



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro de Tecnologia e Ciências
Instituto de Química

Lais Gracio Lopes

**Desconstrução da biomassa lignocelulósica com solvente eutético profundo
seguido de hidrólise com extrato enzimático de *Aspergillus niger* 11T53A14**

Rio de Janeiro

2023

Lais Gracio Lopes

Desconstrução da biomassa lignocelulósica com solvente eutético profundo seguido de hidrólise com extrato enzimático de *Aspergillus niger* 11T53A14

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Engenharia Química, ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Processos Químicos, Petróleo e Meio Ambiente.

Orientadores: Prof. Dr^a Gizele Cardoso Fontes Sant'Ana
Prof. Dr. Márcio Luis Lyra Paredes
Prof. Dr^a Verônica Ferreira Melo

Rio de Janeiro

2023

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC/Q

L864 Lopes, Lais Gracio.

Desconstrução da biomassa lignocelulósica com solvente eutético profundo seguido de hidrólise com extrato enzimático de *Aspergillus niger* 11T53A14. – 2023.
107 f.

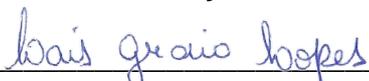
Orientador (a): Gizele Cardoso Fontes Sant'Ana
Márcio Luis Lyra Paredes
Verônica Ferreira Melo

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro.
Instituto de Química.

1. Energia da biomassa – Teses. 2. Solventes – Teses. I. Sant'Ana, Gizele Cardoso Fontes. II. Paredes, Márcio Luis Lyra. III. Melo, Verônica Ferreira. IV. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Química. V. Título.

CDU 620.95

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.



Assinatura

12/04/2023

Data

Lais Gracio Lopes

Desconstrução da biomassa lignocelulósica com solvente eutético profundo seguido de hidrólise com extrato enzimático de *Aspergillus niger* 11T53A14

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Engenharia Química, ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Processos Químicos, Petróleo e Meio Ambiente.

Aprovada em 13 de fevereiro de 2023.

Banca Examinadora:



Prof.^a Dr.^a Gizele Cardoso Fontes Sant'Ana
Instituto de Química – UERJ

Documento assinado digitalmente



MARCIO LUIS LYRA PAREDES
Data: 06/04/2023 16:33:32-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Márcio Luis Lyra Paredes
Instituto de Química – UERJ

Documento assinado digitalmente



VERONICA FERREIRA MELO
Data: 06/04/2023 17:22:56-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

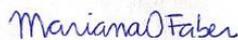
Prof.^a Dr Verônica Ferreira Melo
Instituto Federal do Rio de Janeiro



Prof.^a Dr.^a Ana Maria Furtado de Sousa
Instituto de Química – UERJ



Prof. Dr. Bernardo Dias Ribeiro
Universidade Federal do Rio de Janeiro



Prof.^a Dr.^a Mariana de Oliveira Faber
Instituto Nacional de Tecnologia

Rio de Janeiro

2023

AGRADECIMENTOS

Deixo os meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que de alguma forma fizeram parte desta caminhada e que direta ou indiretamente colaboraram com a realização deste trabalho:

- a Deus;
- aos meus orientadores, Dr^a. Gizele Cardoso Fontes Sant'Ana, Dr. Márcio Luis Lyra Paredes e Dr^a Verônica Ferreira Melo pelo conhecimento compartilhado e pela atenção prestada;
- A minha família pelo amparo, apoio, e amor incondicional;
- Ao meu companheiro Samuele pelo incentivo, paciência e compreensão;
- Aos técnicos, colegas e professores do DTPB;
- Ao técnicos e colegas do LaTeMA;
- Técnicos Rafaela e Gabriel do IFRJ;
- Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura, Laboratório de Caracterização Instrumental e ao Laboratório de Raio X do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF) pelas análises;
- Aos professores Dr^a. Ana Maria Furtado e Dr. Marcos Colaço;
- Aos alunos de IC Luiza Dittz, Julyane Azeredo, Vitor Almeida e Hugo Ferreira;
- Aos monitores do Laboratório de alimentos do IFRJ;
- A todos os professores e a secretaria do programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da UERJ;
- Ao CNPQ;
- Ao PRH-ANP e FINEP pela bolsa e auxílio financeiro.

RESUMO

LOPES, Lais Gracio. **Desconstrução da biomassa lignocelulósica com solvente eutético profundo seguido de hidrólise com extrato enzimático de *Aspergillus niger* 11T53A14.** 2023. 107 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023

As principais etapas da produção de bioetanol a partir da biomassa lignocelulósica são: pré-tratamento, hidrólise enzimática e fermentação. A viabilidade técnico-econômica da produção deste biocombustível depende do desenvolvimento de um pré-tratamento eficiente, econômico e ecológico. Nesse cenário, os solventes eutéticos profundos (do inglês, deep eutectic solvent - DES) têm-se mostrado promissores, porque além de serem menos agressivos ao meio ambiente e relativamente econômicos, esses solventes têm apresentado eficiência na desconstrução da lignocelulose. Entre os DES, aquele formado por cloreto de colina (ChCl) e ácido láctico tem se destacado na literatura. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência do pré-tratamento com o DES formado por ChCl e ácido láctico na desconstrução da estrutura lignocelulósica do bagaço de cana-de-açúcar e no aumento do rendimento de açúcares após a hidrólise enzimática. Para isto, o pré-tratamento foi realizado a 80 °C, com 0,05 g/mL de biomassa por diferentes tempos de tratamento com e sem posterior lavagem da biomassa com etanol 60 %(v/v). Análises químicas e estruturais, como FTIR, TGA, MEV e DRX foram realizadas, assim como a hidrólise enzimática da biomassa in natura e pré-tratada. A atividade de celulases totais produzidas pelo *Aspergillus niger* 11T53A14 por cultivo em estado sólido foi de 0,37 ($\pm 0,025$) UI/g. As enzimas produzidas por *A. niger* 11T53A14 mantiveram suas atividades em baixas concentrações de DES. A remoção de lignina com o pré-tratamento de 12 h a 80°C e lavado com etanol foi estimada em 63,6 % e recuperação de celulose em 77,4 %. As análises estruturais corroboraram os resultados da composição, indicando uma promoção da desconstrução da biomassa lignocelulósica pelo DES estudado.

Palavras chaves: Solvente eutético profundo. Etanol 2G. Celulases.

ABSTRACT

LOPES, Lais Gracio. **Deconstruction of lignocellulosic biomass with deep eutectic solvent followed by hydrolysis with enzymatic extract of *Aspergillus niger* 11T53A14.** 2023. 107 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023

The main stages of bioethanol production from lignocellulosic biomass are pre-treatment, enzymatic hydrolysis, and fermentation. The technical-economic feasibility of producing this biofuel depends on the development of an efficient, economic, and ecological pre-treatment. In this scenario, deep eutectic solvents (DES) have shown promise, because in addition to being less harmful to the environment and relatively economical, these solvents have shown efficiency in the deconstruction of lignocellulose. Among DES, the one formed by choline chloride (ChCl) and lactic acid has been highlighted in the literature. In this context, the objective of this work was to evaluate the efficiency of the pretreatment with DES formed by ChCl and lactic acid in the deconstruction of the lignocellulosic structure of sugarcane bagasse and in the increase of the yield of sugars after enzymatic hydrolysis. For this, the pre-treatment was carried out at 80 °C, with 0.05 g/mL of biomass for different treatment times with and without subsequent washing of the biomass with 60% (v/v) ethanol. Chemical and structural analyzes such as FTIR, TGA, SEM and DRX were performed, as well as enzymatic hydrolysis of fresh and pre-treated biomass. The total cellulase activity produced by *Aspergillus niger* 11T53A14 by solid state fermentation was 0.37 (± 0.025) IU/g. Enzymes produced by *A. niger* 11T53A14 maintained their activities at low concentrations of DES. Lignin removal with 12 h pretreatment at 80°C and ethanol washing was estimated at 63.6% and cellulose recovery at 77.4%. Structural analyzes corroborated the composition results, indicating a promotion of deconstruction of lignocellulosic biomass by the studied DES.

Keywords: Deep eutectic solvent. Ethanol 2G. Cellulases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Evolução da produção de biocombustíveis no mundo	21
Figura 2 –Estrutura da parede celular secundária.....	24
Figura 3 - Ligações glicosídicas β -1,4.....	25
Figura 4- Ligações de hidrogênio intermoleculares e intramoleculares da celulose.....	26
Figura 5- Representação da regiões cristalina e amorfa da celulose	26
Figura 6- Representação esquemática da organização da celulose na parede celular	27
Figura 7 - Representação do modelo de uma célula unitária de celulose.....	28
Figura 8- Padrão de ligação de hidrogênio diferente nas celulosas tipo I e tipo II	28
Figura 9- Transformação da celulose nativa em diferentes polimorfos.	29
Figura 10 - Fórmula estrutural das xilanas.	30
Figura 11- Fórmula estrutural da lignina e seus precursores.....	31
Figura 12- Representação esquemática da ruptura do complexo lignocelulósico.....	32
Figura 13 - Formação do solvente eutético profundo (DES) a base de cloreto de colina, como aceitador de ligação de hidrogênio, e ureia, como doador de ligação de hidrogênio (HBD)...	35
Figura 14 -Mecanismo de ação das celulases	42
Figura 15-Representação esquemática da amorfogênese das fibras de celulose causada pelo domínio glicopeptídico de ligação à celulose (CBM)) da celobiohidrolase I (CHB I).	44
Figura 16- <i>Aspergillus niger</i> no microscópio.	47
Figura 17- Diagrama de blocos da obtenção de açúcares fermentáveis	49
Figura 18- Bagaço de cana-de-açúcar seco (a) e bagaço de cana-de-açúcar cominuído (b). ...	50
Figura 19 - Extração com Soxhlet	52
Figura 20- Produção de celulases por <i>A. niger</i> por cultivo em estado sólido utilizando farelo de trigo com 50% de umidade como meio de cultivo a 32 °C por 72 h.	59
Figura 21- Curva padrão de glicose (método de DNS)	62
Figura 22- Curva padrão de glicose (método de DNS em escala reduzida).....	63
Figura 23- Solvente eutético profundo, formado por cloreto de colina e ácido láctico na proporção molar de 1:5.....	64
Figura 24 - Pré-tratamento do bagaço de cana-de açúcar com o solvente eutético formado por cloreto de colina e ácido láctico na proporção molar 1:5, utilizando 0,05 g de sólido /mL de solvente a 80° C.	65
Figura 25- Atividade residual das celulases totais em 1% (v/v) de diferentes solventes eutéticos em solução tampão de citrato de sódio após 24 h.	72

Figura 26- Bagaço de cana antes e após diferentes tempos (3h, 9h, 12h e 15h) de pré-tratamento com solvente eutético formado por cloreto de colina e ácido láctico a proporção molar de 1:5 a 80 °C.	73
Figura 27- Teor de lignina do bagaço em função do tempo de pré-tratamento com solvente eutético formado por cloreto de colina e ácido láctico a proporção molar de 1:5 a 80 °C.....	74
Figura 28- Sólidos recuperados do pré-tratamento com solvente eutético formado por cloreto de colina e ácido láctico a proporção molar de 1:5 a 80 °C.	75
Figura 29 - Microscopia eletrônica de varredura com aumento de 500x das amostras de bagaço (a) antes e após o pré-tratamento com solvente eutético formado por cloreto de colina e ácido láctico a proporção molar de 1:5 a 80 °C por (b) 3 h, (c) 9 h, (d) 12 h e (e) 15 h.....	77
Figura 30- Difratoograma de raios-X das amostras de bagaço de cana <i>in natura</i> (IN) e tratados com solvente eutético formado por cloreto de colina e ácido láctico a proporção molar de 1:5 a 80 °C em diferentes tempos (3 h, 9 h, 12 h e 15 h).....	79
Figura 31- Espectros de FT-IR de amostra de bagaço antes e após o pré-tratamento com solvente eutético formado por cloreto de colina e ácido láctico a proporção molar de 1:5 a 80 °C por 3, 9, 12 e 15 h.	82
Figura 32- Curvas de TGA das amostras de bagaço de cana <i>in natura</i> (IN) e pré-tratado (por 3, 9, 12 e 15h) com solvente eutético formado por cloreto de colina e ácido láctico a proporção molar de 1:5 a 80 °C.	83
Figura 33 - Curvas de DTG das amostras de bagaço de cana <i>in natura</i> (IN) e pré-tratado (por 3, 9, 12 e 15h) com solvente eutético formado por cloreto de colina e ácido láctico a proporção molar de 1:5 a 80 °C.	84
Figura 34- Filtrados obtidos após o pré-tratamento com solvente eutético formado por cloreto de colina e ácido láctico na proporção molar de 1:5 a 80 °C por 12 h e lavagem com água destilada e etanol 60% (v/v).	86
Figura 35- Microscopia eletrônica de varredura (aumento de 100x) das amostras de bagaço (a) antes e (b) após o pré-tratamento com solvente eutético formado por cloreto de colina e ácido láctico a proporção molar de 1:5 a 80 °C por 12 h e lavagem com etanol.	89
Figura 36- Difratoogramas de raios X das amostras de bagaço de cana <i>in natura</i> (IN) e tratado com solvente eutético formado por cloreto de colina e ácido láctico a proporção molar de 1:5 a 80 °C por 12 h e lavado com etanol.....	90
Figura 37- Espectros de FT-IR de amostra de bagaço antes e após o pré-tratamento com solvente eutético formado por cloreto de colina e ácido láctico a proporção molar de 1:5 a 80 °C a 80 °C por 12 h e lavagem com etanol.	91

