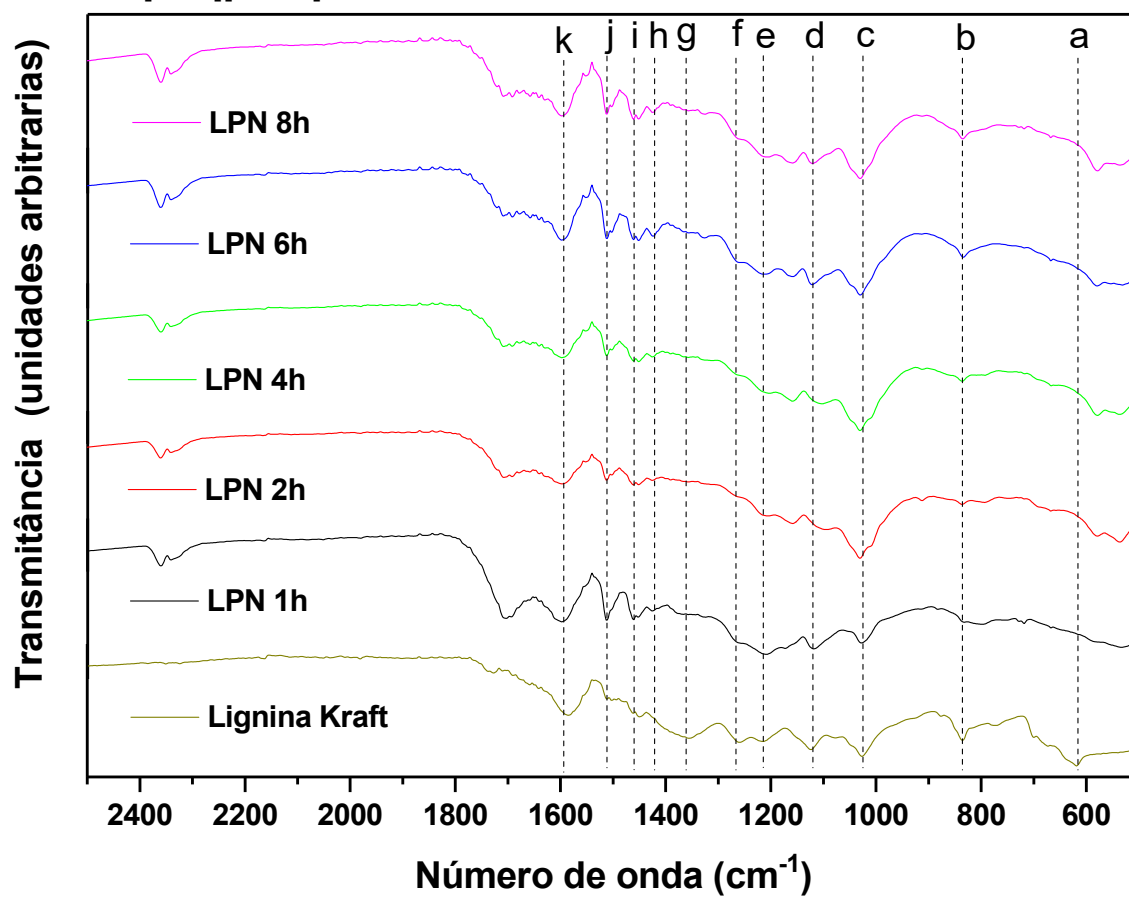


Figura 36. Atribuições de bandas de absorção na região do infravermelho médio (FTIR-ATR) para ligninas obtidas de bagaço de cana-de-açúcar em sua forma termotratada e posteriormente pré-tratada com [TEA][HSO₄].

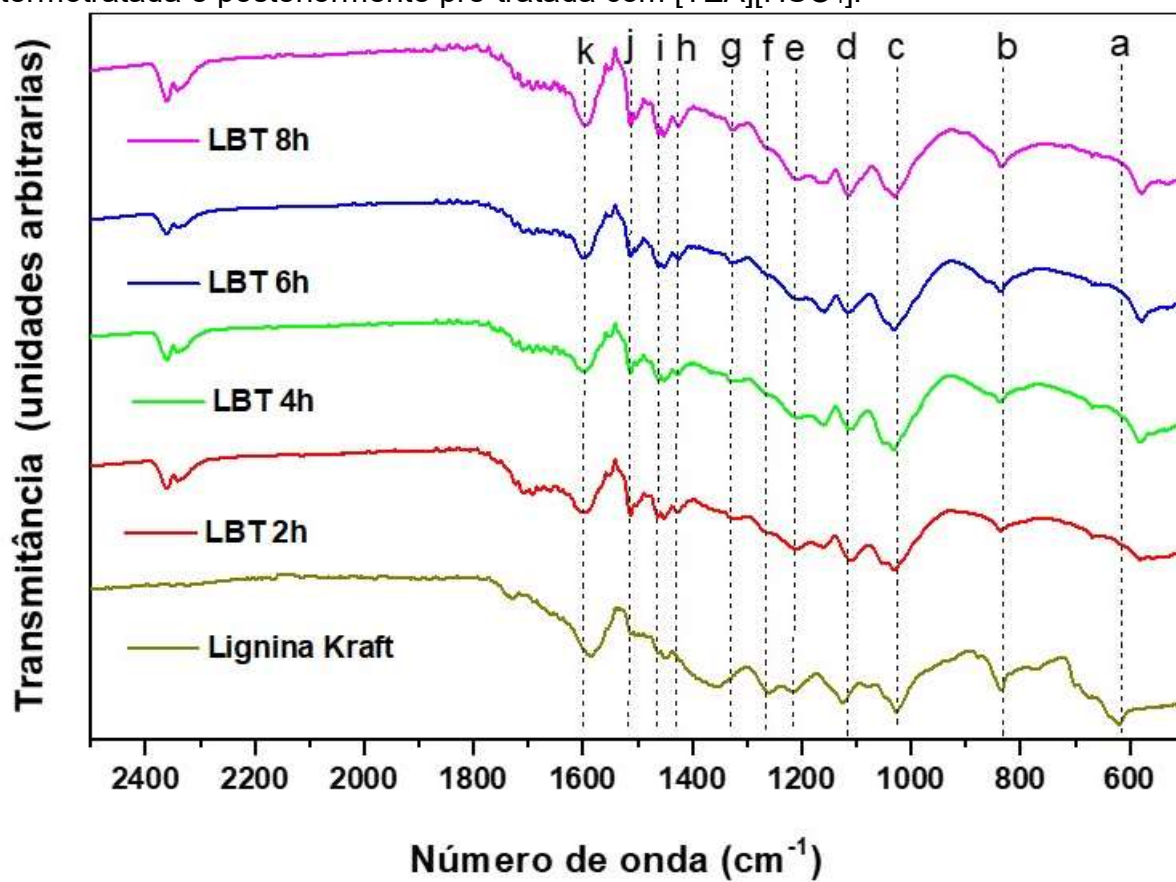


Figura 37. Atribuições de bandas de absorção na região do infravermelho médio (FTIR-ATR) de lignina obtida de palha de cana-de-açúcar em sua forma termotratada e posteriormente pré-tratada com [TEA][HSO₄].