Figura 38 - Curvas TGA das amostras de bagaço in natura (IN) e pré-tratados com solvente eutético formado por cloreto de colina e ácido láctico a proporção molar de 1:5 a 80 °C por 12 h e lavado com etanol.	92
Figura 39- Curvas DTG das amostras de bagaço in natura (IN) e pré-tratados com solvente eutético formado por cloreto de colina e ácido láctico a proporção molar de 1:5 a 80 °C por 12 h e lavado com etanol.	93
Figura 40 - Concentração de açúcares redutores em função do tempo de hidrólise realizada a 40 °C, 100 rpm do bagaço in natura (a) do bagaço pré-tratado com solvente eutético formado por cloreto de colina e ácido láctico (b).	94
Figura 41- Meio reacional da hidrólise enzimática após 24 h.....	95
Figura 42- Plaqueamento em meio ágar Sabouraud de uma amostra de hidrolisado com azida sódica - Colônia microbiana.	96
Figura 43- Bactérias gram-positivas detectadas no plaqueamento de uma amostra de hidrolisado por microscópio.	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Ligações cruzadas entre celulose, hemicelulose e lignina.	24
Tabela 2- Tabela de aplicações dos solventes eutéticos profundos componentes.....	35
Tabela 3- Pré-tratamento de biomassa lignocelulósica utilizando diferentes tipos de DESs...	38
Tabela 4 - Composição do meio básico SOCAREAN.	56
Tabela 5- Composição de bagaço de cana in natura determinado neste trabalho e reportados na literatura.....	69
Tabela 6 - Propriedades físicas dos solventes eutético formados pela mistura de cloreto de colina (ChCl) com ácido láctico (AL) e com glicerol (Gli).	71
Tabela 7 - Índice de cristalinidade das amostras de bagaço in natura e pré-tratado por diferentes tempos (3 h, 9 h, 12 h e 15 h) com solvente eutético formado por cloreto de colina e ácido láctico a proporção molar de 1:5 a 80 °C.....	80
Tabela 8 - Temperaturas de velocidade máxima de degradação ($T_{Máx}$) e temperaturas de início de degradação (T_{onset}) das amostras in natura (IN) e pré-tratadas por 3, 9, 12 e 15 h com solvente eutético formado por cloreto de colina e ácido láctico a proporção molar de 1:5 a 80 °C.	85
Tabela 9 - Composição química do bagaço in natura e pré-tratado com solvente eutético formado por cloreto de colina e ácido láctico a proporção molar de 1:5 a 80 °C por 12 h e lavado com etanol 60% (v/v).....	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AL	Ácido láctico
CBH I	Celobiohidrolase I
CBH II	Celobiohidrolase II
CES	Cultivo em estado sólido
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
ChCl	Cloreto de colina (chloride choline)
DES	Solventes eutéticos profundos (deep eutectic solvent)
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
DRX	Difração de raio X
DTG	Termogravimetria Derivada
FDA	Food and Drug Administration
FPase	Atividade de papel filtro
FPU	Unidade de enzima com atividade em papel filtro
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
Gli	Glicerol
GRAS	Geralmente reconhecido como um produto seguro (Generally Recognized as Safe)
HBA	Aceptor de ligação de hidrogênio (hydrogen bond acceptor)
HBD	Doador de ligação de hidrogênio (hydrogen bond donor)
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
IC	Índice de cristalinidade
NREL	National Renewable Energy Laboratory
TGA	Análise termogravimétrica
MEV	Microscopia eletrônica de varredura

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	16
OBJETIVOS	19
Objetivo geral	19
Objetivos específicos	19
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
1.1 Biocombustíveis	20
1.1.1 <u>Etanol de segunda geração</u>	22
1.2 Material lignocelulósico	23
1.2.1 <u>Celulose</u>	25
1.2.2 <u>Hemicelulose</u>	29
1.2.3 <u>Lignina</u>	30
1.3 Bagaço de cana-de-açúcar.....	31
1.4 Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica.....	32
1.5 Solventes eutéticos profundos.....	34
1.5.1 <u>Solventes eutéticos profundos aplicados ao processamento da biomassa lignocelulósica</u>	36
1.6 Hidrólise enzimática	41
1.6.1 <u>Celulases</u>	41
1.7 Cultivo em estado sólido (CES)	45
2 METODOLOGIA.....	49
2.1 Diagrama de blocos	49
2.2 Matérias primas.....	50
2.2.1 <u>Bagaço de cana-de-açúcar</u>	50
2.3 Determinação da composição do bagaço de cana.....	50
2.3.1 <u>Umidade e sólidos totais</u>	51
2.3.2 <u>Determinação das cinzas totais</u>	51

2.3.3	<u>Determinação de extrativos</u>	52
2.3.4	<u>Determinação do teor de lignina solúvel e lignina insolúvel.</u>	53
2.3.5	<u>Determinação dos teores de celulose e hemicelulose por cromatografia líquida de alta eficiência.</u>	54
2.4	Microrganismo	55
2.5	Estocagem e ativação do fungo <i>Aspergillus niger</i> 11T53A14	56
2.6	Obtenção do inóculo	57
2.6.1	<u>Preparo do meio de sabugo de milho</u>	57
2.6.2	<u>Produção de conídios e preparo do inóculo</u>	57
2.7	Cultivo em estado sólido (CES) para a produção de celulases.	58
2.8	Determinação da atividade de celulases totais (FPase)	59
2.9	Análise de açúcares redutores pelo método de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).	60
2.9.1	<u>Preparo do reagente DNS</u>	61
2.9.2	<u>Preparo da curva padrão método de DNS</u>	61
2.10	Análise de açúcares redutores pelo método de DNS em escala reduzida	62
2.10.1	<u>Curva padrão de glicose Método de DNS em escala reduzida</u>	62
2.11	Preparo e propriedades físicas dos solventes eutéticos profundos (DES)	63
2.12	Efeito do DES na atividade enzimática.	64
2.13	Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica com solventes eutéticos profundos.	65
2.14	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	66
2.15	Difração de Raios X (DRX)	66
2.16	Análise de Espectroscopia de absorção no infravermelho (FT-IR)	66
2.17	Análise Termogravimétrica (TGA)	67
2.18	Hidrólise enzimática	67
2.19	Plaqueamento e coloração de Gram	67
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
3.1	Composição química do bagaço de cana-de-açúcar	69
3.2	Produção de celulases por <i>Aspergillus niger</i> 11T53A14	69

3.3	Preparo e propriedades físicas do Solventes eutéticos profundos.....	70
3.4	Efeito do DES na atividade enzimática.	71
3.5	Pré-tratamento do bagaço de cana com DES seguido de lavagem com água destilada.....	73
3.5.1	<u>Teor de Lignina</u>	74
3.5.2	<u>Recuperação de Sólidos</u>	75
3.5.3	<u>Microscopia eletrônica de varredura</u>	76
3.5.4	<u>Difração de raios X</u>	78
3.5.5	<u>Análise de Espectroscopia de absorção no infravermelho (FTIR)</u>	81
3.5.6	<u>Análise Termogravimétrica (TGA) e Termogravimetria derivada (DTG)</u>	82
3.6	Pré-tratamento da bagaço de cana com DES seguido da adição de etanol 60 % (v/v)	86
3.6.1	<u>Caracterização do bagaço pré-tratado com DES e lavado com etanol 60% (v/v)</u>	87
3.6.2	<u>Microscopia eletrônica de varredura</u>	88
3.6.3	<u>Difração de raios X</u>	89
3.6.4	<u>Análise de Espectroscopia de absorção no infravermelho (FTIR)</u>	90
3.6.5	<u>Análise Termogravimétrica (TGA) e Termogravimetria derivada (DTG)</u>	91
3.7	Hidrólise enzimática.....	93
	CONCLUSÕES	98
	PERSPECTIVAS.....	99
	REFERÊNCIA	100

INTRODUÇÃO

O etanol é um combustível líquido de origem renovável, considerado uma boa alternativa para substituir os combustíveis derivados do petróleo. Sua principal aplicação é em motor de veículos, podendo ser usado como combustível, ou como aditivo na gasolina. O etanol de primeira geração é o etanol obtido de matérias-primas açucaradas e amiláceas, ou seja, matérias-primas classificadas como comestíveis, como o milho, a cana-de-açúcar e o trigo. Diante disso, surgiram preocupações sobre a competição entre produção de biocombustíveis e a produção de alimentos, principalmente devido aos solos férteis e à quantidade de água requeridos para o cultivo destes produtos (ALALWAN; ALMMINSHID; ALIJAAFARI, 2019; AYODELE, 2019). A segunda geração é uma alternativa para superar esses problemas, visto que a matéria-prima desta geração é a biomassa lignocelulósica, portanto, não comestível (ALONSO-GÓMEZ, 2020). Na produção do etanol de segunda geração, são usados, majoritariamente, resíduos da agricultura, como bagaços, cascas e palhas (PEREIRA, 2015), mas também são considerados potenciais matérias-primas lignocelulósicas grama, serragem, madeiras de baixo preço e resíduos urbanos.

O material lignocelulósico é composto principalmente por celulose, hemicelulose e lignina, sendo sua composição dependente da origem da biomassa (ANU et al., 2020). Os três componentes estão estreitamente associados, ligados por forças não covalentes e ligações covalentes cruzadas, o que aumenta a dificuldade da hidrólise da celulose e da hemicelulose (PEREIRA, 2015; ANU et al., 2020). Então, apesar das vantagens de ser uma matéria-prima abundante, econômica e ecológica, a estrutura complexa e recalcitrante da biomassa lignocelulósica faz com que o aproveitamento deste material para produção de etanol e outros de produtos químicos de alto valor agregado ainda apresente grandes barreiras técnico-econômicas.

As principais etapas da produção de bioetanol a partir da biomassa lignocelulósica são: pré-tratamento, hidrólise enzimática e fermentação. A viabilidade da produção deste biocombustível depende do desenvolvimento de um pré-tratamento eficiente, econômico e ecológico e da redução do custo das enzimas hidrolíticas (ADSUL, 2019).

O pré-tratamento da biomassa visa a tornar os polissacarídeos mais acessíveis à hidrólise enzimática (ANU et al., 2020). O pré-tratamento ideal de ser capaz de promover a desconstrução da biomassa, evitar a degradação de açúcares, evitar a formação de subprodutos que irão inibir a ação dos microrganismos na fermentação, além de ser

econômico (ROBAK; BALCEREK, 2018; ANU et al, 2020). Métodos tradicionais de pré-tratamento, como os métodos físicos, químicos e físico-químicos já são utilizados industrialmente. No entanto, esses métodos criam preocupações ambientais além de outros inconvenientes como o uso de produtos químicos corrosivos, alto gasto de energia por causa das temperaturas e pressões elevadas empregadas, além da formação de inibidores do microrganismo responsável pela fermentação (ELGHARBAWY et al., 2020; ROY; RAHMAN; RAYNIE, 2020).

Nos últimos anos, pré-tratamentos à base de solventes ecologicamente corretos tornaram-se populares porque oferecem menor uso de produtos químicos tóxicos, menor gasto de energia e produzem menos resíduos. Por isso vários estudos se concentraram em uma classe particular de solventes, os líquidos iônicos (LIs), que se mostrou eficaz no pré-tratamento de biomassa, produzindo relativamente poucos inibidores. Além de possuírem baixas pressões de vapor, podem possuir alta estabilidade térmica e química. Embora os líquidos iônicos sejam promissores no pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, suas aplicações comerciais são dificultadas pelos altos custos, demanda de energia para reciclar os solventes, toxicidade e viscosidade. Portanto, um novo tipo de solvente verde tem se destacado como alternativa aos líquidos iônicos, os solventes eutéticos profundos (do inglês, *deep eutectic solvent* - DES) (PROCENTESE et al., 2015; ELGHARBAWY et al., 2020; ROY; RAHMAN; RAYNIE, 2020).

Os DES possuem a maioria das boas propriedades dos líquidos iônicos, mas são mais baratos, de mais fácil síntese e reciclo e menos tóxicos. O uso dos DES no pré-tratamento da biomassa tem sido eficiente na redução da recalcitrância da lignocelulose à hidrólise enzimática e em separar seletivamente a biomassa em seus componentes (ROY; RAHMAN; RAYNIE, 2020). Estudos indicam também uma boa compatibilidade entre estes solventes e as enzimas celulasas (GUNNY, 2015; SATLEWAL 2019). Os DES são geralmente compostos por um aceptor de ligação de hidrogênio (do inglês, *hydrogen bond acceptor* - HBA) como o cloreto de colina, e um doador de ligação de hidrogênio (do inglês, *hydrogen bond donor* - HBD) como por exemplo o ácido oxálico, o ácido láctico, a ureia, o glicerol, etc., em proporções específicas (ROY; RAHMAN; RAYNIE, 2020). Segundo Roy e colaboradores (2020) o pré-tratamento utilizando estes solventes pode ser uma das técnicas mais usadas no futuro.

Após o pré-tratamento, a biomassa desconstruída precisa ser hidrolisada, ou seja, os polissacarídeos devem ser convertidos a açúcares fermentescíveis. As celulasas são um grupo de enzimas responsáveis pela hidrólise da celulose. O alto custo das celulasas comerciais impede a produção de biocombustíveis de segunda geração a um preço competitivo. Para

reduzir os custos dessas enzimas, uma alternativa é a produção das enzimas celulolíticas por cultivo em estado sólido (CES). Este tipo de fermentação é caracterizada pelo uso de sólidos como matéria-prima na ausência ou quase ausência de água livre (LEITE et al., 2021; SALDARRIAGA-HERNÁNDEZ et al., 2020).

O cultivo em estado sólido apresenta, como uma característica importante, a possibilidade de utilizar subprodutos agroindustriais como fonte de nutrientes e suporte para o crescimento do microrganismo. Como a maioria desses subprodutos são de natureza lignocelulósica, o crescimento de microrganismos para a produção de enzimas lignocelulolíticas pode ser favorecido. A produtividade enzimática do cultivo em estado sólido, como todo processo biotecnológico, é definida pelo microrganismo e as condições de cultivo. Os fungos filamentosos são os mais adaptados a estas condições. Além disso, fungos filamentosos como *Aspergillus niger* são bons produtores de enzimas celulolíticas, pois produzem um sistema de celulasas mais completo e possuem maior capacidade de secreção do que bactérias (LEITE et al., 2021; YOON et al., 2014).

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo a desconstrução da biomassa lignocelulósica, bagaço de cana por solvente eutéctico profundo e posterior hidrólise com enzimas celulolíticas produzidas por *Aspergillus niger* 11T53A14.

OBJETIVOS

Objetivo geral:

O objetivo deste trabalho foi desconstruir a estrutura lignocelulósica do bagaço de cana-de-açúcar utilizando DES para posterior hidrólise com celulases produzidas por *A. niger* 11T53A14.

Objetivos específicos:

- Obter extrato enzimático celulolítico por cultivo em estado sólido a partir de *A. niger*.
- Avaliar a estabilidade das enzimas celulases produzidas pelo fungo *A. niger* 11T53A14 em soluções contendo solventes eutéticos profundos.
- Avaliar a desconstrução do bagaço de cana-de-açúcar promovida pelo DES formado por cloreto de colina e ácido lático por meio das técnicas MEV, FTIR, DRX e TGA.
- Hidrolisar enzimaticamente a matéria-prima pré-tratada e *in natura* para avaliar a influência do pré-tratamento no aumento da eficiência da hidrólise.

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

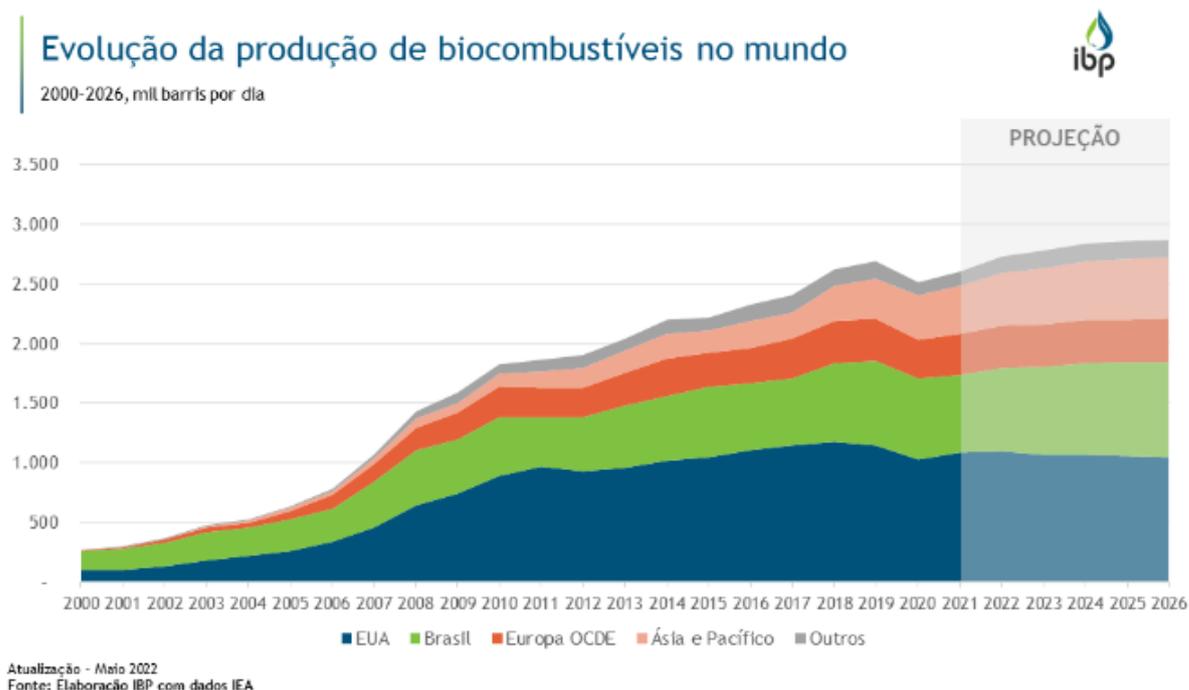
1.1 Biocombustíveis

Segundo a definição da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP): “Biocombustíveis são derivados de biomassa renovável que podem substituir, parcial ou totalmente, combustíveis derivados de petróleo e gás natural em motores a combustão ou em outro tipo de geração de energia.” (Disponível em <<https://www.gov.br/anp/pt-br/assuntos/qualidade-de-produtos/biocombustiveis>>. Acesso em: 16 jan. 2023).

Os biocombustíveis possuem propriedades físico-químicas semelhantes às dos combustíveis fósseis, portanto, podem ser usados em veículos, caldeiras industriais, eletrogeradores etc. com a vantagem de ser derivados de fontes biológicas (biomassa), ou seja, que podem ser cultivadas e colhidas repetidamente (LIN; LU, 2021; MALODE et al., 2020). A substituição da queima dos combustíveis fósseis pela de biocombustíveis pode impactar consideravelmente na redução das emissões de óxidos de carbono, óxidos de enxofre, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, fumaça preta e material particulado (LIN; LU, 2020). Os principais biocombustíveis são o etanol, o biodiesel, bio-hidrogênio e o biogás (SARAVANAN; PUGAZHENDHI; MATHIMANI 2020).

Os biocombustíveis são a única fonte alternativa de energia disponível que é totalmente compatível com os combustíveis líquidos para transporte existentes. O setor tem sido, portanto, o principal propulsor do uso de biocombustíveis nas últimas décadas (SAINI; SAINI; TEEARI; 2015; EBADIAN et al., 2020; LIN; LU, 2021) com a produção crescendo mais de 10 vezes entre 2000 e 2019. Dos 2,7 milhões de barris por dia produzidos em 2019, os EUA responderam por 1,1 milhão (42,4%), seguidos pelo Brasil com 710 mil (26,4%). (Dado disponível em <<https://www.ibp.org.br/observatorio-do-setor/snapshots/evolucao-da-producao-de-biocombustiveis-no-mundo>> Acesso em: 16 jan. 2023). A Figura 1 apresenta a evolução da produção de biocombustíveis no mundo.

Figura 1- Evolução da produção de biocombustíveis no mundo



Fonte: <<https://www.ibp.org.br/observatorio-do-setor/snapshots/evolucao-da-producao-de-biocombustiveis-no-mundo>>. Acesso em: 16 jan. 2023

Muitas políticas de biocombustíveis foram desenvolvidas para incentivar sua produção e uso, entre elas são usuais os mandatos de mistura, incentivos fiscais, padrões de combustíveis renováveis ou de carbono e financiamento público (EBADIAN et al, 2020). Segundo Sorda e colaboradores (2010), o crescimento na produção dos biocombustíveis é decorrente de intervenções governamentais.

O Brasil possui um dos programas de biocombustíveis mais desenvolvidos e integrados do mundo (EBADIAN et al., 2020). Em decorrência da crise do petróleo de 1970, o Brasil, em 1975, introduziu o Programa Nacional do Álcool, o Proálcool, com o objetivo de incentivar a produção de álcool a partir da cana-de-açúcar. Também foram feitos acordos com fabricantes para produção de veículos modificados, movidos a etanol. Em 1985, a venda desses automóveis chegaram a atingir 96% dos automóveis vendidos no país. Com a queda do preço do petróleo a partir de 1985, a difusão do etanol combustível teve um grande retrocesso. Diante disso e outras condições que afetaram o custo de produção do etanol o governo passou a exigir que 22% de etanol seja adicionado à gasolina em 1993, subindo para 25% em 2003. Entre 2003 e 2008 o preço do petróleo voltou a subir. Isso e o lançamento do veículo flex levaram ao ressurgimento do êxito inicial do etanol (SORDA; BANSE; KEMFERT, 2010).

Os biocombustíveis comercialmente disponíveis utilizam quase que exclusivamente matérias-primas comestíveis, como cana-de-açúcar, milho e sementes oleosas. Por isso, os

biocombustíveis foram parcialmente responsabilizados pelo aumento dos preços dos alimentos. Além disso, nas avaliações do ciclo de vida de biocombustíveis, observaram que certas matérias-primas e processamento contribuem negativamente para a redução nas emissões de gases do efeito estufa, sendo o mais prejudicial o etanol de milho. Em vista disso, está ganhando maior atenção o desenvolvimento dos biocombustíveis de segunda geração (2G) (SORDA; BANSE; KEMFERT, 2010).

A segunda geração de biocombustíveis refere-se ao uso de matérias-primas não alimentares, como por exemplo, plantas oleaginosas não comestíveis para o biodiesel e a biomassa lignocelulósica, no caso do etanol (SORDA; BANSE; KEMFERT, 2010).

1.1.1 Etanol de segunda geração

O etanol de primeira geração é o etanol obtido de matérias-primas açucaradas e amiláceas. As matérias-primas mais utilizadas para a produção de etanol são a cana-de-açúcar e o milho, seguidos por trigo, beterraba e sorgo (ALALWAN; ALMMINSHID; ALIJAAFARI, 2019). Na produção do etanol de segunda-geração são usados, majoritariamente, resíduos da agricultura, como bagaços, cascas e palhas (PEREIRA, 2015), mas também são consideradas potenciais matérias-primas lignocelulósicas grama, serragem, madeiras de baixo preço e resíduos urbanos.

A biomassa lignocelulósica possui uma estrutura complexa, fazendo com que a conversão da lignocelulose em açúcares fermentáveis seja mais difícil do que a conversão do amido (ALALWAN; ALMMINSHID; ALIJAAFARI, 2019). Então, apesar das vantagens de ser uma matéria-prima abundante, econômica e ecológica, o aproveitamento do material lignocelulósico para produção de etanol ainda apresenta grandes barreiras técnico-econômicas. As principais etapas do processo são: pré-tratamento, hidrólise e fermentação. A viabilidade da produção deste biocombustível depende da redução do custo das enzimas hidrolíticas, e do desenvolvimento de um pré-tratamento eficiente, econômico e ecológico (ADSUL, 2019).

No Brasil, existem duas plantas de etanol de segunda geração. Uma da GranBio (Bioflex-I), em Alagoas, com capacidade nominal de 60 milhões de litros/ano, e a da Raízen, em São Paulo, de 42 milhões de litros/ano. A Bioflex-I encontra-se em operação desde setembro de 2014 e GranBio anunciou em 2022 planos de alcançar a capacidade nominal da planta até 2024. Por sua vez, a Raízen produziu 24 milhões de litros em 2021. Em 2021, a

empresa anunciou a construção de uma nova usina de etanol 2G, com capacidade de produção de 82 milhões de litros por ano, localizado na cidade de Guariba (SP). Com previsão de início das atividades em 2023. E em 2022, a companhia anunciou que irá construir mais duas novas unidades de etanol 2G, ambas com capacidade de 82 milhões de litros ao ano, que serão integradas às usinas já existentes, com o início das operações previsto para 2024 (Análise de Conjuntura dos Biocombustíveis – Ano 2021, 2022). Com estes projetos, a Raízen terá uma capacidade instalada total de 280 milhões de litros por ano de etanol celulósico.

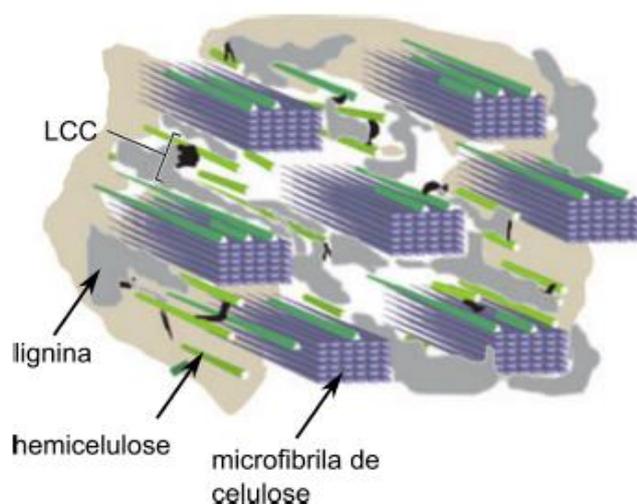
A título de comparação, a produção total de etanol no Brasil foi de 29,9 bilhões de litros em 2021, incluindo a produção de 3,3 bilhões de litros oriundos do milho (Análise de Conjuntura dos Biocombustíveis – Ano 2021, 2022).

1.2 Material lignocelulósico

O material lignocelulósico é um recurso renovável derivado da parede celular vegetal (SILVA, 2013). As paredes celulares são formadas por até três camadas, a lamela média, região de união entre duas células adjacentes, a parede celular primária e a parede celular secundária. As paredes celulares primárias ocorrem em todas as células e são compostas principalmente por polissacarídeos como celulose, hemicelulose, pectina. Já as paredes secundárias ocorrem em células especializadas e são compostas de celulose e hemicelulose, que são muitas vezes impregnados de lignina (FARINAS 2011; SILVEIRA, 2014).

A celulose, a hemicelulose e a lignina se arranjam, na parede celular, em uma arquitetura resistente, que oferece suporte estrutural e proteção para plantas. Como apresentado na Figura 2, essa estrutura consiste em fibras de celulose imersas numa matriz amorfa de lignina e hemicelulose (SILVEIRA, 2014).

Figura 2 –Estrutura da parede celular secundária.



Legenda: LCC- complexo lignina-carboidrato.
 Fonte: SILVEIRA, 2014.

Esses três componentes estão estreitamente associados, ligados por forças não covalentes e ligações covalentes cruzadas, sejam elas entre as cadeias do mesmo componente, ou entre componentes diferentes. A Tabela 1 lista as diferentes ligações inter e intrapoliméricas da lignocelulose (ANU, et al., 2020; ROY et al., 2020).

Tabela 1- Ligações cruzadas entre celulose, hemicelulose e lignina.

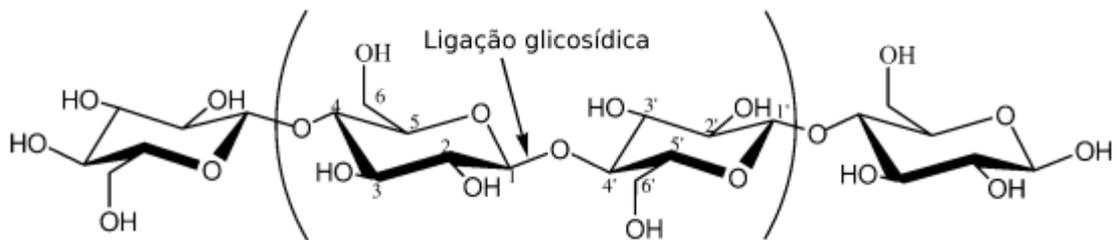
Ligações	Tipos de ligação	Polímeros envolvidos	
Cruzadas	Interpoliméricas	Éter	Lignina, Hemicelulose, Celulose
		Éster	Hemicelulose
		Hidrogênio	Celulose
Intrapoliméricas	Éter	Lignina-celulose	
		Lignina-hemicelulose	
	Éster	Lignina-hemicelulose	
		Hidrogênio	Celulose-hemicelulose
		Lignina-celulose	
		Lignina-hemicelulose	

Fonte: Adaptado de ROY et al., 2020.

1.2.1 Celulose

A celulose, um polímero semicristalino, constitui o núcleo do complexo lignocelulósico. É um homopolissacarídeo linear formado por unidades monoméricas de β -D-glicose conectadas por ligações glicosídicas β -1,4. A ligação dessas duas moléculas dá origem à celobiose, que é o dissacarídeo repetitivo da celulose, como ilustra a Figura 3 (PEREIRA 2015; TURSI, 2019; ANU et al., 2020). A forma molecular da celulose é $(C_6H_{12}O_6)_n$, sendo n equivalente ao número de meros do polímero, que pode chegar a 15mil (TURSI, 2019; SINGH et al, 2019).

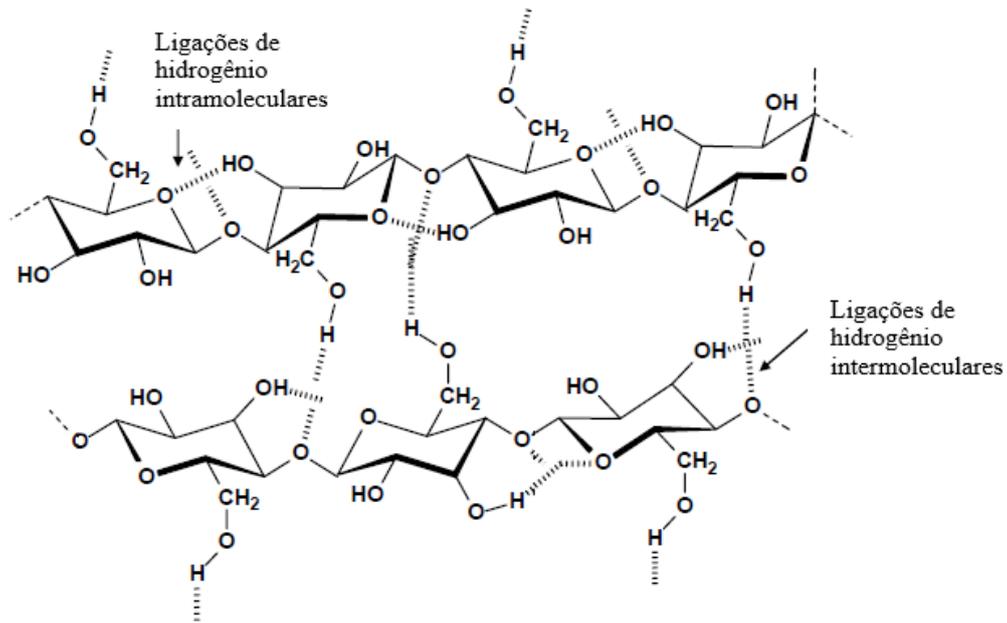
Figura 3 - Ligações glicosídicas β -1,4.