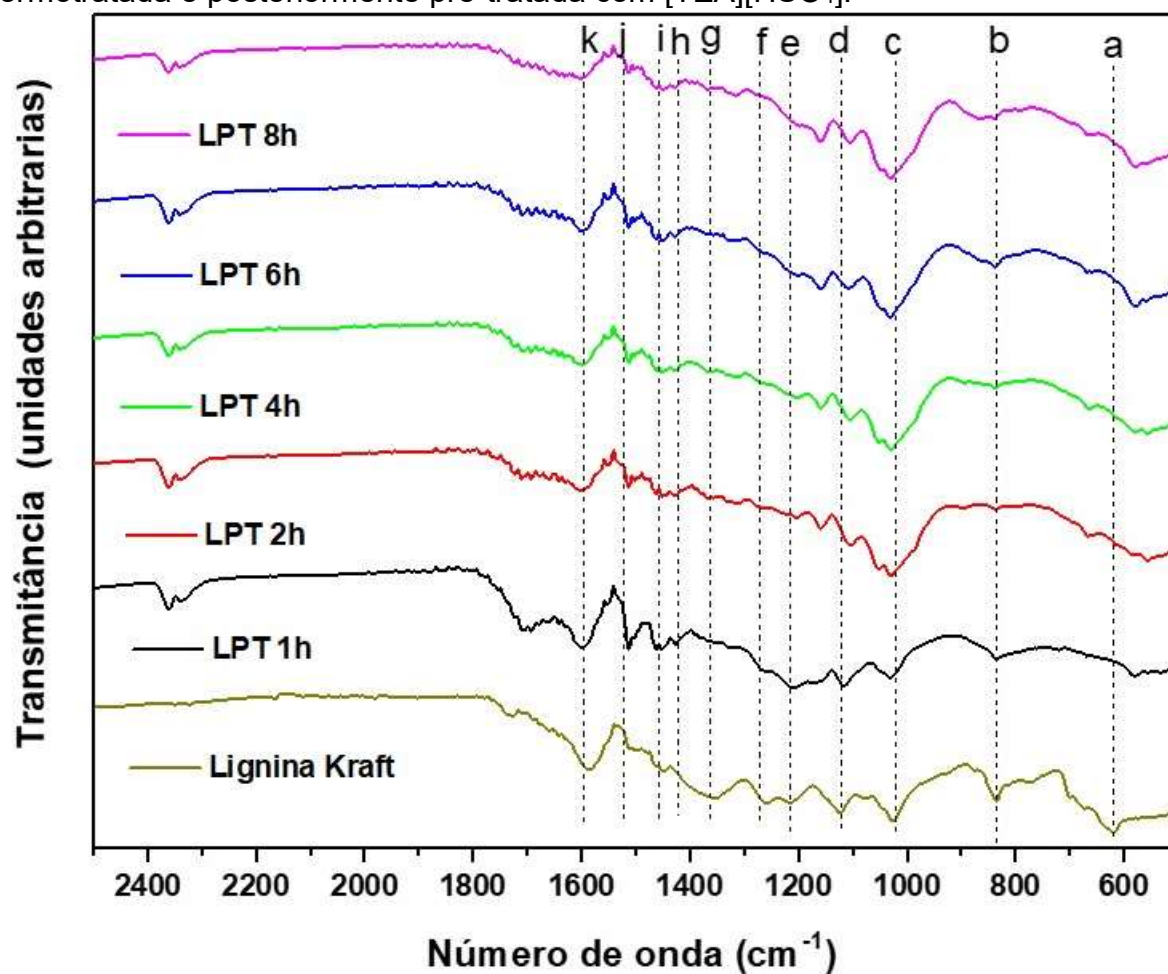


Tabela 7. Atribuições de bandas de absorção na região do infravermelho médio (FTIR-ATR) para materiais lignocelulósicos.

Número de onda (cm ⁻¹)	Identificação de bandas de absorção	Letras que identificam as bandas no FTIR-ATR
677-837	Deformação fora do plano de átomos de hidrogênio ligados a carbono aromático (apenas nos tipos de lignina GS e H). Unidades H, anel de lignina	a-b
1025	C-N Vibrações de estiramento em aminas alifáticas	c
1124	Modificação de anel aromáticos de lignina	d
1210	C-N Vibrações de estiramento em aminas alifáticas	e
1261	É atribuído a derivados da unidade propano C=O guaiacila (G)	f
1328	C-O alongamento, para a unidade siringila (S)	g
1422-1457-1509-1587	Estrutura aromática combinada com C-H no plano de deformação e elongação. C=C Vibração do anel aromático de lignina	h-i-j-k
1509-1587	C=C Vibração do anel aromático de lignina	j-k

Foi constatado que as ligninas obtidas no presente estudo apresentaram bandas características de lignina (bandas *j*, *i* *h* e *k*; Tabela 7). Entretanto, essas bandas, com exceção da banda *k*, não apareceram de forma definida no espectro da lignina *Kraft*, o que pode estar associado à alta pureza das ligninas obtidas a partir de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas naturais e termotratadas, conforme apresentado na Tabela 5 e 6, respectivamente. Outro importante aspecto observado nos espectros das Figuras 34, 35, 36 e 37 são as bandas localizadas entre 677-837 cm⁻¹ (*a* e *b*, Tabela 7) as quais foram mais evidentes na lignina *Kraft* quando comparado com as ligninas obtidas no presente estudo, pois essas bandas são características de lignina do tipo GS (ligninas de madeira de folhosas), enquanto que as ligninas obtidas dos subprodutos de cana-de-açúcar (lignina de gramíneas) correspondem a lignina do tipo GSH (EK et al, 2009; RALPH et al., 2004).

Outras bandas características relacionados à lignina são as 1261 e 1328 cm⁻¹ (correspondendo as letras *f* e *g*, respectivamente, Tabela 7). A banda *f* foi mais

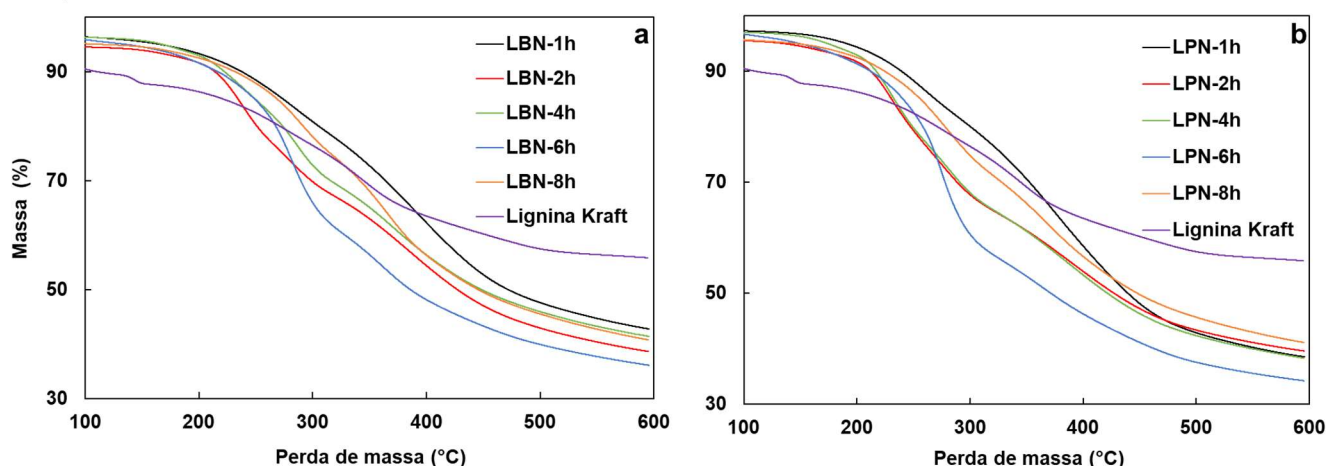
pronunciada na lignina *kraft*, enquanto a banda *g* ficou mais evidente nas ligninas obtidas de bagaço e palha de cana-de-açúcar (Figuras 34, 35, 36 e 37).

No geral podemos observar que as bandas das ligninas obtidas de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas natura e termotrada em diferentes tempos de pré-tratamento apresentam picos característicos de lignina com intensidade semelhantes corroborando com suas purezas. No entanto, a lignina *Kraft* apresentou algumas bandas características de lignina, todavia com intensidades menores (com exceção da banda *f*), quando comparado às ligninas obtidas do presente estudo.

5.8.3. Análise termogravimétrica (TG)

A análise termogravimétrica (TG) é utilizada para avaliar como a macromolécula de lignina se decompõem em atmosfera de nitrogênio ou oxigênio (JABLONSKY et al., 2015; PIN et al., 2020; TEJADO et al., 2007). As curvas de TG mostram o perfil de perda de massa dos componentes da amostra em função da temperatura (de degradação térmica), portanto, a TG em atmosfera de nitrogênio foi utilizada para caracterizar as propriedades termoquímicas das ligninas obtidas no presente estudo. Os resultados das ligninas oriundas de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas natura seguido de pré-tratamento com [TEA][HSO₄], além de uma lignina Kraft são apresentados na Figura 38.

Figura 38. Curva termogravimétrica (TG) de decomposição de ligninas obtidas de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas natura seguido de pré-tratamento com [TEA][HSO₄]. (a) Bagaço de cana-de-açúcar. (b) Palha de cana-de-açúcar.