Fonte: STANKOVIC, 2014.

A presença de ligações de hidrogênio tanto intramolecular quanto intermolecular formam uma rede de cadeias que se estendem lado a lado conferindo resistência a tensão (NELSON et al., 2014). Uma representação esquemática das ligações de hidrogênio intra e intermolecular na celulose é apresentado na Figura 4. Essas ligações são responsáveis pela alta cristalinidade da celulose, e conseqüente rigidez, insolubilidade e resistência a hidrólise enzimática.

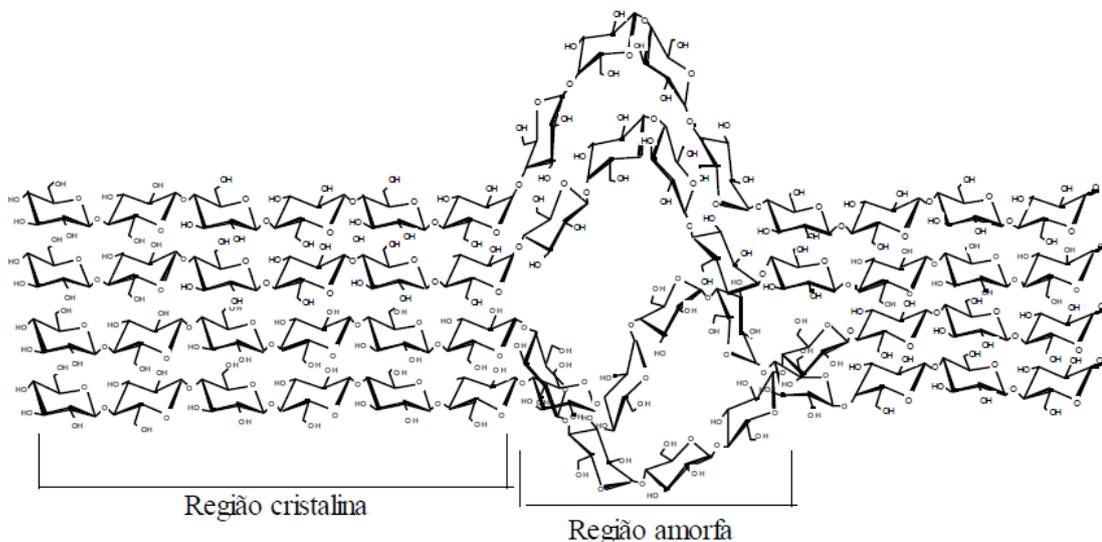
Figura 4- Ligações de hidrogênio intermoleculares e intramoleculares da celulose



Fonte: Adaptado de PEREIRA JR., 1991

As regiões amorfas também presentes na celulose possuem menor resistência ao ataque enzimático (PEREIRA, 2015; SINGH et al, 2019). A Figura 5 representa as regiões cristalina e amorfa da celulose, em que o percentual da estrutura cristalina pode variar de 30 a 80%, e confere a cristalinidade e estrutura fibrosa para a lignocelulose (TURSI, 2019; ANU et al., 2020).

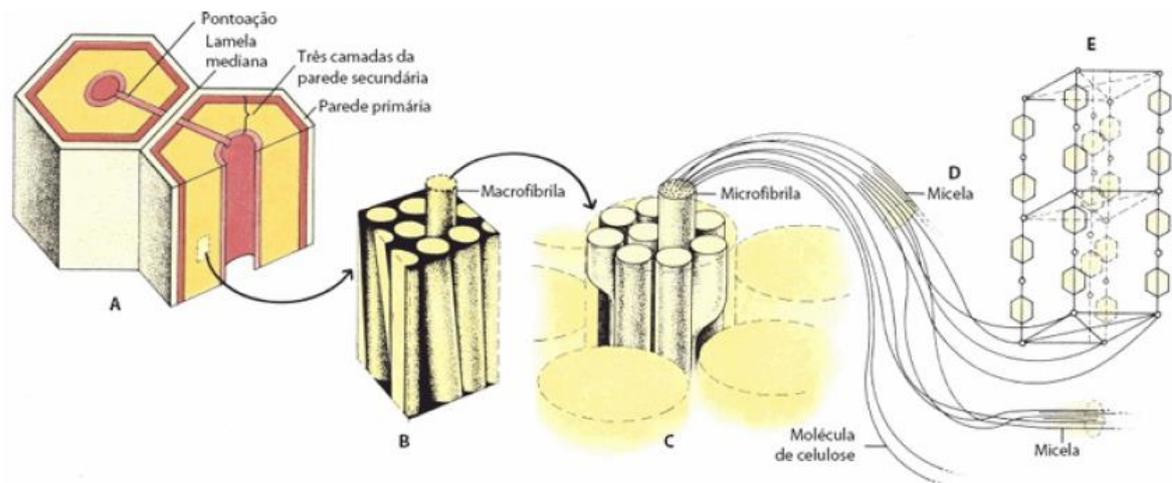
Figura 5- Representação da regiões cristalina e amorfa da celulose



Fonte: DILLON, 2004.

A celulose ocorre como um sistema de fibrilas de diferentes tamanhos (Figura 6). As cadeias longas e finas da celulose se agrupam, por ligações de hidrogênio, formando microfibrilas, que se entrelaçam formando as macrofibrilas. As micelas, representadas na Figura 6, são porções das microfibrilas que estão dispostas ordenadamente e conferem propriedades cristalinas à parede (RAVEN et al., 2001).

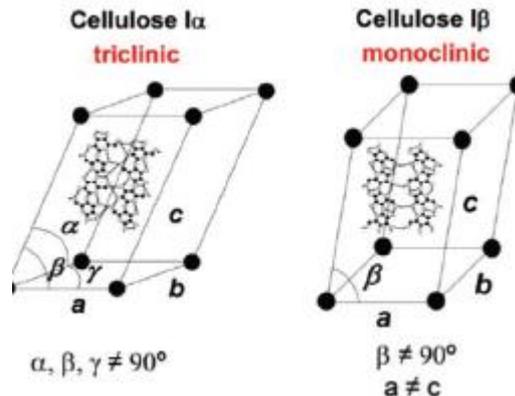
Figura 6- Representação esquemática da organização da celulose na parede celular



Fonte: RAVEN et al., 2014

A celulose apresenta diferentes formas polimorfas, ou seja, a celulose existe sob mais de uma forma cristalina. A celulose nativa se refere à celulose tipo I e apresenta duas formas cristalinas, $I\alpha$ com células unitárias triclinica e $I\beta$ organizada em células unitárias monoclinica. Esta última é predominantemente encontrada em vegetais superiores (Figura 7) (PELEGRINI et al., 2019; SILVA, 2013).

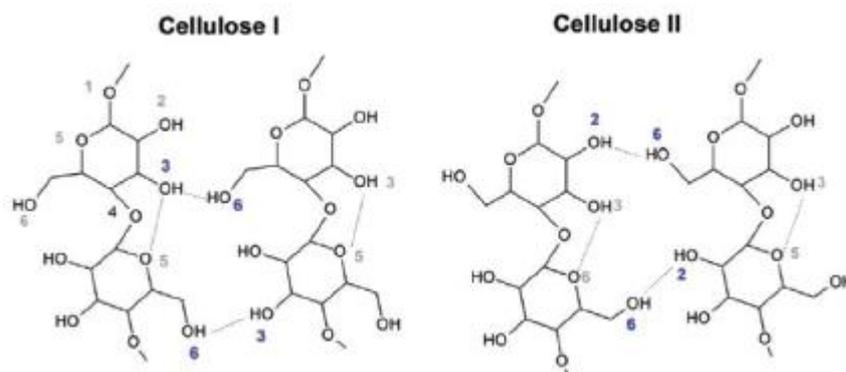
Figura 7 - Representação do modelo de uma célula unitária de celulose



Fonte: Adaptado de PELEGRINI et al., 2019

Já as outras formas cristalinas (II, III e IV) podem ser obtidas após tratamento mecânico, térmico ou químico da celulose tipo I (MAEDA, 2010; SOUZA, 2009). A celulose tipo II, comumente reportada na literatura, pode ser obtida pela dissolução e posterior regeneração do polímero ou pelo processo de mercerização. Celulose tipo I e II possuem um padrão de ligação de hidrogênio diferente: a ligação de hidrogênio intercadeia O_6-H-O_3 é dominante na celulose tipo I, enquanto a ligação de hidrogênio intercadeia O_6-H-O_2 é predominante na celulose tipo II, como apresentado na Figura 8 (PELEGRINI et al., 2019; SILVA, 2013). Entre essas duas estruturas, a celulose tipo II é a mais termodinamicamente estável.

Figura 8- Padrão de ligação de hidrogênio diferente nas celuloses tipo I e tipo II

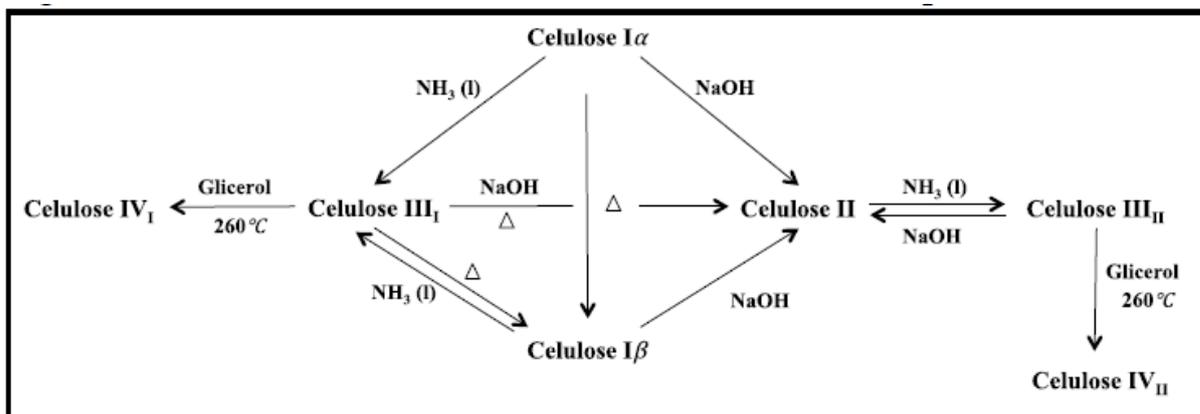


Fonte: Adaptado de PELEGRINI et al., 2019

A celulose tipo III é obtida a partir do tratamento da celulose I ou II com amônia líquida ou algumas aminas, e a celulose IV é obtida pelo tratamento térmico da celulose III na

presença de glicerol (SOUZA, 2009; SILVA, 2013). A Figura 9 apresenta um esquema dos processos de obtenção dos diferentes polimorfos da celulose.

Figura 9- Transformação da celulose nativa em diferentes polimorfos.



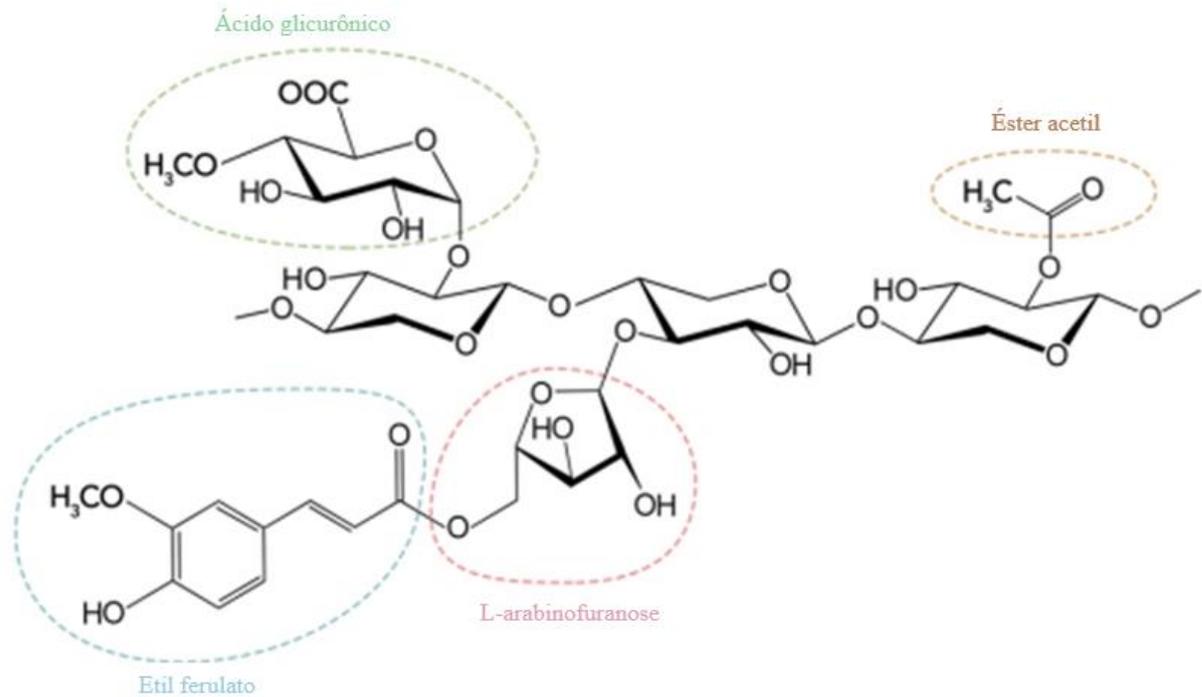
Fonte: Adaptado de MERLINI, 2016

1.2.2 Hemicelulose

Ligada à superfície das microfibras de celulose está a hemicelulose. A hemicelulose, polissacarídeo curto, ramificado, heterogêneo e amorfo, é constituída fundamentalmente por xilana, manana, galactanas e arabinogalactanas (SINGH et al, 2019; TURSI, 2019). No geral, a hemicelulose é formada por pentoses, como as D-xilose e L-arabinose, e hexoses, como as D-manose, D-galactose e D-glicose. O carboidrato principal da hemicelulose é a xilana, ele não possui a estrutura organizada cristalina como a celulose, sendo então mais suscetível a hidrólise (BINOD et al, 2011).

O esqueleto das xilanas é formado por resíduos de xilose conectados por ligações β -1,4 e apresentam uma grande variedade de cadeias laterais, como arabinose, ácido glicurônico e grupos acetil (Figura 10). A acetilação da xilana impede ação das xilana hidrolases e por consequência aumenta a recalcitrância da biomassa. Além disso, o acúmulo do grupo acetato liberado no tratamento age como inibidor do microrganismo na etapa da fermentação (SINGH, et al., 2019; TURSI, 2019).

Figura 10 - Fórmula estrutural das xilanas.