A Figura 38ab apresenta o perfil de perda de massa das ligninas obtidas de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas natura seguido de pré-

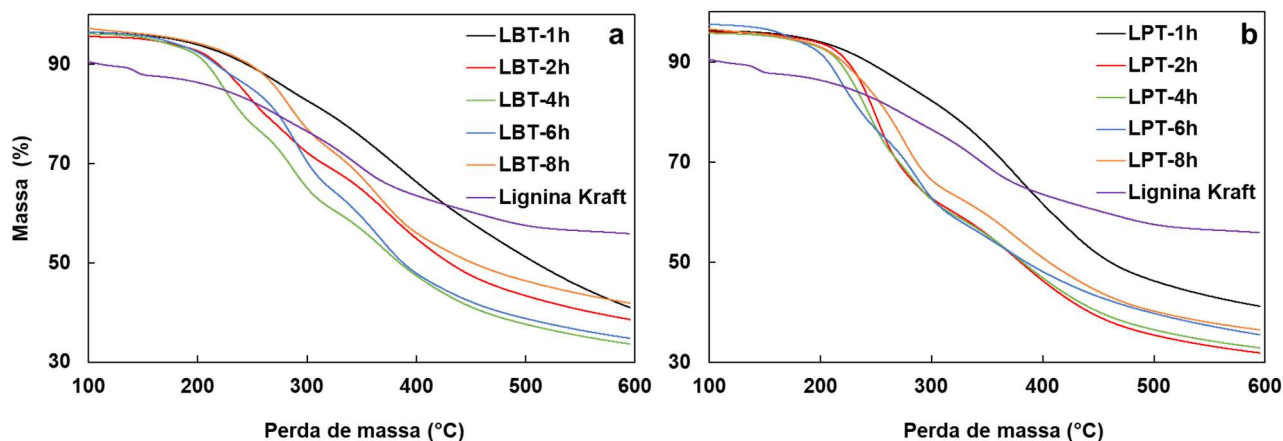
tratamento com [TEA][HSO₄] em função da temperatura, que variou de 100°C a 600°C, correspondendo à temperatura de máxima taxa de decomposição relatada na literatura (PIN et al., 2021; HANSEN et al., 2016; MOGHADDAM et al., 2014).

O primeiro processo de decomposição térmica foi observado em torno de 100°C e está associado à perda de água e pequenas traços de moléculas de xilana e celulose (Tabela 5). A decomposição térmica da lignina se inicia a partir de 200°C com a formação de hidrocarbonetos aromáticos, compostos fenólicos, hidroxifenólicos e estruturas características de lignina, como compostos do tipo guaiacila (G) e siringila (S). A maioria destes produtos derivados da lignina possuem grupos fenólicos (-OH) em sua constituição. No geral, todas ligninas obtidas de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas natura e pré-tratada com [TEA][HSO₄] apresentam um perfil de decomposição semelhante.

As ligninas obtidas de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas natura em 6 h de pré-tratamento apresentaram maior taxa de decomposição entre 300-600°C, ou seja, estas ligninas foram menos estáveis a estas temperaturas quando comparado as ligninas obtidas em 1, 2, 4 e 8 h, confirmando que o tempo de pré-tratamento com [TEA][HSO₄], resulta em alteração da estrutura das ligninas obtidas. Todavia, as faixas de degradação foram semelhantes para todas as ligninas. Também é possível verificar uma menor perda de massa para ligninas obtidas nos tempos de 1 e 8 h, confirmando maior estabilidade destas quando comparado às ligninas obtidas em 2, 6 e 4 h. (Figura 38ab). A estabilidade térmica das ligninas está relacionada a sua estrutura, como diferentes grupos funcionais, grau de condensação da lignina, dentre outras (MOGHADDAM et al., 2014).

A Figura 39ab apresenta o perfil de perda de massa das amostras de ligninas de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas termotratadas seguido de pré-tratamento com [TEA][HSO₄] além de uma lignina Kraft em função da temperatura.

Figura 39. Curva termogravimétrica (TG) de decomposição de ligninas obtidas de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas termotratadas seguido de pré-tratamento com [TEA][HSO₄]. (a) Bagaço de cana-de-açúcar. (b) Palha de cana-de-açúcar.



O primeiro processo de decomposição térmica das ligninas também foi verificado em torno de 100°C, e está associado à perda de água e pequenas moléculas orgânicas. A decomposição das ligninas também se iniciou por volta de 200°C semelhante ao reportado anteriormente para as ligninas de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas naturais (Figura 38ab) com a formação de hidrocarbonetos aromáticos, compostos fenólicos, hidroxifenólicos e compostos do tipo guaiacila (G) e siringila (S). A maioria dos produtos possui grupos fenólicos -OH em sua constituição (BREBU; VASILE, 2014).

As ligninas oriundas de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas termotratadas seguido de pré-tratamento com [TEA][HSO₄] nos tempos de 2, 4, 6 e 8 h, apresentaram maior taxa de decomposição entre 300-600°C quando comparado com a lignina obtida em 1 h (Figura 39ab), confirmando que a exposição do tempo ao pré-tratamento com [TEA][HSO₄] pode resultar em alteração da estrutura da lignina mostrando que está variável do pré-tratamento pode influenciar na estrutura das ligninas obtidas (BREBU; VASILE, 2014).

O perfil de decomposição térmica observado para as ligninas oriundas de palha de cana-de-açúcar em sua forma termotratada foram semelhantes às ligninas obtidas de bagaço de cana-de-açúcar, com exceção das ligninas obtidas nos tempos de 2 e 4 h, as quais resultaram em menor taxa de decomposição entre 300-600°C, portanto sendo mais estáveis termicamente.

5.8.4. Análise elementar e fórmula C₉

Os resultados da análise elementar (C, H, N, O, S) e da fórmula empírica (C₉) das ligninas do bagaço e da palha de cana-de-açúcar em suas formas natura seguidas de pré-tratamento com com [TEA][HSO₄] calculadas a partir dos resultados de análise elementar são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Análise elementar (C/H/O/N/S), fórmula empírica C_9 e massa molar da fórmula C_9 das ligninas obtidas de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas natura seguido de pré-tratamento com [TEA][HSO₄] por diferentes tempos. Resultados reportados em porcentagem (grama//100 gramas de material bruto, dados em base seca).

Amostras ligninas	C (%)	H (%)	O (%)	N (%)	S (%)	Fórmula empírica (C_9)	Massa molar C_9 (g.mol ⁻¹)
Lignina Kraft*	48,97	5,23	43,19	-	2,61	$C_9 H_{11,4} O_{6,0} S_{0,02}$	216,00
Lignina Bagaço 1 h	61,83	5,87	29,87	0,72	1,72	$C_9 H_{10,2} O_{3,3} N_{0,1} S_{0,1}$	174,68
Lignina Bagaço 2 h	55,57	5,63	35,81	1,15	1,84	$C_9 H_{10,9} O_{4,4} N_{0,2} S_{0,1}$	194,34
Lignina Bagaço 4 h	55,43	6,02	34,40	1,58	2,58	$C_9 H_{11,7} O_{4,2} N_{0,2} S_{0,2}$	194,87
Lignina Bagaço 6 h	51,58	7,04	31,86	2,95	6,57	$C_9 H_{14,7} O_{4,2} N_{0,4} S_{0,4}$	209,40
Lignina Bagaço 8 h	60,02	5,76	31,16	1,30	1,75	$C_9 H_{10,4} O_{3,5} N_{0,2} S_{0,1}$	179,93
Lignina Palha 1 h	64,15	6,19	29,17	0,50	0,00	$C_9 H_{10,4} O_{3,1} N_{0,1} S_{0,0}$	168,36
Lignina Palha 2 h	50,19	5,58	39,48	1,71	3,03	$C_9 H_{12,0} O_{5,3} N_{0,3} S_{0,2}$	215,20
Lignina Palha 4 h	52,11	5,59	38,01	1,81	2,49	$C_9 H_{11,6} O_{5,0} N_{0,3} S_{0,2}$	207,28
Lignina Palha 6 h	52,09	6,62	33,54	3,04	4,71	$C_9 H_{13,7} O_{4,4} N_{0,5} S_{0,3}$	207,35
Lignina Palha 8 h	58,80	6,05	31,08	1,86	2,21	$C_9 H_{11,1} O_{3,6} N_{0,2} S_{0,1}$	183,67

*Lignina Kraft comercial (Sigma-Aldrich). Não foi detectado Nitrogênio.

A fórmula C_9 é calculada através dos dados de análise elementar. Foi verificado um aumento nos níveis de nitrogênio nas ligninas obtidas de bagaço e palha de cana-de-açúcar no tempo 6 h (com 2,95% e 3,04%, respectivamente), especialmente quando comparadas com a lignina *Kraft* a qual não apresentou nitrogênio em sua estrutura. Esse aumento no teor de nitrogênio das ligninas em estudo está relacionado ao pré-tratamento do bagaço e palha de cana-de-açúcar com a [TEA][HSO₄], pois dos cátions deste líquido iônico utilizado no estudo contém a trietilamina utilizada em sua síntese (item 3.3, Figura 7). O fenômeno de aumento do teor de nitrogênio também foi reportado na literatura por outros autores (WANG et al., 2018).

Além disso, foi verificado a presença de enxofre em todas as ligninas obtidas, pois o [TEA][HSO₄] também contém enxofre em sua estrutura oriundo do ácido sulfúrico utilizado em sua síntese. Portanto, pode-se inferir que os níveis de enxofre observados nas amostras de ligninas obtidas derivam da presença de compostos sulfurados utilizados no processo de pré-tratamento em estudo. Foi verificado um aumento nos níveis de enxofre nas ligninas obtidas de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas natura no tempo 6 h (6,57% e 4,71% (m/m), respectivamente). Os resultados provenientes da análise elementar para lignina *Kraft* (obtida a partir do licor negro oriundo da polpação) e das ligninas de bagaço e palha de cana-de-açúcar (Tabela 8) indicam que o carbono é seu componente principal. Essa constatação é de extrema relevância, dado que o teor de carbono está diretamente associado ao poder calorífico. Os teores de carbono das ligninas de bagaço e palha de cana-de-açúcar apresentam proximidade com os valores reportados na literatura (BATISTA, 2020b).

A presença de nitrogênio nas ligninas está relacionada à presença de contaminantes, sendo ideal que o teor fique abaixo de 0,02%, conforme reportado na literatura (EK et al., 2009; FENGEL; WEGENER, 1983). Ressalta-se que ligninas com uma maior relação carbono/hidrogênio são consideradas mais propícias para cogeração de energia. Além disso, é crucial manter baixos teores de contaminantes, especialmente de enxofre, considerando que durante a degradação térmica pode ocorrer a liberação de SO₂ (BATISTA, 2020a). A lignina *Kraft* também apresentou enxofre em sua estrutura (2,61%), pois no processo de polpação é utilizado sulfeto de sódio (EK et al., 2009; FENGEL; WEGENER, 1983). Portanto, os teores de

nitrogênio e enxofre presentes nas ligninas obtidas neste trabalho estão associadas ao pré-tratamento com [TEA][HSO₄]. Salienta-se que ligninas de qualidade devem estar livre ou conter traços de nitrogênio e enxofre.

Os resultados da análise elementar (C, H, N, O, S) e da fórmula empírica (C₉) das ligninas do bagaço e da palha de cana-de-açúcar em suas formas termotratadas seguidas de pré-tratamento com [TEA][HSO₄] são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Análise elementar (C/H/O/N/S), fórmula empírica C₉ e massa molar da fórmula C₉ das ligninas obtidas de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas termotradas seguido de pré-tratamento com [TEA][HSO₄] por diferentes tempos. Resultados reportados em porcentagem (grama//100 gramas de material bruto, dados em base seca).

Amostra ligninas	C (%)	H (%)	O (%)	N (%)	S (%)	Fórmula Empírica C ₉	Massa molar C ₉ (g.mol ⁻¹)
Lignina Kraft*	48,97	5,23	43,19	-	2,61	C₉ H_{11,4} O_{6,0} S_{0,0}	216,00
Lignina Bagaço 1 h	63,59	5,89	28,47	1,28	0,78	C₉ H_{10,0} O_{3,0} N_{0,2} S_{0,0}	169,84
Lignina Bagaço 2 h	58,10	5,69	33,72	1,02	1,47	C₉ H_{10,6} O_{3,9} N_{0,1} S_{0,1}	185,89
Lignina Bagaço 4 h	53,48	6,22	35,90	1,74	2,66	C₉ H_{12,6} O_{4,6} N_{0,3} S_{0,2}	201,92
Lignina Bagaço 6 h	53,65	6,51	35,21	2,11	2,53	C₉ H_{13,1} O_{4,5} N_{0,3} S_{0,2}	201,32
Lignina Bagaço 8 h	57,32	6,26	32,44	1,52	2,47	C₉ H_{11,8} O_{3,8} N_{0,2} S_{0,1}	188,43
Lignina Palha 1 h	64,87	6,03	28,16	0,55	0,39	C₉ H_{10,0} O_{2,9} N_{0,1} S_{0,0}	166,48
Lignina Palha 2 h	52,62	5,95	39,44	0,95	1,04	C₉ H_{12,2} O_{5,1} N_{0,1} S_{0,1}	205,22
Lignina Palha 4 h	52,34	6,22	37,98	1,34	2,12	C₉ H_{12,8} O_{4,9} N_{0,2} S_{0,1}	206,34
Lignina Palha 6 h	51,85	6,48	35,66	2,31	3,70	C₉ H_{13,5} O_{4,7} N_{0,3} S_{0,2}	208,29
Lignina Palha 8 h	49,47	6,86	35,79	2,66	5,22	C₉ H_{15,0} O_{4,9} N_{0,4} S_{0,4}	218,30

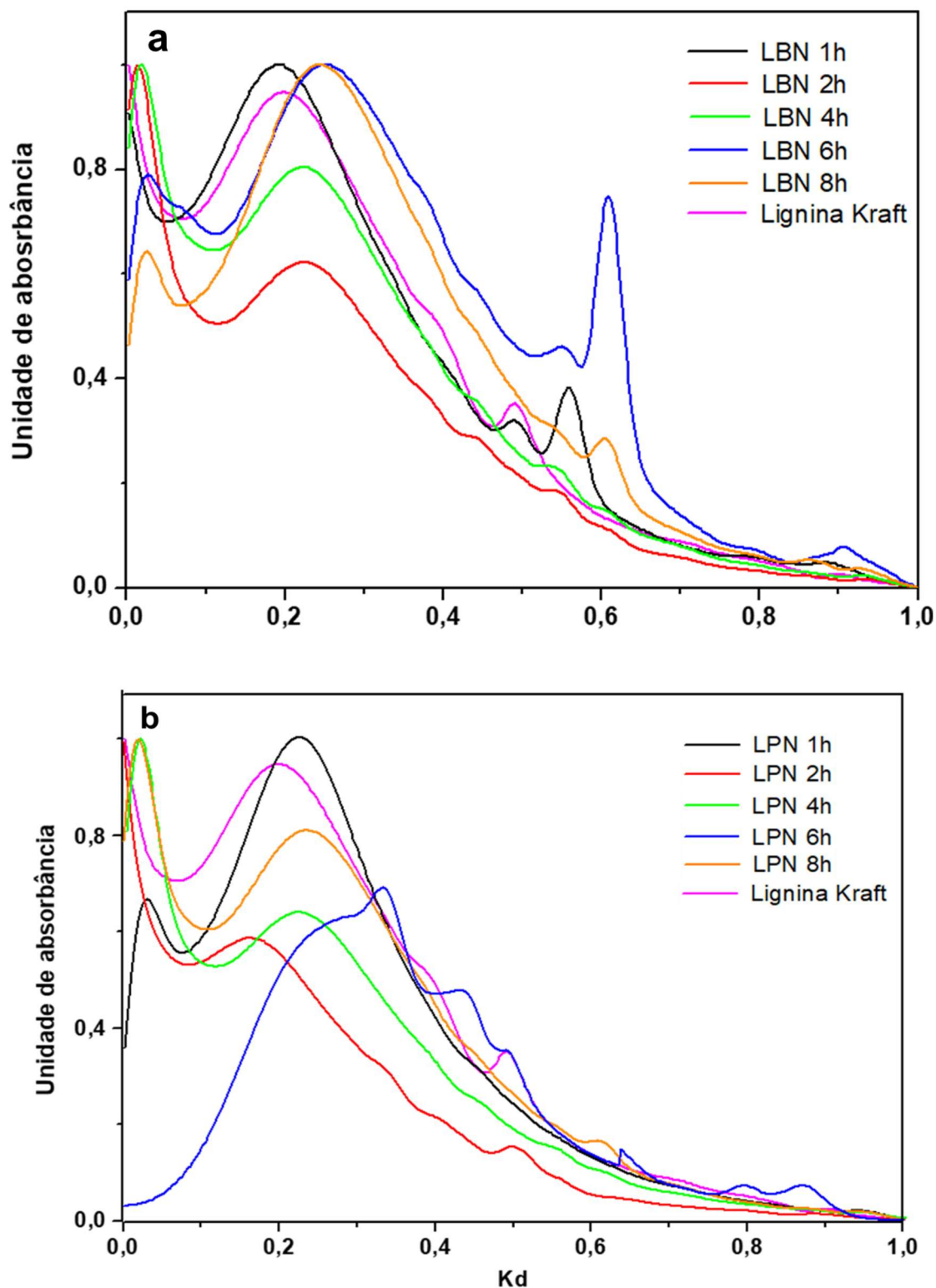
*Lignina Kraft comercial (Sigma-Aldrich). Não foi detectado nitrogênio.

A Tabela 9 apresenta os resultados da análise elementar (C, H, N, O, S) e a fórmula empírica C_9 das ligninas obtidas de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas termotratadas e subsequente pré-tratamento com [TEA][HSO₄]. Os resultados foram semelhantes às ligninas obtidas de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas natura (Tabela 8), ou seja, foi observado aumento dos teores de nitrogênio e enxofre, principalmente das ligninas obtidas em 6 e 8 h de pré-tratamento com [TEA][HSO₄].