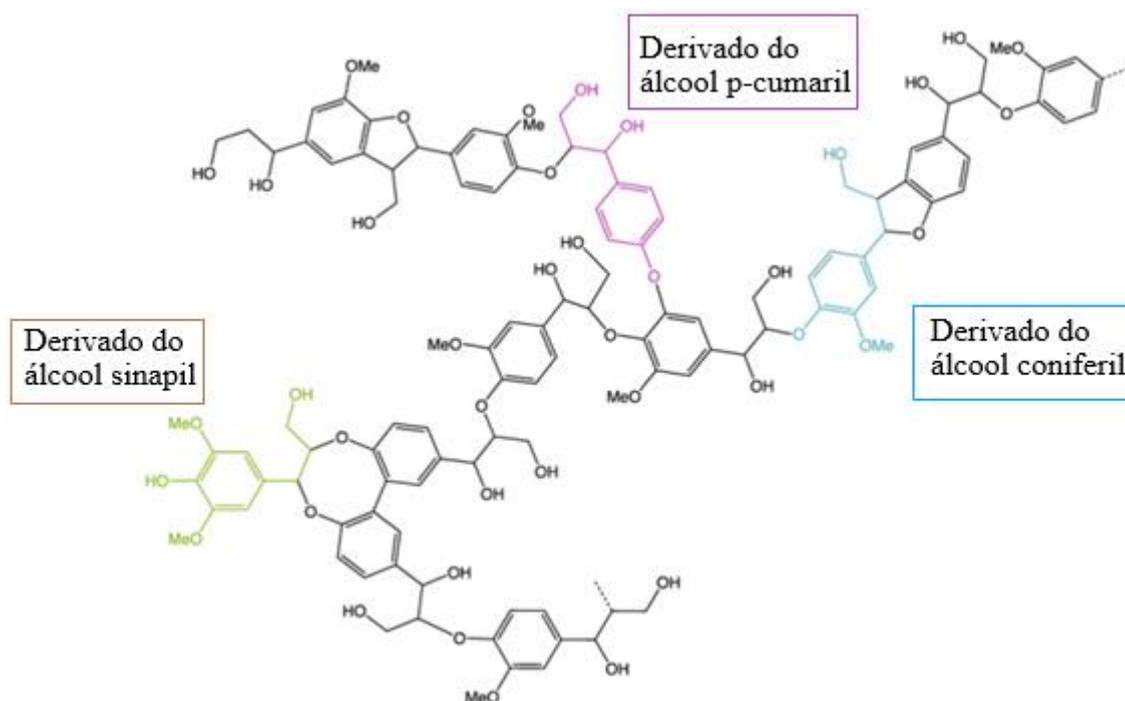
Fonte: Adaptado de TURSI 2019

1.2.3 Lignina

A lignina é uma macromolécula amorfa e reticulada, que tem como função aumentar a compactação e resistência, tanto mecânica quanto contra o ataque microbiano (SINGH et al, 2019). Segundo Rezania et. al, 2020, a presença da lignina é a maior barreira para a conversão dos carboidratos em açúcares simples, porque esta age como uma cola que une a celulose à hemicelulose formando a complexa rede lignocelulósica.

A molécula é formada por unidades de fenilpropano, derivadas de reações de acoplamento oxidativo dos álcoois p-cumaril, coniferil e sinapil (PIN et al, 2021), como ilustrado na Figura 11. Essas três unidades de fenilpropano são ligadas entre si por meio de éter arílico aleatório (β -O-4, α -O-4, 4-O-5) e carbono-carbono (5- 5', β -5, β -1, β - β) (SOARES et al., 2020). Devido aos grupos polares e a interações entre eles, a lignina não é facilmente solubilizada, sendo a apenas por soluções alcalinas. Além de fortalecer a parede celular, a lignificação torna as membranas menos inchadas porque ela satura os grupos OH da celulose (TURSI, 2019). A lignina se liga de forma covalente à hemicelulose, cobrindo de forma organizada as fibras de celulose (SINGH et al., 2019).

Figura 11- Fórmula estrutural da lignina e seus precursores.



Fonte: Adaptado de TURSI, 2019

1.3 Bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço da cana-de-açúcar é um material lignocelulósico obtido após a moagem da cana-de-açúcar para extração do caldo nas usinas sucroalcooleiras. A composição do bagaço depende da variedade da cana-de-açúcar, do local de cultivo, da época de colheita, da composição do solo, e do período de maturação da planta. A composição costuma variar nas faixas de 32% - 45% de celulose, 27% - 35% de hemiceluloses 19% - 30% de lignina (GOMIDE, 2019).

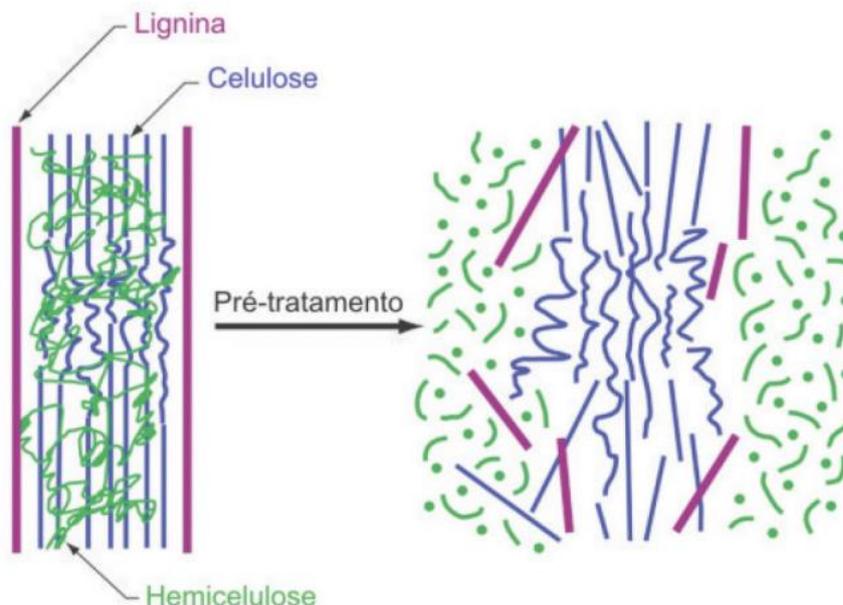
O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo (EPIRITO SANTO, 2020). No ano de 2021 o processamento de cana-de-açúcar foi de 581 milhões de toneladas (Análise de Conjuntura dos Biocombustíveis – Ano 2021, 2022). Para cada tonelada de cana moída são produzidos cerca de 280 kg de bagaço úmido (50%) e de 66 a 166 kg de palha úmida (15%) (JOPPERT, 2019). A principal destinação do bagaço nas usinas sucroenergéticas é a queima deste em caldeiras para geração de energia elétrica. Outras alternativas de aproveitamento do

bagaço é na forma de pellets ou transformando o bagaço em biocombustíveis gasosos ou líquidos (JOPPERT, 2019).

1.4 Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica

O pré-tratamento da biomassa visa a romper o complexo lignocelulósico, separar a lignina e a hemicelulose da celulose (Figura 12), assim como reduzir a cristalinidade da celulose, com objetivo de tornar os polissacarídeos mais acessível a hidrólise enzimática (ANU et al., 2020). O pré-tratamento ideal tem de ser capaz de (1) melhorar a digestibilidade da biomassa e consequentemente aumentar a formação de açúcares na hidrólise, (2) evitar a degradação de açúcares, evitando perdas, (3) evitar a formação de subprodutos que irão inibir a ação dos microrganismos na fermentação. (4) ser economicamente viável (ROBAK; BALCEREK, 2018; ANU et al, 2020). Os tratamentos podem ser físicos, químicos, biológicos e combinados (SINGH et al., 2019). A seguir serão apresentados alguns pré-tratamentos importantes.

Figura 12- Representação esquemática da ruptura do complexo lignocelulósico



Fonte: SANTOS et al. 2012

Pré-tratamentos físicos tem como objetivo aumentar a área superficial da biomassa, diminuindo seu tamanho ou destruindo a estrutura da parede celular. Esses podem ser

mecânicos, como trituração e moagem, ou por irradiação, como micro-ondas. Os tratamentos mecânicos são muito utilizados, geralmente combinado com outros pré-tratamentos, eles promovem a melhor biodegradabilidade da biomassa porque atuam diminuindo suas partículas e seu grau de cristalinidade, conseqüentemente aumentando superfície acessível às enzimas hidrolíticas. A desvantagem desse mecanismo é o alto consumo de energia quando utilizado sozinho (ZHANG et al., 2020).

Outro processo físico importante é a explosão a vapor. Neste pré-tratamento, a biomassa é submetida a vapor saturado a uma alta pressão que é repentinamente reduzida para descompressão explosiva da biomassa lignocelulósica. A queda repentina da pressão provoca a auto-hidrólise do grupo acetil das hemiceluloses, rompendo a parede celular. A principal vantagem deste método é que não necessita de produtos químicos para solubilizar a hemicelulose e transformar a lignina. Porém, por conta das altas temperaturas há a formação de compostos que inibem a hidrólise enzimática e a fermentação (ANU et al., 2020; KUMAR et al., 2020). Segundo Poli (2019), atualmente a maioria das instituições utiliza a explosão a vapor combinado com algum outro tipo de pré-tratamento, como mecânico e químico. De acordo com a autora, o processo empregado pela GranBio e pela Raízen incluem a explosão a vapor para o pré-tratamento da biomassa.

Os pré-tratamentos químicos tradicionais são o ácido e o alcalino. O tratamento ácido pode ser realizado com ácido diluído ou concentrado, mas trabalhar com ácido concentrado não é desejável pois aumenta a corrosão dos equipamentos, os custos de manutenção e operação. O ácido diluído solubiliza a hemicelulose e promove o rompimento da estrutura recalcitrante da biomassa. Os tipos mais comuns de ácidos empregados são: ácido acético, clorídrico, nítrico e sulfúrico, sendo este último o mais utilizado (POLI, 2019). As desvantagens deste tratamento são a necessidade de remoção dos ácidos antes da fermentação e a formação de inibidores (ANU et al., 2020). Enquanto que na deslignificação alcalina, as bases atuam degradando a lignina e rompendo as ligações entre esta e os carboidratos. Esse tratamento também causa o inchaço da biomassa, aumentando sua porosidade e diminuindo a cristalinidade da celulose. As bases mais utilizadas são: hidróxido de sódio, hidróxido de cálcio, amônia e ureia (POLI, 2019). O pré-tratamento alcalino degrada menos os açúcares comparado ao pré-tratamento ácido (ZHANG et al., 2020; ANU et al., 2020).

As técnicas baseadas em líquidos iônicos (LI) e solventes eutéticos profundos (DES) são consideradas menos prejudicial ao meio ambiente do que os tratamentos químicos anteriores. Os LI costumam ser definidos como eletrólitos líquidos compostos inteiramente de íons com ponto de fusão inferior a 100 °C (ROY et al., 2020). Esses solventes possuem propriedades ajustáveis, variando o ânion e o cátion, sendo que os cátions podem ser

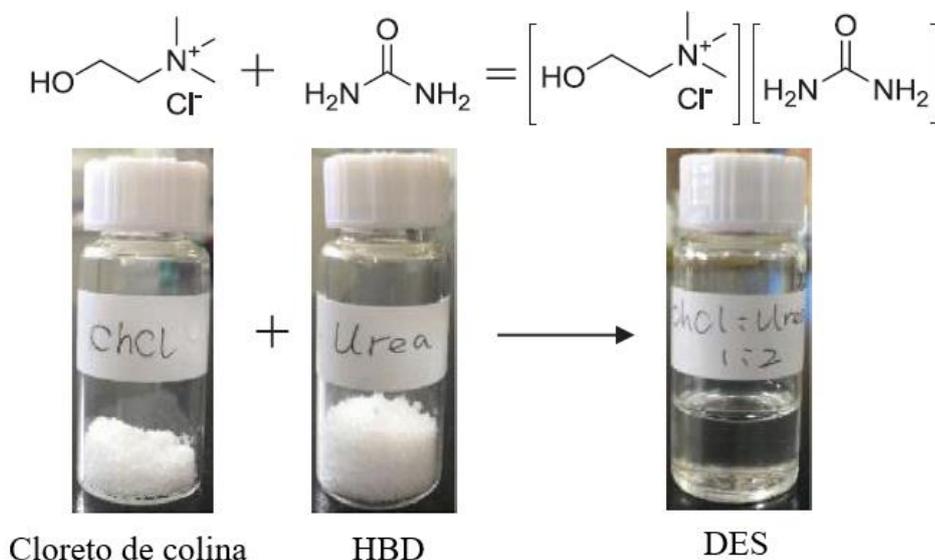
escolhidos dentro de “famílias”, nas quais são modificados tamanho da ramificação alquil. Os líquidos iônicos promovem a ruptura da rede tridimensional, através da competição por ligações de hidrogênio. As limitações deste pré-tratamento são o alto custo do solvente, necessidade de reciclagem (que envolve alto consumo de energia) e a toxicidade dos LI para enzimas e leveduras (KUMAR et al., 2020). Os DES foram propostos como uma alternativa barata aos LI porque apresentam propriedades parecidas como baixa volatilidade, alta estabilidade térmica, não inflamabilidade e boa condutividade. Entre outras vantagens, os DES são de fácil síntese e reciclo, não tóxicos, ecologicamente amigáveis, amplamente disponíveis e podem ser formados por substâncias de baixo custo. Assim como os líquidos iônicos, as propriedades dos DES podem ser ajustadas combinando diferentes componentes (STEFANOVIC et al., 2016; MARTINS et al., 2018).

1.5 Solventes eutéicos profundos

Em 2003, o termo 'solventes eutéicos profundos (DES)' foi usado pela primeira vez por Abbott et al. (2003) para descrever misturas de amidas com sais de amônio quaternário que tinham pontos de fusão muito inferiores aos de seus compostos puros. No entanto, em 2014, o termo foi estendido por Abbott e colaboradores, que propuseram a nova definição: Os DES são sistemas formados a partir de uma mistura eutética de ácidos e bases de Lewis ou Brønsted que podem conter uma variedade de espécies aniônicas e/ou catiônicas (SMITH et al., 2014). Atualmente, diferentes definições do que é um DES podem ser encontradas na literatura (MARTINS et al., 2018).

Os DES são geralmente formados por um sal quaternário de amônio e por pelo menos um doador de ligação de hidrogênio para formar uma mistura com um ponto de fusão reduzido em comparação com seus componentes puros. Segundo XU et al. (2020) o DES se forma devido a interações muito fortes de ligação de hidrogênio entre seus componentes. Ou seja, o menor ponto de fusão do solvente se dá devido à parte aniônica de ChCl e doador de ligação de hidrogênio (HBD). A Figura 13 representa esquematicamente a formação do DES.

Figura 13 - Formação do solvente eutético profundo (DES) a base de cloreto de colina, como aceitador de ligação de hidrogênio, e ureia, como doador de ligação de hidrogênio (HBD).