5.8.5. Determinação da massa molar

A Figura 40ab apresenta o perfil de distribuição de massa molar (Kd) em função da absorbância em 280 nm das ligninas obtidas de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas natura seguido de pré-tratamento com [TEA][HSO₄]. As ligninas provenientes do bagaço de cana-de-açúcar mostraram dois picos principais, um mais intenso com Kd entre 0,2-0,3 (pico que foi utilizado para determinação da massa molecular média da lignina) e um segundo pico menos intenso com Kd de aproximadamente 0,6 (pico não utilizado para determinação da massa molecular média da lignina). Esse segundo pico pode estar associado uma lignina de baixa massa molar derivada do pré-tratamento com [TEA][HSO₄] (BRANDT-TALBOT, 2017; PIN, 2020). Já as ligninas provenientes da palha de cana-de-açúcar em sua forma natura, mostraram picos de Kd em torno de 0,2-0,4 e um segundo pico menos intenso com Kd de 0,6.

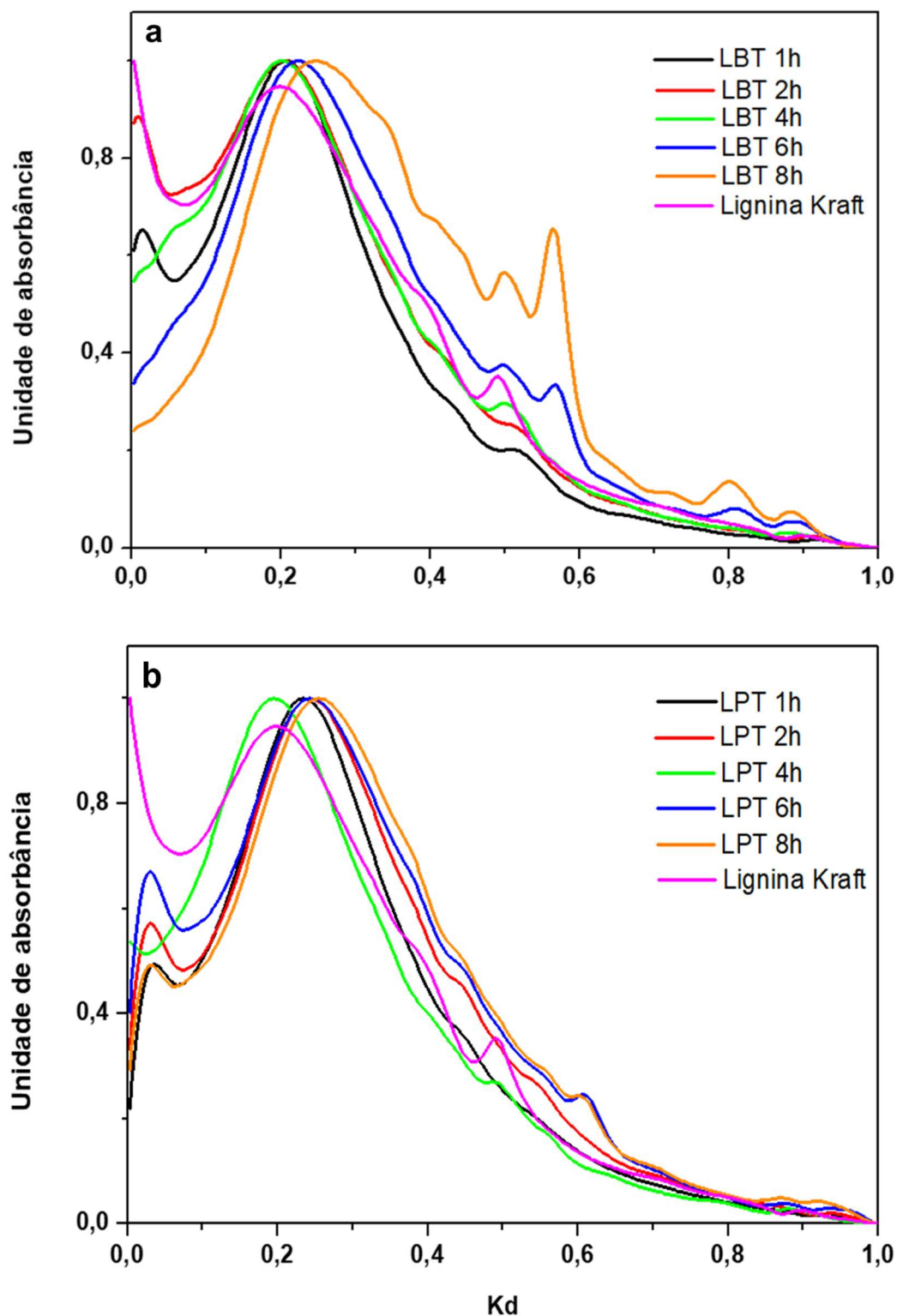
Figura 40. Perfil de distribuição de massa molar (Kd) em função da absorbância em 280 nm de ligninas obtidas de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas naturais seguidas de pré-tratamento com [TEA][HSO₄]. (a) Bagaço de cana-de-açúcar. (b) Palha de cana-de-açúcar.



A Figura 41ab apresenta o perfil de distribuição de massa molar (Kd) das ligninas obtidas de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas

termotratadas seguido de pré-tratamento com [TEA][HSO₄] em função da absorbância em 280 nm. As ligninas provenientes do bagaço e da palha de cana-de-açúcar apresentaram picos principais com Kd entre 0,2-0,3 (pico que foi utilizado para determinação da massa molecular média da lignina). Entretanto, as ligninas do bagaço de cana-de-açúcar, após 6 e 8 h de pré-tratamento com [TEA][HSO₄] apresentam um evidente ombro com Kd de 0,5 (pico não utilizado para determinação da massa molecular média da lignina). Os resultados foram semelhantes aos obtidos para o bagaço e palha de cana-de-açúcar.

Figura 41. Perfil de distribuição de massa molar (Kd) em função da absorbância em 280 nm de ligninas obtidas de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas termotratadas seguidas de pré-tratamento com [TEA][HSO₄]. (a) Bagaço de cana-de-açúcar. (b) Palha de cana-de-açúcar.



Os resultados da massa molecular média das ligninas isoladas de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas natura seguido de pré-tratamento com [TEA][HSO₄], além de uma lignina *Kraft* são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Massa molecular média (M_w e M_n) de ligninas obtidas de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas natura seguido de pré-tratamento com [TEA][HSO₄] por diferentes tempos.

Amostras ligninas	Mw	Mn	PDI
<i>Kraft</i>*	7740,06	4033,13	1,92
Bagaço 1h	7346,94	3507,63	2,09
Bagaço 2h	7544,12	3907,71	1,93
Bagaço 4h	7487,10	3786,80	1,98
Bagaço 6h	6636,96	3373,55	1,97
Bagaço 8h	7222,23	3640,83	1,93
Palha 1h	7875,13	3982,88	1,98
Palha 2h	8266,26	4456,97	1,85
Palha 4h	7674,63	3936,06	1,95
Palha 6h	6762,70	4640,44	1,46
Palha 8h	7406,50	3742,69	1,98

*Lignina *Kraft* comercial (Sigma-Aldrich).

Mn e Mw: Massas molares médias.

PDI (Mw/Mn): Índice de polidispersidade.

As massas molares médias numéricas (M_n) das ligninas obtidas permaneceram relativamente inalteradas durante os períodos de pré-tratamento do bagaço e da palha de cana-de-açúcar culminando em valores entre 3500-4000 Da (incluindo a lignina *Kraft*), as exceções foram as ligninas obtidas de palha de cana-de-açúcar em 2 e 4 h, as quais resultaram em valores de M_n de 4457 e 4640 Da, respectivamente. As massas molares médias (M_w) também permaneceram relativamente inalteradas durante os períodos de pré-tratamento culminado entre 7000-7500 Da (incluindo a lignina *Kraft*), as exceções foram as ligninas obtidas de bagaço de cana-de-açúcar em 6 h, a qual resultou em um M_w de 6634 Da, além das ligninas obtidas de palha de cana-de-açúcar em 2 e 6 h de pré-tratamento, as quais resultaram em M_w de 8266 e 6763 Da, respectivamente. O índice de polidispersidade (PDI) de todas as ligninas obtidas variaram entre 1,5-2,1. Resultados semelhantes de M_n e M_w foram relatados na literatura para ligninas obtidas de biomassa de *Miscanthus* pré-tratadas com [TEA][HSO₄] por (BRANDT-TALBOT, 2017; PIN, 2020).

Os resultados de massa molecular média das ligninas obtidas de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas termotratadas seguido de pré-tratamento com [TEA][HSO₄], além de uma lignina *Kraft* são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Massa molecular média (M_w e M_n) de ligninas obtidas de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas termotratada seguido de pré-tratado com [TEA][HSO₄] por diferentes tempos.