Fonte: Adaptado de XING et al., 2018

Os DES são classificados em 4 tipos diferentes de acordo com sua natureza. O DES tipo I é composto por um haleto metálico, geralmente ZnCl₂, SnCl₂, FeCl₃, (ácido de Lewis) e um sal quaternário de amônio, como o cloreto de colina. O íon cloreto (Cl⁻) atua como a base de Lewis; O tipo II é formado pela complexação entre haletos metálicos hidratados e uma espécie aniônica complexante. O tipo III é formado por um sal quaternário de amônio complexado com doador de ligação de hidrogênio (HBD) (um ácido de Lewis ou Brønsted). Os DES do tipo IV são formados por um haleto metálico, geralmente ZnCl₂, e HBD (SOUZA, 2019). A Tabela 2 apresenta possíveis aplicações dos DES.

Tabela 2- Tabela de aplicações dos solventes eutéticos profundos componentes.

Aplicação do DES	Referência
Eletrodeposição	Abbot et al., 2011
Catálise	Wang et al., 2015
Separação e captura de gases	Trivedi et al., 2016
Tratamento da biomassa	Xia et al., 2013
Separação de biomoléculas	Farias, 2019
Destilação extrativa	Souza, 2019

Fonte: O autor, 2022.

Os DES mais comuns e que têm sido aplicados nos estudos do processamento da biomassa lignocelulósica são os do tipo III, como as misturas do aceptor de ligação de hidrogênio (HBA), principalmente o cloreto de colina e os doadores de ligação de hidrogênio como ácidos carboxílicos, álcoois e amidas (STEFANOVIC et al., 2017). O cloreto de colina (ChCl) é o HBA mais comum, muito utilizado por sua grande disponibilidade, uma vez que é utilizado como ração animal, seu baixo custo e natureza segura (XU et al., 2020).

A escolha do HBD assim como a escolha da razão molar HBA/HBD podem afetar as propriedades físicas e químicas durante o pré-tratamento com DES do material lignocelulósico como a viscosidade, a densidade, a polaridade, acidez, condutividade, solubilidade etc. Por exemplo, um DES com menor densidade e viscosidade pode ter melhor capacidade de penetrar na estrutura da biomassa (XU et al., 2020).

1.5.1 Solventes eutéticos profundos aplicados ao processamento da biomassa lignocelulósica.

Os DES aplicados ao pré-tratamento da biomassa lignocelulósica podem melhorar a solubilidade da lignocelulose e separar seletivamente a biomassa (ROY; RAHMAN; RAYNIE; 2020). Esses solventes podem dissolver a lignina e a hemicelulose e alterar a estrutura dos componentes, como inchar a cadeia da celulose, reduzir parcialmente seu grau de polimerização, reduzir a cristalinidade e aumentar a área de reação efetiva (SONG et al., 2019; ELGARBAWY et al., 2020).

Estudos relataram que o pré-tratamento efetivo do DES foi baseado na sua capacidade de dissociação de ligações carbono-carbono e ligações aril éter dentro das estruturas de biomassa. Somando-se a isto, outros autores observaram que a ligação éter foi parcialmente clivada na estrutura da lignina extraída por DES (XU et al., 2020).

A maioria dos DES usados para o pré-tratamento de biomassa são à base de ácido. A extração seletiva da lignina mediada pelos DES formados por ChCl e ácido láctico, por exemplo, está relacionada a clivagem das ligações éter β -O-4 da estrutura da lignina. A eficiência de deslignificação do ChCl:AL é maior do que a do ácido láctico sozinho, sugerindo a contribuição do ChCl no processo (SOARES et al., 2020).

Estudos sobre a solubilidade dos componentes da lignocelulose em DES indicaram que a lignina pode ser dissolvida mais facilmente comparada aos polissacarídeos. A hemicelulose que apresentou maior solubilidade em DES do que a da celulose, que era

geralmente muito baixa. A diferença de solubilidade entre esses polissacarídeos está relacionada às características das cadeias, como o menor comprimento e natureza amorfa (XU et al., 2020). Segundo SOARES et al. (2020), durante o pré-tratamento com DES, parte da hemicelulose é extraída com lignina na fase líquida, enquanto as fibras de celulose não são dissolvidas.

Muitas publicações (CHOURASIA et al., 2021; SHARMA et al., 2020) relataram a correlação da remoção da lignina e hemicelulose e da alteração da cristalinidade da celulose com o aumento da eficiência da hidrólise enzimática. A eficácia de um pré-tratamento é relatada, frequentemente, em termos de rendimento glicosídico proveniente da hidrólise enzimática. Em termos de composição química, a remoção da lignina é um parâmetro importante, pois a lignina serve como barreira física para acessibilidade da enzima. Além disso, apresenta efeito de inibição causado pela ligação irreversível entre a celulase e a lignina, relatado por Sipponen et al., 2017 (WHANG et al., 2021).

A Tabela 3 apresenta alguns resultados reportados na literatura referentes a pré-tratamentos de biomassas lignocelulósicas com DES na eficiência da hidrólise enzimática. O DES formado pela mistura de cloreto de colina e ácido láctico (ChCl:AL) se destacou por ser eficiente na remoção de lignina da biomassa e aumentar sua digestibilidade pelas enzimas hidrolíticas, embora o pré-tratamento com este DES cause uma maior perda de sólidos devido à degradação de parte da celulose e hemicelulose (JI et al., 2021; CHEN et al., 2018; SATLEWAL et al., 2019; CHOURASIA et al., 2021). Por outro lado, o DES formado pela mistura de cloreto de colina e glicerol (ChCl:gli) proporcionou uma maior recuperação de sólidos e apesar da menor remoção da lignina promoveu o aumento na eficiência da hidrólise enzimática (ZHANG et al., 2016; SHARMA et al., 2020). Pode ser visto na tabela também que o pré-tratamento da biomassa com DES pode ser aprimorado com uso de ultrassom e micro-ondas (ROY et al., 2020; SHARMA et al., 2020; JI et al., 2021).

Tabela 3- Pré-tratamento de biomassa lignocelulósica utilizando diferentes tipos de DESs.

DES	Biomassa lignocelulósica	Razão sólido-líquido	Condição do pré-tratamento	Tipo de enzima	Condição enzimática	Resultados	Referência
ChCl:Gli (1:10)	Bagaço de cana	5.72	121 °C, 7.79 min (com ultrassom)	<i>A. assiutensis</i> VS34	50 °C, 72 h, pH 5,0	aRA: 312 mg/g	Sharma et al., 2020
ChCl:AL (1:2)	Bagaço de cana	10	120 °C, 3h (Com ultrassom)	Celulase de <i>Trichoderma viride</i> (Novozymes)	50 °C, 72 h, pH 4,8	bRG: 86.76% cRL: 85.62 ±0.67%	Ji et al., 2021
ChCl:Gli (1:2)	Espiga de milho	5	90 °C, 2h	Celulase de <i>Trichoderma reesei</i> (Sigma Aldrich).	50 °C, 24 h, pH 4,8	RG: 96.4%	Zhang et al., 2016
ChCl:AL (1:2)	Palha de milho switchgrass, miscanthus	10	152 °C, 45s (Com micro-ondas)	Cellic® CTec2 e HTec2 (Novozyme)	50 °C, 48 h, pH 4,8	RL: 79.6; RG: 78.5% (corn stover)	Chen et al., 2018
ChCl:AL (1:5)	Bagaço de cana sem extrativos	5	80 °C, 12h	Accellerase 1500 (DuPont)	50°C, 72 h, pH 5,0	RL: 50.6 ±3.3%; RG: 92,0%	Satlewal et al., 2019
ChCl:AL (1:5)	Variedades de bagaço de cana (SRA1, SRA5, Q208, MA239, ISB)	5	80 °C, 12h	Cellic CTec2-SAE0020 (Sigma-Aldrich)	50°C, 72 h, pH 4,8	RL: 81,6% (ISB.)	Chourasia et al., 2021
ChCl:Imidazol (1:2)	Espiga de milho	6,26	150°C, 15h	Cellic CTec 2 (Novozyme)	50°C, 80 h, pH 4,8	RL: 74%; RG: 94,6%;	Procentese et al., 2015
TEBAC :AL (1:15)	Bagaço de cana	6,67	120°C, 4h	Celulase e AMG300L β-glucosidas (Novozyme)	50°C, 108 h, pH 4,8	RL: 88.72 ± 1.63%	Liu et al., 2021

aRA (Rendimento de açúcares redutores) = açúcares redutores totais obtidos após hidrólise enzimática/peso da biomassa pré-tratada bRG (Rendimento de glicose) = glicose obtida da hidrólise enzimática/glicose teórica disponível na biomassa pré-tratada cRL = Remoção da lignina. Abreviaturas: cloreto de colina (ChCl), ácido lático (LA), glicerol (GLi), cloreto de trietilbenzil amônio (TEBAC).

Fonte: O autor, 2022.

Alguns fatores podem influenciar significativamente a eficiência do pré-tratamento e no rendimento de açúcares após a hidrólise enzimática. As propriedades da matéria-prima, como composição da biomassa, cristalinidade e tamanho de partícula, são alguns desses fatores, assim como as características dos DES, como a escolha do HBA e HBD e a razão molar entre eles e os parâmetros do processo (XU et al., 2020). Podemos destacar como parâmetros importantes para o pré-tratamento com o DES: a temperatura, a razão sólido-líquido e o tempo de pré-tratamento.

Um dos principais parâmetros do processo é a temperatura. Este varia na literatura comumente entre 60°C e 200°C (XU et al., 2020). Para o pré-tratamento da espiga de milho, utilizando o DES formado por cloreto de colina e ácido láctico (1:2) e razão sólido-líquido 1:20 por 24 h, com o aumento de temperatura (70, 80, 90, 100 e 110) °C, Zhang e colaboradores (2016) observaram o aumento da remoção da lignina (18,1; 31,1; 42,7; 65,8 e 95,5% respectivamente). Os autores notaram também que com o aumento da temperatura os resíduos recuperados diminuíram, de 69,7% a 70 °C para 47,0% a 110 °C. O maior rendimento de glicose (79,7%) após a hidrólise enzimática foi obtido com o pré-tratado a 90 °C. Outro trabalho estudou o efeito da temperatura no pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar, aplicando o DES formado por cloreto de colina e ácido láctico (1:2), razão sólido-líquido 1:10 por 3 h, as temperaturas empregadas foram (90, 100, 110, 120 e 130) °C (JI et al., 2021). Neste trabalho, os autores observaram que com o aumento de temperatura de 90 °C para 130 °C, os teores de hemicelulose e lignina diminuíram de 17,65 e 13,40% para 8,33 e 7,16% e que a taxa de recuperação de sólidos reduziu de 79,21 para 47,82%, respectivamente.

Com base na literatura, o aumento da temperatura do processo leva a maiores taxas de remoção de lignina e hemicelulose. Por outro lado, a taxa de recuperação de celulose diminui, e a conversão dos polissacarídeos também pode ser influenciado negativamente. Segundo XU et al. (2020), pré-tratamentos com temperaturas mais baixas tiveram benefícios como menor produção de inibidores, menor custo de processo e maior sustentabilidade.

O parâmetro tempo de pré-tratamento variou, em diferentes trabalhos, de 0,5 h a 36 h (ZHANG et al., 2016; XU et al., 2020). O período mais longo de pré-tratamento promove uma melhor remoção da lignina e melhora o intumescimento das fibras de celulose pelo solvente. Em contrapartida a taxa de recuperação de sólidos diminui devido a degradação e solubilização dos carboidratos. Além disso, na escolha do período de pré-tratamento, tem que ser considerado o consumo de energia e a redução de produtividade no processo. No pré-tratamento da espiga de milho (ZHANG et al., 2016), os autores variaram o tempo de pré-tratamento de 1,5 h a 36 h. Com o prolongamento do tempo de pré-tratamento de 1,5 h para

36 h, a extração da lignina aumentou significativamente, assim como a eficiência da hidrólise enzimática. Entretanto, quando o tempo de tratamento foi maior do que 24 h, o aumento da eficiência da hidrólise foi pequeno. Por isso, 24 h foi considerado o tempo ideal para os autores. O efeito do tempo no pré-tratamento e eficiência de hidrólise também foi investigado para a palha de trigo, utilizando o DES formado por cloreto de trietilbenzil amônio e ácido láctico (1:9) com razão sólido líquido de 1:5 e temperatura 373 K (LIU et al., 2019). Foram testados vários tempos de reação, (2, 4, 6, 8, 10 e 12) h. E os autores concluíram que a recuperação de sólidos diminui gradualmente com o aumento do tempo, chegando a 48,7 % em 12 horas de pré-tratamento. A remoção de lignina aumentou de 48,76 % em 2 h de pré-tratamento para 73,71 % em 12 h. Assim como a perda de xilana, que aumentou de 43,44 % para 78,37 %. Quanto à hidrólise enzimática, eles observaram que o melhor tempo foi de 10 h, em que o rendimento de glicose foi de 66,32 %, comparado a 25,82 % da palha não tratada e 60,12 % do pré-tratado de 12 h. Liu et al. (2020) relacionam a baixa digestibilidade da biomassa não tratada e consequente aumento desta com o pré-tratamento à presença de lignina na biomassa in natura e ao efeito de revestimento de xilano na parede celular.

A razão líquido/sólido foi um parâmetro importante no fracionamento da biomassa. A quantidade de solvente é um fator importante pois o solvente age se infiltrando na estrutura de rede da biomassa e reagindo com os componentes. As proporções mássicas comuns de sólido para líquido variam de 1:5 a 1:32, podendo chegar a proporções menores de sólido dependendo da situação (XU et al., 2020). No pré-tratamento do sabugo de milho com DES formado por cloreto de colina e etanolamina (1:6), com os outros parâmetros do processo fixos em 50 °C e 12 horas de pré-tratamento, as razões mássicas líquido/sólido estudadas foram 10:1, 15:1, 20:1, 25:1 e 30:1 (JING et al., 2022). Observou-se o incremento da liberação de açúcares redutores (54 g/L) com o aumento da razão líquido/sólido até a razão 25:1. Além disso, houve um salto entre os pré-tratados de 15:1 e 20:1 com valores de aproximadamente 37 g/L para 50 g/L, respectivamente. A razão líquido/sólido de 25:1 também promoveu a maior remoção de lignina da biomassa. Segundo os autores, a transferência de massa entre o sabugo de milho e o DES aumentou devido ao melhor grau de impregnação do solvente na biomassa, levando a quebra da ligação éter da lignina e da ligação éster entre lignina e hemicelulose.

Portanto, com uma baixa razão líquido/sólido, a biomassa pode não ser totalmente saturada pelo solvente e com isso a lignina e a hemicelulose podem não ser dissolvidas e removidas. Por outro lado, com o aumento da quantidade relativa de solvente, a remoção da lignina e hemicelulose aumentam, causando a princípio um aumento do teor de celulose nos

sólidos recuperados. O excesso de solvente pode levar a degradação da celulose, além dos problemas industriais relacionados como superdimensionamento de equipamentos, sistema de recuperação de solvente mais complexo e maior consumo de energia (XU et al., 2020).

1.6 Hidrólise enzimática

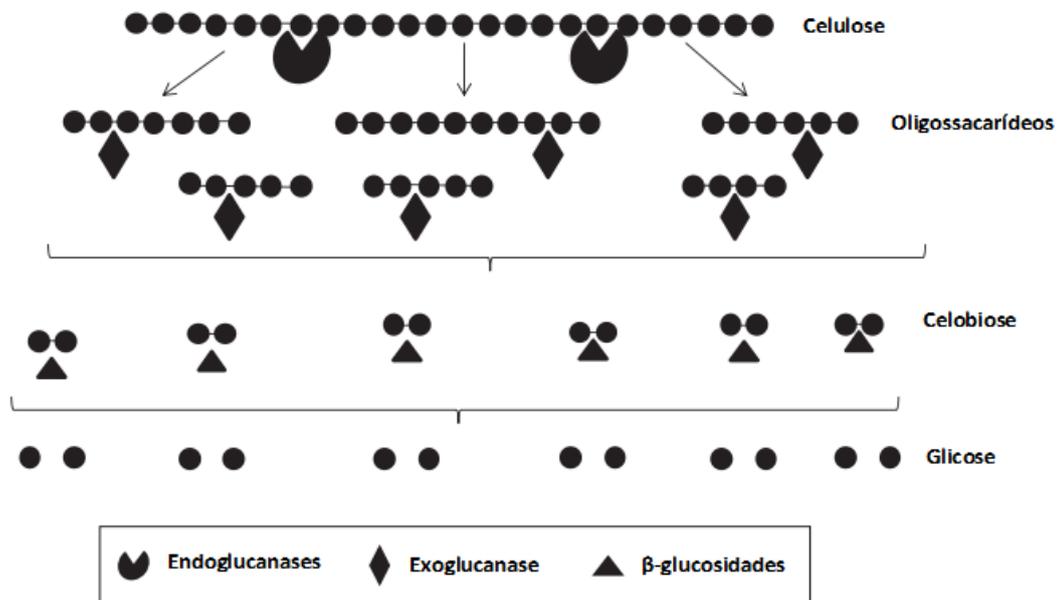
Após o pré-tratamento o material lignocelulósico é hidrolisado em açúcares redutores, principalmente a glicose, mediante a ação de enzimas celulolíticas. A glicose proveniente da hidrólise da celulose pode ser convertida em etanol e outras substâncias de valor agregado. Muitos fatores podem influenciar nessa hidrólise, como: a presença de inibidores, presença de lignina, volume da área superficial/poros da fibra de celulose, tamanho de partícula, grau de cristalinidade e de polimerização da celulose (TURA, 2014). As enzimas celulolíticas são as principais enzimas responsáveis por essa hidrólise.

1.6.1 Celulases

A celulose da biomassa é hidrolisada enzimaticamente pelas celulases. As celulases são hidrolases que clivam ligações o-glicosídicas, logo elas pertencem à família das glicosil hidrolases (E.C 3.2.1.-) (GOMIDE, 2019). Diversos fungos e bactérias podem produzir celulases por meio de fermentação, porém os fungos possuem maior capacidade de secreção e produzem um sistema de celulases mais completo de enzimas do que as bactérias (YOON et al., 2014). As celulases com origem fúngica normalmente apresentam pH ótimo entre 4 e 5 e temperatura ótima entre 40 e 60 °C (CASTRO; PEREIRA JR, 2010) e as comerciais são geralmente produzidas a partir de *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger* por fermentação submersa (YOON et al., 2014).

As enzimas celulolíticas podem ser classificadas em três grupos de acordo o grau de despolimerização dos seus substratos (Figura 14): As endoglucanases (EnG), as exoglucanases (ExG) e as β -glucosidases (BG) e elas atuam de forma sinérgica, ou seja, quando atuam juntas o rendimento é maior do que seus rendimentos individuais (CASTRO; PEREIRA JR, 2010; SIQUEIRA, et al., 2020).

Figura 14 -Mecanismo de ação das celulases



Fonte: Adaptado de BINOD, 2011

As endoglucanases (E.C 3.2.1.4) possuem como nome sistemático, segundo a IUBMB – International Union of Biochemistry and Molecular Biology, 1,4- β -D-glucana-4-glucanohidrolase, mas também podem ser referenciadas na literatura como endo-1,4- β -D-glucanases, β -1,4-glucanases, β -1,4-endoglucana hidrolases, alcali cellulases, celodextrinases e avicelases. Essas enzimas são responsáveis por iniciar a hidrólise atacando de forma aleatória as regiões amorfas e solúveis do substrato celulósico, quebrando as ligações glicosídicas β -1,4, gerando oligômeros de tamanhos variados e assim novos terminais (redutores e não redutores) (CASTRO; PEREIRA JR 2010; SIQUEIRA, et al., 2020). A endoglucanase é a enzima responsável pela rápida solubilização do polímero e redução do grau de polimerização. Quando atuam em oligoglicosídeos, a taxa de hidrólise aumenta com o grau de polimerização e liberam celobioses e celotriosos (SAINI; SAINI; TEEARI; 2015).

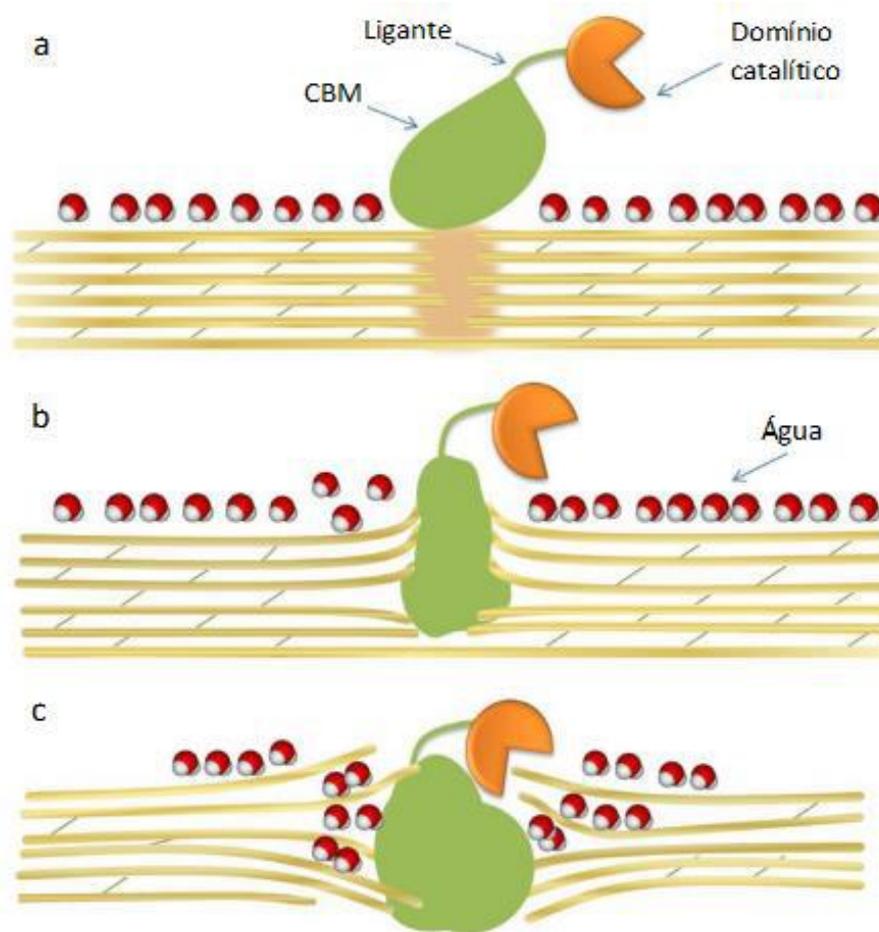
O grupo das exoglucanases é constituído por celobiohidrolase (CBH) e glucanohidrolase (GH). A celobiohidrolase (1,4- β -D-glucana-celobio-hidrolase, EC 3.2.1.91) cliva as ligações β -1,4 dos oligômeros liberando celobiose da extremidade da cadeia e a glucanohidrolase (1,4- β -D-glucanaglucano-hidrolase, EC 3.2.1.74) libera unidades de glicose das extremidades não redutoras dos oligômeros (SINGH et al, 2019, SIQUEIRA et al., 2020). Segundo CASTRO e PEREIRA JR, 2010, as celobiohidrolase podem ser divididas em CBH I

e CBH II. As CBH I hidrolisam os oligômeros nos terminais redutores e as CBH II hidrolisam os terminais não redutores.

Por fim, as β -glicosidases (β -glicosídeo gluco-hidrolase, EC 3.2.1.21) hidrolisam a celobiose liberando glicose, elas também conseguem hidrolisar pequenos β -1,4-oligoglicosídeos em glicose e ao contrário das endoglucanases a taxa de hidrólise diminui com o aumento do grau de polimerização (SAINI; SAINI; TEEARI; 2015). Assim como a celobiohidrolases, as β -glicosidases geralmente apresentam inibição pelos seus produtos (CASTRO; PEREIRA JR 2010).

Algumas enzimas que hidrolisam carboidratos, como celulasas, possuem um domínio catalítico, o domínio glicopeptídico de ligação à celulose (*carbohydrate-binding module*, CBM) e o peptídeo de ligação. Estudos propõem que as enzimas são adsorvidas nos defeitos estruturais da celulose, como representado na Figura 15a, e em seguida elas penetram nos espaços interfibrilares (Figura 15b), causando o inchaço da estrutura celulósica e acomodando cada vez mais água dentro do espaço capilar, que quebra as ligações de hidrogênio entre as cadeias de celulose (Figura 15c) (ARANTES; SADDLER, 2010).

Figura 15-Representação esquemática da amorfogênese das fibras de celulose causada pelo domínio glicopeptídico de ligação à celulose (CBM) da celobiohidrolase I (CHB I).



Legenda: Representação esquemática da amorfogênese das fibras de celulose causada pela CBM da celobiohidrolase I (CHB I). Primeiramente ocorre a adsorção do CBM nas microfaturas da celulose (a), seguida da penetração do CBM no espaço interfibras (b), por último a penetração das moléculas de água, quebrando das ligações de hidrogênio (c).

Fonte: Adaptado de ARANTES; SADDLER, 2010.

A CBH I, junto à outras proteínas auxiliares, como expansinas, tipo-expansinas e swolleinas, são responsáveis pela amorfogênese, estágio inicial da sacarificação da celulose, que envolve a ruptura física do substrato, ou seja, o rompimento de forma não hidrolítica do empacotamento da rede de fibrilas de celulose. A amorfogênese promove aumentos na taxa de hidrólise da celulose, por tornar amorfas as regiões cristalinas do polímero, aumentando a acessibilidade da celulose às celulasas (CASTRO; PEREIRA JR, 2010; ARANTES; SADDLER, 2010).

As celulasas apresentam alto custo, sendo uma barreira econômica para a produção do etanol 2G. Com o objetivo de reduzir custos, uma alternativa é a produção das enzimas

celulolíticas por cultivo em estado sólido (LEITE et al., 2021; SALDARRIAGA-HERNÁNDEZ et al., 2020).

1.7 Cultivo em estado sólido (CES)

Diferente do cultivo submerso (CSm), em que meio de cultivo é um caldo nutritivo dissolvido no líquido, o CES é caracterizado pela ausência ou quase ausência de água livre. Neste processo, os microrganismos crescem em substratos sólidos que atuam como suporte e fonte de nutriente. No entanto, o meio deve possuir água suficiente para o permitir o crescimento e a atividade metabólica do microrganismo (VELOSO, 2018). Múltiplos termos são utilizados na literatura em referência a cultivo em estado sólido, p.ex.: fermentação em estado sólido, fermentação em meio sólido, processo em estado sólido, fermentação de sólidos úmidos, fermentação semi-sólida, cultivo semi-sólido, cultura de superfície, fermentação “koji”, entre outros.

O CES é utilizado há muito tempo na indústria alimentícia para o preparo de alimentos, principalmente em alguns países orientais. O CES imita o crescimento de microrganismos na natureza em sólidos úmidos e é considerado responsável pelo início das técnicas fermentativas na antiguidade. O processo koji, ou seja, o cultivo de arroz por *Aspergillus oryzae*, e a produção de queijo com *Penicillium roqueforti* são exemplos clássicos de CES. O interesse pelo CES é devido a suas vantagens como: maior rendimento do produto, tecnologia econômica e possibilidade de utilizar resíduos agroindustriais como matriz sólida. Muitos produtos podem ser obtidos pelo CES, como antibióticos, enzimas, ácidos orgânicos, biocombustíveis etc. (COSTA et al., 2018; WANG; YANG., 2007;).

Muitas características únicas do CES podem oferecer vantagens sobre a CSm, principalmente quando o microrganismo cultivado são fungos filamentosos. A ausência ou quase ausência de água livre, intrínseco do CES, inibe a presença de contaminantes, reduz o custo de purificação do produto e tratamento de efluente. Por causa da simulação do ambiente natural do microrganismo, a expressão genética deste pode ser mais completa, alguns produtos só podem ser produzidos por CES ou são produzidos em taxas mais altas neste tipo de fermentação. A alta área de superfície interfacial em relação ao volume do líquido proporciona uma boa aeração do meio. E a simplicidade do meio, formado por uma matriz

sólida, como grãos ou farelos com pouca ou nenhuma suplementação de nutrientes, que pode consistir em resíduos da agroindústria (WANG; YANG., 2007).

A viabilidade do CES depende de vários fatores como a seleção do microrganismo, do substrato e dos parâmetros físico-químicos do processo, como, temperatura, umidade, pH, aeração, tamanho das partículas de substrato e das propriedades do leito. A viabilidade econômica do CES também depende da purificação dos produtos desejados, que têm sido um desafio para esta tecnologia (COSTA et al., 2018). O desenvolvimento do CES em escala industrial ainda apresenta problemas como limitações de transferência de massa e calor, matéria prima sólida e falta de dados cinéticos e de projeto (WANG; YANG., 2007).

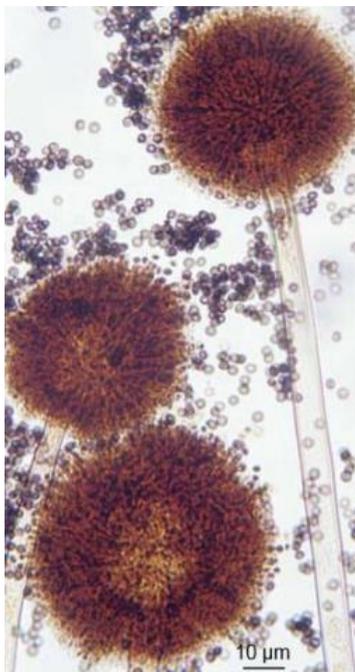
Como já mencionado, a utilização de resíduos como substratos oferece a possibilidade de reduzir os custos de produção das enzimas lignocelulolíticas, uma vez que os custos das matérias-primas representam um terço dos custos de produção das enzimas (LEITE et al., 2021). Mas além da redução dos custos, a reutilização de resíduos para produzir compostos de valor agregado contribui para reduzir os efeitos negativos do descarte deste material, contribuindo para a implementação da economia circular (LEITE et al., 2021).