Amostras ligninas	Mw	Mn	PDI
<i>Kraft</i>*	7740,06	4033,13	1,92
Bagaço Termotratado 1h	8480,24	4612,70	1,84
Bagaço Termotratado 2h	7830,70	3928,10	1,99
Bagaço Termotratado 4h	7806,72	3941,10	1,98
Bagaço Termotratado 6h	7355,13	3652,02	2,01
Bagaço Termotratado 8h	6845,36	3524,90	1,94
Palha Termotratada 1h	7779,05	3978,53	1,96
Palha Termotratada 2h	7561,29	3985,35	1,90
Palha Termotratada 4h	8079,99	4223,78	1,91
Palha Termotratada 6h	7196,78	3621,98	1,99
Palha Termotratada 8h	7199,02	3698,52	1,95

A massa molecular média numérica (M_n) das ligninas apresentadas na Tabela 11 permaneceram relativamente inalteradas durante os períodos de pré-tratamento resultando em um valores entre 3500-4000 Da (incluindo a lignina *Kraft*), as exceções foram as ligninas obtida de bagaço de cana-de-açúcar por 1 h e da palha de cana-de-açúcar por 4 h de pré-tratamento, que resultaram em valores de M_n de 4613 e 4224 Da, respectivamente. O mesmo ocorreu com os valores de M_w que também permaneceram relativamente inalteradas durante os períodos de pré-tratamento, entre 7000-7800 Da (incluindo a lignina *Kraft*), as exceções foram as ligninas obtidas de bagaço de cana-de-açúcar em 1 e 6 h, as quais resultaram em valores de M_w de 8480 e 6845 Da, respectivamente, além da lignina obtida de palha de cana-de-açúcar em 4 h de pré-tratamento, a qual resultou em um valor de M_w de 8079,9 Da. O PDI de todas as ligninas variaram entre 1,8 e 2,0. Resultados semelhantes de M_n e M_w foram relatados na literatura para ligninas obtidas de biomassa de *Miscanthus* pré-tratadas com [TEA][HSO₄] por (BRANDT-TALBOT, 2017; PIN, 2020).

5.8.6. Determinação de OH fenólico, carbonilas e absorbtividade

A Tabela 12 apresenta os teores de grupos fenólicos e carbonilas, além da absorbtividade das ligninas obtidas de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas natura seguido de pré-tratamento com [TEA][HSO₄].

Tabela 12. Absortividade, OH fenólico e carbonilas de ligninas de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas natura seguido de pré-tratamento com [TEA][HSO₄] por diferentes tempos.

Amostras ligninas	Absortividade (L.g ⁻¹ .cm ⁻¹)	OH Fenólico (%)	Carbonilas	
			nº C ₉ para cada 1 β- carbonila insaturada	nº C ₉ para cada 1 α-carbonila insaturada
Kraft*	20,65	1,52	25,70	82,80
Bagaço 1 h	18,38	0,41	10,80	18,26
Bagaço 2 h	28,84	0,19	8,17	14,01
Bagaço 4 h	25,53	0,66	9,99	17,51
Bagaço 6 h	21,21	0,18	8,66	17,01
Bagaço 8 h	19,09	0,14	10,59	21,28
Palha 1 h	36,94	0,75	5,30	10,90
Palha 2 h	28,84	0,93	13,05	26,95
Palha 4 h	25,53	0,85	14,43	29,24
Palha 6 h	21,22	0,63	8,25	18,69
Palha 8 h	19,09	0,74	10,43	21,79

*Lignina Kraft comercial (Sigma-Aldrich).

Os grupos hidroxila fenólicos afetam a acidez da lignina, além de suas propriedades físico-químicas, portanto, a determinação dos teores de hidroxila fenólica nas ligninas é crucial para compreender suas características. Conforme apresentado na Tabela 12, as estruturas fenólicas da lignina foram alteradas ao longo do tempo de pré-tratamento com [TEA][HSO₄]. A porcentagem de hidroxilas fenólicas nas ligninas obtidas de bagaço e palha de cana-de-açúcar variram de 0,14-0,66% e 0,74-0,93%, respectivamente. Esses resultados revelaram que a estrutura da lignina foi modificada quando pré-tratada com [TEA][HSO₄], podendo ser atribuído a clivagem da ligação β-O-4 resultando na formação de hidroxilas fenólicas (BRANDT et al., 2015). Entretanto, as porcentagens de hidroxilas fenólicas nas ligninas obtidas apresentaram valores inferiores ao da lignina *Kraft*, a qual apresentou um valor de 1,52%, o que indica que as ligninas obtidas não foram alteradas extensivamente, diferentemente do que ocorreu com a lignina *Kraft* (EK et al., 2009; FENGEL; WEGENER, 1983).

A Tabela 12 também aborda a presença e a distribuição dos grupos carbonílicos (C=O) nas ligninas obtidas, destacando sua possível conjugação com anéis aromáticos. Esses grupos, em conjunto com os grupos de hidroxila fenólicas, influenciam na formação de sistemas conjugados que afetam a coloração das ligninas obtidas (OLIVEIRA, 2020). A presença de carbonilas conjugadas é discutida em relação à posição α e subestruturas cinamílicas, enquanto as carbonilas na posição β são geralmente isoladas (PILÓ et al., 1993).

Os teores de carbonilas são detalhadamente apresentados indicando variações significativas em comparação com a lignina *kraft*. A macromolécula da lignina é descrita como composta por grupos carbonílicos por unidade C_9 , revelando uma proporção específica de grupos carbonílicos em cada 100 unidades C_9 . Os teores de carbonilas (α e β) foram particularmente elevados nas ligninas obtidas de bagaço e de palha de cana-de-açúcar em comparação com a literatura (OLIVEIRA, 2020), portanto, há indícios de que as ligninas obtidas foram oxidadas em suas cadeias laterais (EK et al., 2009; FENGEL; WEGENER, 1983).

Os valores de absortividade das ligninas obtidas de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas natura seguido de pré-tratamento com [TEA][HSO₄] variaram de 19,1-36,9 e 19,1-36,9 L.g⁻¹.cm⁻¹, respectivamente, enquanto a lignina *Kraft* apresentou um valor de absortividade de 20,6 L.g⁻¹.cm⁻¹. A literatura reporta uma absortividade média de lignina em 280 nm de 20 L.g⁻¹.cm⁻¹. Desta forma, algumas ligninas obtidas culminaram em valores de absortividade um pouco acima do reportado na literatura, portanto, confirmando indícios de que as ligninas foram extensivamente oxidadas em suas cadeias laterais (EK et al., 2009; FENGEL; WEGENER, 1983).

A Tabela 13 apresenta os teores de grupos fenólicos e carbonilas, além da absortividade das ligninas obtidas de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas termotratada seguido de pré-tratamento com [TEA][HSO₄].

Tabela 13. Absortividade, OH fenólico e carbonilas de ligninas de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas termotratada seguido de pré-tratamento com [TEA][HSO₄] por diferentes tempos.

Amostra ligninas	Absortividade (L.g ⁻¹ .cm ⁻¹)	OH Fenólico (%)	Carbonilas	
			nº C9 para cada 1 β- carbonila insaturada	nº C9 para cada 1 α-carbonila insaturada
Kraft*	20,65	1,52	25,70	82,80
Bagaço 1 h	-	-	-	-
Bagaço 2 h	21,27	0,40	8,70	17,5
Bagaço 4 h	26,23	0,70	7,27	15,29
Bagaço 6 h	22,53	0,53	8,64	15,63
Bagaço 8 h	24,35	0,91	7,55	15,58
Palha 1 h	27,90	0,50	7,00	15,55
Palha 2 h	17,59	0,14	11,98	20,28
Palha 4 h	14,09	0,65	12,66	24,75
Palha 6 h	14,54	1,14	12,66	27,32
Palha 8 h	12,53	0,77	14,99	30,49

*Lignina Kraft comercial (Sigma-Aldrich).

A porcentagem de hidroxilas fenólicas nas ligninas obtidas de bagaço e palha de cana-de-açúcar variaram de 0,40-0,91% e 0,14-1,14%, respectivamente. Os resultados foram semelhantes aos obtidos nas ligninas de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas natura seguido de pré-tratamento com [TEA][HSO₄] (Tabela 12), as exceções foram as ligninas obtida de bagaço cana-de-açúcar por 8 h de pré-tratamento com [TEA][HSO₄] e da lignina de palha de cana-de-açúcar obtida por 6 h de pré-tratamento com [TEA][HSO₄], as quais apresentaram valores mais elevados de hidroxilas fenólicas (0,91 e 1,14%, respectivamente). Esses resultados revelaram que a estrutura da lignina foi modificada quando pré-tratada com [TEA][HSO₄] ao longo do tempo, podendo ser atribuído a clivagem da ligação β-O-4 resultando na formação de hidroxilas fenólicas (SHU HONG et al., 2017; BRANDT et al., 2015). Entretanto, as porcentagens de hidroxilas fenólicas nas ligninas obtidas apresentaram valores inferiores ao da lignina *Kraft*, a qual apresentou um valor de 1,52%, o que indica que as ligninas obtidas não foram alteradas extensivamente, diferentemente do que ocorreu com a lignina *Kraft* (EK et al., 2009; FENGEL; WEGENER, 1983).

Os teores de carbonilas (α e β) foram particularmente elevados nas ligninas obtidas de bagaço e de palha de cana-de-açúcar em suas formas termotratada seguido de pré-tratamento com [TEA][HSO₄] em comparação com a literatura

(OLIVEIRA et al., 2001), portanto, há indícios de que as ligninas obtidas foram extensivamente oxidadas em suas cadeias laterais (EK et al., 2009; FENGEL; WEGENER, 1983).

Os valores de absortividade das ligninas obtidas de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas termotratada seguido de pré-tratamento com [TEA][HSO₄] variaram de 21,3-24,3 e 12,5-27,9 L.g⁻¹.cm⁻¹, respectivamente, enquanto a lignina *Kraft* apresentou um valor de absortividade de 20,6 L.g⁻¹.cm⁻¹. A literatura reporta uma absortividade média de lignina em 280 nm de 20 L.g⁻¹.cm⁻¹. Desta forma, algumas ligninas obtidas de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas termotratada culminaram em valores distintos de absortividade relatados na literatura, portanto, confirmando indícios de que as ligninas foram extensivamente oxidadas em suas cadeias laterais (EK et al., 2009; FENGEL; WEGENER, 1983).

6. CONCLUSÃO

Diante do exposto na presente tese pode-se concluir:

- A síntese do [TEA][HSO₄] foi realizado com sucesso;
- O pré-tratamento dos subprodutos de cana-de-açúcar com [TEA][HSO₄] foram seletivos para solubilização/remoção das frações de lignina e hemicelulose;
- A polpa celulósica recuperada após o pré-tratamento dos subprodutos de cana-de-açúcar com [TEA][HSO₄] tornou-se enriquecida em celulose, com exceção da palha de cana-de-açúcar termotratada;
- O licor obtido após do pré-tratamento dos subprodutos de cana-de-açúcar com [TEA][HSO₄] foi recuperado e a lignina precipitada com sucesso;
- A polpa celulósica recuperada após os pré-tratamentos de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas natura com [TEA][HSO₄] foram hidrolisadas enzimaticamente com sucesso resultando em aumento substancial de conversão de celulose em glicose;
- A polpa celulósica recuperada após o pré-tratamento de bagaço e palha de cana-de-açúcar em suas formas termotratada com [TEA][HSO₄] não apresentaram eficiência na hidrólise enzimática resultando em níveis intermediários de conversão de celulose em glicose;
- Os rendimentos das ligninas obtidas dos subprodutos de cana-de-açúcar seguido de pré-tratamento com [TEA][HSO₄] foram relativamente elevados;
- A caracterização físico-química das ligninas obtidas dos subprodutos de cana-de-açúcar seguido de pré-tratamento com [TEA][HSO₄] mostraram que estas sofreram alterações químicas estruturais, todavia, mantendo-se um padrão caraterístico de lignina relatada na literatura;
- O pré-tratamento dos subprodutos de cana-de-açúcar com [TEA][HSO₄] aprsentou potencial de fracionamento recuperando-se a polpa rica em celulose e a lignina, portanto sendo tecnicamente viável;

7. REFERÊNCIAS

BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**, v. 52, n. 2, p. 858–875, 2011.

BARDONE, E. et al. Dilute-acid Hydrolysis of Cellulose to Glucose from Sugarcane Bagasse. **Chemical Engineering Transactions**, v. 38, p. 433-438, 2014. <https://doi.org/10.3303/CET1438073>.

BASSO, L. C. et al. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 7, p. 1155–1163, November 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00428>.

BERLIN, A. et al. Evaluation of novel fungal cellulase preparations for ability to hydrolyze softwood substrates - Evidence for the role of accessory enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, n. 2, p. 175–184, 2005.

BORTOLAZZO, N. G. **Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP, Piracicaba, 2011. <https://doi.org/10.11606/D.11.2011.tde-24052011-100406>.

BRANDT, A. et al. Ionic liquid pretreatment of lignocellulosic biomass with ionic liquid–water mixtures. **Green Chemistry**, v. 13, n. 9, p. 2489–2499, 30 ago. 2011.

BRANDT, A. et al. Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. **Green Chemistry**, 15, p. 550-583, 2013. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2013/gc/c2gc36364j>.

BRANDT, A. et al. Structural changes in lignins isolated using an acidic ionic liquid water mixture. **Green Chemistry**, v. 17, n. 11, p. 5019–5034, 2 set. 2015.

BRANDT-TALBOT, A. et al. An economically viable ionic liquid for the fractionation of lignocellulosic biomass. **Green Chemistry**, v. 19, n. 13, p. 3078–3102, 2017a.

BRANDT-TALBOT, A. et al. An economically viable ionic liquid for the fractionation of lignocellulosic biomass. **Green Chemistry**, v. 19, n. 13, p. 3078–3102, 2017b.

BRIENZO, M.; ARANTES, V.; MILAGRES, A. M. F. Enzymology of the thermophilic ascomycetous fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Fungal Biology Reviews**, v. 22, n. 3-4, p. 120-130, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2009.04.001>.

BRODEUR, G. et al. Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: A review. **Enzyme Research**, v. 2011, 787532, May, 2011. doi: 10.4061/2011/787532.

BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, W. D. DOS; SOUZA, A. P. DE. As rotas para o etanol celulósico no brasil. Em: **ETANOL Pesquisa & Desenvolvimento**.

Departamento de Botânica, IBUSP, Cidade Universitária, Butantã, 2013. 24 p.
<https://www.doccity.com/pt/as-rotas-para-o-etanol-celulosico-no-brasil/4816860/>.

CANILHA, L. et al. 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**, v. 2012, Article ID 989572, 2012. doi: <https://doi.org/10.1155/2012/989572>.

CHEN, Y. et al. High-purity lignin isolated from poplar wood meal through dissolving treatment with deep eutectic solvents. **Royal Society Open Science**, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2019. <https://doi.org/10.1098/rsos.181757>.

DEL RÍO, J. C. et al. Differences in the chemical structure of the lignins from sugarcane bagasse and straw. **Biomass and Bioenergy**, v.81, n. 5760, 322, 2015. DOI:10.1016/j.biombioe.2015.07.006 2015.

DHEPE, P. L.; FUKUOKA, A. Cellulose conversion under heterogeneous catalysis. **ChemSusChem**, v.1, n. 12, p. 969-975, 2008. doi: 10.1002/cssc.200800129.

DIAS, L. M. et al. Experimental design, modeling, and optimization of production of xylooligosaccharides by hydrothermal pretreatment of sugarcane bagasse and straw. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 13, n. 14, p. 12777–12794, 1 set. 2023.

ELGHARBAWY, A. A. et al. Ionic liquid pretreatment as emerging approaches for enhanced enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Biochemical Engineering Journal**, v. 109, p. 252-267, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.01.021>.

EMINOV, S.; WILTON-ELY, J. D. E. T.; HALLETT, J. P. Highly selective and near-quantitative conversion of fructose to 5-hydroxymethylfurfural using mildly acidic ionic liquids. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 2, n. 4, p. 978-981, 2014. <https://doi.org/10.1021/sc400553q>.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin and New York: De Gruyter, 1984. 613 p.

FERREIRA-LEITAO, V. et al. Biomass residues in Brazil: Availability and potential uses. **Waste and Biomass Valorization**, v.1, p. 65-76, 2010. DOI 10.1007/s12649-010-9008-8.

FONSECA, M. A. **Avaliação da produção de xilo-oligossacarídeos a partir de casca de soja**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). UFSCAR, São Carlos, 2015. <https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/7439>.

GELLERSTEDT, G.; EK, M.; HENRIKSSON, G. **Wood chemistry and Wood biotechnology**. Berlin, New York: De Gruyter, 2009. <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/9783110213409/html>.

GEORGE, A. et al. Design of low-cost ionic liquids for lignocellulosic biomass pretreatment. **Green Chemistry**, v. 17, n. 3, p. 1728–1734, 1 mar. 2015.

GILKES, N. R. et al. Domains in microbial beta-1, 4-glycanases: sequence conservation, function, and enzyme families. **Microbiological Reviews**, v. 55, n. 2, p. 303–315, 1991.

GRISI, E. F.; YUSTA, J. M.; DUFO-LÓPEZ, R. Opportunity costs for bioelectricity sales in Brazilian sucro-energetic industries. **Applied Energy**, v. 93, p. 860-867, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2011.08.045>.

GSCHWEND, F. J. V. et al. Quantitative glucose release from softwood after pretreatment with low-cost ionic liquids. **Green Chemistry**, v. 21, n. 3, p. 692–703, 2019.

HATFIELD, R. D.; RALPH, J.; GRABBER, J. H. Cell wall cross-linking by ferulates and diferulates in grasses. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, n. 3, p. 403-407, 1999. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(19990301\)79:3<403::AID-JSFA263>3.0.CO;2-0open_in_newISSN0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(19990301)79:3<403::AID-JSFA263>3.0.CO;2-0open_in_newISSN0).

HERNÁNDEZ-SALAS, J. M. et al. Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 3, p. 1238-1245, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.09.062>.

JEFFRIES, T. W.; JIN, Y. S. Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, n. 5, p. 495-509, 2004. doi: 10.1007/s00253-003-1450-0.

JØRGENSEN, H.; OLSSON, L. Production of cellulases by *Penicillium brasilianum* IBT 20888 - Effect of substrate on hydrolytic performance. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 3–4, p. 381–390, 2006.

KLEIN, M. et al. Bioethanol production from *Ficus religiosa* leaves using microwave irradiation. **Journal of Environmental Management**, v. 177, p. 20-25, 2016. doi: 10.1016/j.jenvman.2016.03.050.

KOBAYASHI, K. et al. Enzymatic hydrolysis of cellulose hydrates. **Cellulose**, v. 19, p. 967-974, 2012. <https://doi.org/10.1007/s10570-012-9696-2>.

LEE, S. H. et al. Ionic liquid-mediated selective extraction of lignin from wood leading to enhanced enzymatic cellulose hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 5, p. 1368–1376, 1 abr. 2009.

LEWIS LIU, Z.; MA, M.; SONG, M. Evolutionarily engineered ethanologenic yeast detoxifies lignocellulosic biomass conversion inhibitors by reprogrammed pathways. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 282, n. 3, p. 233-244, 2009. doi: 10.1007/s00438-009-0461-7.

MARTINS, E. S. et al. Purification and characterization of polygalacturonase produced by thermophilic *Thermoascus aurantiacus* CBMAI-756 in submerged

fermentation. Antonie van Leeuwenhoek, **International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 91, n. 3, p. 291-299. 2007. doi: 10.1007/s10482-006-9114-6.

MARTINS, F. et al. A produção do etanol de segunda geração a partir do bagaço da cana-de-açúcar. **ReLAlneP**, v. 2, n. 3, p. 5-16, jul./dez, 2014. <https://revistas.ufpr.br/relainep/article/download/38404/23514>.

MARTINS, L. F. et al. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 5, p. 1417–1424, 2008.

MASARIN, F. et al. Chemical composition and enzymatic digestibility of sugarcane clones selected for varied lignin content. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, p. 1–10, 2011.

MEINITA, M. D. N. et al. Bioethanol production from the acid hydrolysate of the carrageenophyte *Kappaphycus alvarezii* (cottonii). **Journal of Applied Phycology**, v. 24, n. 4, p. 857–862, 2012.

MENDES, F. M. et al. Enzymatic hydrolysis of chemithermomechanically pretreated sugarcane bagasse and samples with reduced initial lignin content. **Biotechnology Progress**, v. 27, n. 2, p. 395–401, 2011.

MICHUD, A. et al. Ioncell-F: ionic liquid-based cellulosic textile fibers as an alternative to viscose and Lyocell. **Textile Research Journal**, v. 86, n.5, p. 543–552, 2016. DOI:10.1177/0040517515591774.

MOHAN, D.; PITTMAN, C. U.; STEELE, P. H. Pyrolysis of wood/biomass for bio-oil: A critical review. **Energy and Fuels**, v. 20, n. 3, p. 848-889, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1021/ef0502397>.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000700023>.

PAZ-CEDENO, F. R. et al. Evaluation of the effects of different chemical pretreatments in sugarcane bagasse on the response of enzymatic hydrolysis in batch systems subject to high mass loads. **Renewable Energy**, v. 165, p. 1–13, 1 mar. 2021.

PELLEGRINI, L. F.; DE OLIVEIRA JUNIOR, S. Combined production of sugar, ethanol and electricity: Thermoeconomic and environmental analysis and optimization. **Energy**, v. 36, n. 6, p. 3704-3715, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2010.08.011>.

PENG, F. et al. Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 4, p. 879-903, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.01.018>.

PITARELO, A. P. **Avaliação da Susceptibilidade do Bagaço e da Palha de Cana-de-Açúcar à Bioconversão via Pré-Tratamento a Vapor e Hidrólise Enzimática**. Dissertação de mestrado-UFPR, Curitiba-PR, 2007.

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

RALPH, J. et al. Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl- propanoids. **Phytochemistry Reviews**, v. 3 p. 29-60, 2004.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, v. 26, n. 6, p. 863–871, dez. 2003.

RIBEIRO, H.; FICARELLI, T. R. DE A. Sugarcane Burning and Perspectives for Harvesters in Macatuba, Sao Paulo TT - Queimadas nos canaviais e perspectivas dos cortadores de cana-de-acucar em Macatuba, Sao Paulo. **Saude e Sociedade, São Paulo**, v. 19, n. 1, p. 48-63, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0104-12902010000100005>.

ROSA, M. F. et al. Cellulose nanowhiskers from coconut husk fibers: Effect of preparation conditions on their thermal and morphological behavior. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, n. 1, p. 83–92, 23 maio 2010.

SAHA, B. C.; BISWAS, A.; COTTA, M. A. Microwave pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**, v.2, n. 3, p. 210-217, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1166/jbmb.2008.412> 2008.

SAHA, K. et al. Optimization of lignin recovery from sugarcane bagasse using ionic liquid aided pretreatment. **Cellulose**, v. 24, n. 8, p. 3191–3207, 1 ago. 2017.

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

SANTOS, V. T. DE O. et al. Role of hemicellulose removal during dilute acid pretreatment on the cellulose accessibility and enzymatic hydrolysis of compositionally diverse sugarcane hybrids. **Industrial Crops and Products**, v. 111, p. 722-730, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.11.053>.

SATHITSUKSANO, N. et al. Lignin fate and characterization during ionic liquid biomass pretreatment for renewable chemicals and fuels production. **Green Chemistry**, v. 16, n. 3, p. 1236–1247, 2014.

SCARAMUCCI, J. A. et al. Energy from sugarcane bagasse under electricity rationing in Brazil: A computable general equilibrium model. **Energy Policy**, v. 34, n. 9, p. 986–992, 2006.

SINDHU, R. et al. Dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification of sugarcane tops for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 23, p. 10915-10921, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.066>.

SINGH, A. et al. Comparative study on ethanol production from pretreated sugarcane bagasse using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* on various matrices. **Renewable Energy**, v. 50, p. 488-493, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2012.07.003>.

SINGH, A.; BISHNOI, N. R. Optimization of enzymatic hydrolysis of pretreated rice straw and ethanol production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, p. 1785–1793, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-3870-1>.

SOCCOL, C. R. et al. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4820-4825, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.067>.

STAMBUK, B. U. et al. Brazilian potential for biomass ethanol: Challenge of using hexose and pentose cofermenting yeast strains. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 67, n. 11, p. 918-926, 2008. <https://www.researchgate.net/publication/279571837>.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. **Bioresource Technology**, v. 83, n. 1, p. 1-11, 2002. doi: 10.1016/s0960-8524(01)00212-7.

SZCZERBOWSKI, D. et al. Sugarcane biomass for biorefineries: Comparative composition of carbohydrate and non-carbohydrate components of bagasse and straw. **Carbohydrate Polymers**, v. 114, p. 95-101, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.07.052>.

TEMER, M.; MAGGI, B.; BEZERRA, R. Cana-de- açúcar. **Acomp. Safra Bras. Cana**, v. 4 - Safra 2017/18, n. 3 - Terceiro levantamento, Brasília, p. 1-77, dezembro 2017. ISSN: 2318-7921.

VALLEJO, A. L. et al. Halving global CO₂ by 2050: technologies and costs Supporting Annex. n. September, 2013.

WILSON, D. B. Cellulases and biofuels. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 295-299, 2009. doi: 10.1016/j.copbio.2009.05.007.

ZHA, Y.; PUNT, P. J. Exometabolomics approaches in studying the application of lignocellulosic biomass as fermentation feedstock. **Metabolites**, v. 3, n. 1, p. 119-143, 2013. doi: 10.3390/metabo3010119.

ZHOU, S.; RUNGE, T. M. Mechanism of improved cellulosic bio-ethanol production from alfalfa stems via ambient-temperature acid pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 193, p. 288-296, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.06.096>.