Sabe-se que fungos filamentosos são bons produtores de enzimas celulolíticas, pois produzem um sistema de celulases mais completo e por possuírem maior capacidade de secreção (LEITE et al., 2021; YOON et al., 2014). Segundo Rodríguez-Zúñiga et al. (2011), o fungo filamentoso *Aspergillus* é o melhor produtor de exo e endoglicosidades, e é reconhecido pelas elevadas concentrações de β -glicosidases.

3.6.1. *Aspergillus niger*

Segundo a classificação taxonômica, *Aspergillus niger* pertence ao reino Fungi, filo Ascomycota, classe Eurotiomycetes, ordem Eurotiales, família Richiomaceae, gênero *Aspergillus*, subgênero *Circumdati*, seção *Nigri*, com base na Species Fungorum, 2014 (AFONSO, 2015). O *A. niger* é um dos fungos mais comuns do gênero e é capaz de se propagar de forma eficaz em diferentes ambientes, podendo se desenvolver em meios líquidos e sólidos. Morfologicamente, este fungo é caracterizado por possuir conídios castanhos ou pretos, globosos e rugosos (Figura 16). Possuem também vesículas castanho-escuras a pretas, globulosas e radiadas e com fiálides bisseriadas, isto é, métulas e fiálides (AFONSO, 2015; COSTA, 2011).

Figura 16- *Aspergillus niger* no microscópio.



Fonte: AFONSO, 2015

A. niger possui requisitos importantes para ser utilizado na produção comercial de enzimas, como ser de fácil recuperação, ser capaz de utilizar uma grande variedade de matérias-primas, apresentar alta velocidade de produção de enzimas e produzir enzimas estáveis a variações de temperatura e pH (COSTA, 2011). Além disso, muitas enzimas de *A. niger* já são consideradas “GRAS” (do inglês Generally Recognized as Safe, geralmente reconhecido como um produto seguro) pela FDA (Food and Drug Administration) (SCHUSTER et al., 2002).

A temperatura ótima de crescimento de *A. niger* é 35-37°C, entretanto o fungo pode multiplicar-se dentro de uma grande faixa de temperaturas (entre os 6°C e os 47°C). O pH ótimo de crescimento é 6, mas também é encontrado em valores de pH entre 1.5 e 9.8. A atividade ótima da água para essa espécie é de 0.97 e a percentagem de umidade relativa ótima de crescimento está compreendida entre os 96 – 98% (AFONSO, 2015).

Na literatura são reportados alguns estudos de produção de celulases pelo fungo filamentosso *Aspergillus niger*. Rodríguez-Zúñiga et al. (2011) avaliaram a produção enzimática de celulases por *A. niger* por cultivo em estado sólido. Utilizando farelo de trigo como matéria-prima, com 50 % de umidade, os autores obtiveram a máxima atividade de celulases totais, 0,4 UI/g com 72 h de cultivo fermentação.

SANTOS et al. (2013) investigaram diferentes resíduos na produção de enzimas celulolíticas por cultivo em estado sólido, na produção de celulasas totais destacou-se o resíduo de seriguela, que com 50 % de umidade e 72 h de fermentação, resultou na atividade FPásica máxima de 11,62 U/mL.

2 METODOLOGIA

2.1 Diagrama de blocos

Para uma melhor compreensão do que foi realizado neste trabalho, é a apresentado na Figura 17 um diagrama de blocos simplificado com as principais etapas do processo.

Figura 17- Diagrama de blocos da obtenção de açúcares fermentáveis



Fonte: O autor, 2023.

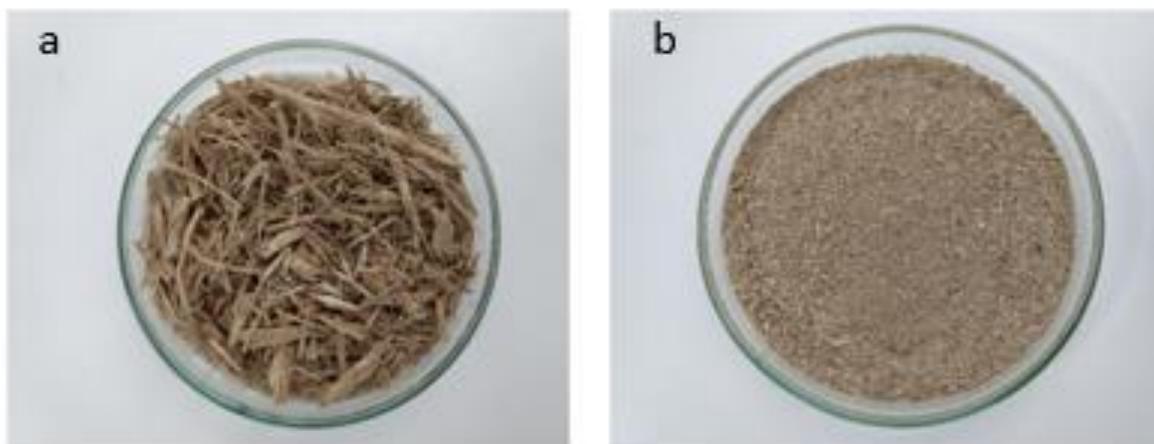
2.2 Matérias primas

2.2.1 Bagaço de cana-de-açúcar.

Para o desenvolvimento do presente trabalho, foi utilizado o bagaço de cana-de-açúcar cedido pela usina Canabrava (Campos dos Goytacazes - RJ -Brasil).

O bagaço de cana-de-açúcar foi seco a 60 °C em estufa com circulação e renovação de ar (SOLAB, Modelo: SL 102) até umidade inferior a 10 %. Esta etapa foi realizada para evitar contaminação por fungos (BETANCOUR, 2010). Em seguida, o bagaço foi moído com moinho de facas tipo Willey (SOLAB, SL-32), selecionado por uma peneira de 30 mesh e armazenado a 5 °C. Na Figura 18 são apresentados o bagaço de cana seco (a) e bagaço de cana cominuído.

Figura 18- Bagaço de cana-de-açúcar seco (a) e bagaço de cana-de-açúcar cominuído (b).



Fonte: O autor, 2022.

2.3 Determinação da composição do bagaço de cana

A composição da biomassa foi determinada de acordo com protocolos do Laboratório Nacional de Energia Renovável dos Estados Unidos (NREL-National Renewable Energy Laboratory).

2.3.1 Umidade e sólidos totais

A umidade da biomassa de bagaço de cana-de-açúcar foi calculada pela diferença de massa entre o bagaço úmido (umidade inferior a 10%, obtido no preparo da biomassa) e o bagaço seco em estufa (Marconi, modelo MA 033) até peso constante. Para isso, cadinhos de porcelana foram secos em estufa a 105 °C por 4 h, deixados resfriar em dessecador até temperatura ambiente e pesados em balança analítica (Marte, Modelo: AY220). Em seguida, 2 g de biomassa foram pesados dentro dos cadinhos e levados à estufa a 105 °C por pelo menos 12 h. Após serem resfriados em dessecador até temperatura ambiente, os cadinhos com a biomassa foram pesados. A determinação dos sólidos totais foi realizada em triplicata. A porcentagem de sólidos totais foi calculada como indicado na Equação 1:

$$\text{Sólidos totais (\%)} = \frac{\text{massa}_{\text{cadinho com bagaço seco}} - \text{massa}_{\text{cadinho}}}{\text{massa}_{\text{cadinho úmido}}} \times 100 \quad (1)$$

2.3.2 Determinação das cinzas totais

Para a determinação das cinzas totais do bagaço, cadinhos de porcelana foram à mufla (Fornos Magnus) por pelo menos 4 h a 575° C, esfriaram até temperatura ambiente em dessecador e foram pesados. Em seguida, 1 g de biomassa foi adicionado aos cadinhos, que foram levados à mufla a 575 °C por pelo menos 24 h. Estes esfriaram em dessecador até temperatura ambiente e foram pesados. O teor de cinzas foi determinado em triplicata e foi calculado usando a Equação 2 (SLUITER et al., 2008):

$$\text{Cinzas (\%)} = \frac{\text{massa}_{\text{cadinho com as cinzas}} - \text{massa}_{\text{cadinho}}}{\text{massa}_{\text{bagaço seco}}} \times 100 \quad (2)$$

2.3.3 Determinação de extrativos

A determinação dos extrativos foi realizada com aparelhos de Soxhlet (Figura 19). Quatro cartuchos de celulose foram secos em estufa, esfriados em dessecador e pesados. Em seguida, 2,5 g de biomassa foram adicionados a cada cartucho e estes foram colocados dentro dos aparelhos de extração. Primeiramente realizou-se a extração com água por 6 h. O volume de 190 ml de água destilada foi adicionado aos balões de fundo redondo de 500 ml. As mantas de aquecimento (Even) foram ajustadas de modo que a extração tivesse aproximadamente 5 ciclos de sifão por hora. Após as 6 horas de extração com água, as mantas foram desligadas e realizou-se a mudança do solvente de água para etanol. Então os balões foram enchidos com 190 mL de etanol 95 % P.A (Shynth[®]) e a extração continuou por 16 h. As mantas de aquecimento foram ajustadas para manter de 6 a 10 ciclos por hora.

Figura 19 - Extração com Soxhlet



Fonte: O autor, 2022.

Após a extração, duas amostras foram levadas à estufa a 105 °C por pelo menos 12 h, foram resfriadas em dessecador e pesadas. A umidade do bagaço foi realizada contemporaneamente a esta etapa pois a umidade do bagaço pode variar em contato com o ar e causar erros na determinação dos extrativos. Os extrativos foram calculados com a Equação 3:

$$\text{Extrativos (\%)} = \frac{\text{massa}_{\text{cadinho com o bagaço sem extrativo}} - \text{massa}_{\text{cadinho}}}{\text{massa}_{\text{bagaço seco}}} \times 100 \quad (3)$$

As outras duas amostras de bagaço sem extrativos foram utilizadas na determinação de carboidratos e lignina. Essas últimas amostras foram secas em estufa de circulação de ar a 40 °C por 24 h.

2.3.4 Determinação do teor de lignina solúvel e lignina insolúvel.

O teor de lignina e carboidratos estruturais foi determinado de acordo com Sluiter et al., 2012. Para isso, funis de Buchner com porosidade média foram levados a mufla por 4 h a 575 °C, resfriados e pesados. Em um Erlenmeyer com junta esmerilhada, foi pesado em balança analítica (Marte, Modelo: AY220) 0,3000 g +- 0,0001 g de bagaço. Em seguida foram adicionados 3 ml de ácido sulfúrico 72 % (m/m). Esse sistema ficou durante 1 h em banho maria a 30 °C (TECNAL, modelo TE-054 MAG), sendo homogeneizado manualmente frequentemente com bastão para que a biomassa ficasse igualmente em contato com o ácido. Em seguida foram adicionados 84,00 ml de água para que o ácido fosse diluído a 4 % (m/m) e o sistema foi autoclavado por 1 h a 1atm.

Devido à degradação dos açúcares durante a etapa de hidrólise na autoclave, foi preparada uma solução padrão de açúcares de composição 3,0 g/L de glicose (Sigma-Aldrich®), 2,0 g/L de xilose (ISO FAR®), 1,0 g/L de arabinose (INLAB®) e 1,0 g/L galactose (Sigma-Aldrich®), composição similar àquela liberada do bagaço nesse processo, e 10 ml dessa solução também foi levada à autoclave junto às amostras de bagaço, para contabilizar a porcentagem de recuperação de açúcares após essa etapa.

Após a hidrólise ácida do bagaço de cana, o hidrolisado foi filtrado no funil de Buchner. O filtrado foi reservado para a determinação de lignina solúvel em ácido e de carboidratos. A parte sólida, retida no filtro, foi seca em estufa a 105 °C durante a noite, pesada e levada à mufla a 575 °C por 24 h para determinação de cinzas e lignina insolúvel.

A lignina solúvel em ácido (LSA) foi determinada em espectrofotômetro UV-Visível (Biospectro SP-220), em menos de 6 h após a hidrólise do bagaço. Água destilada foi usada como branco do espectrofotômetro e para diluir as amostras até que a absorbância destas

estivesse na faixa de 0,7 a 1 no comprimento de onda 240 nm. O teor de lignina solúvel foi calculado como indicado na Equação 4:

$$LSA (\%) = \frac{\text{Absorbância} \times \text{volume de filtrado} \times \text{diluição}}{\varepsilon \times \text{massa}_{\text{bagaço seco}} \times \text{comprimento óptico}} \times 100 \quad (4)$$

Sendo ε a absorvidade do bagaço de cana-de-açúcar no comprimento de onda utilizado, que é igual a 25 L/g.cm.

O teor de lignina insolúvel é calculado como indicado a Equação 5:

$$LIA (\%) = \frac{\text{Massa do resíduo sólido no filtro} - \text{Massa das cinzas no filtro}}{\text{massa de bagaço adicionado (em base seca)}} \quad (5)$$

2.3.5 Determinação dos teores de celulose e hemicelulose por cromatografia líquida de alta eficiência.

Parte do filtrado proveniente da hidrólise ácida (Item 2.3.4) foi neutralizado com CaCO_3 , filtrada por filtros com 0,2 μm de poro e analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para determinar as concentrações dos açúcares monoméricos.

Essas análises foram realizadas em cromatógrafo ‘Waters’ (sistema de bombeamento modelo 1515, injetor modelo 2707, detector de diferencial de refração -DIR- modelo 2414) acoplado a uma coluna Hi-plex H Agilent, 300x7.7mm. A fase móvel utilizada foi aquosa com 5mM de H_2SO_4 em um fluxo de 0,6 mL/min e a temperatura do forno da coluna foi de 60 °C.

As concentrações em % (m/m) de celulose e hemicelulose foram calculadas conforme as equações 6 e 7:

$$\text{Celulose} \left(\% \frac{m}{m} \right) = \left(\frac{0,9}{R} \right) \times C_{\text{glicose}} \times \left(\frac{V}{m} \right) \times 100 \quad (6)$$

Em que,

0,90 = Coeficiente que resulta da relação entre a massa molecular do polímero e do monômero de glicose;

R(açúcar)= recuperação de açúcar hidrolisado (concentração detectada pelo HPLC/concentração conhecida de açúcares antes da hidrólise-padrão de açúcares do item 2.3.4)

C1 = Concentração de glicose (g/L)

v = Volume total de hidrolisado – 0,08673 L

m = massa da amostra seca (g)

$$\text{Hemicelulose} \left(\% \frac{m}{m} \right) = \left(\frac{0,88}{R} \right) \times C_{xilose} \times \left(\frac{V}{m} \right) \times 100 \quad (7)$$

Em que,

0,88 = Coeficiente que resulta da relação entre a massa molecular do polímero e do monômero de xilose

R(açúcar)= recuperação de açúcar hidrolisado (concentração detectada pelo HPLC/concentração conhecida de açúcares antes da hidrólise-padrão de açúcares do item 2.3.4)

C1 = Concentração de glicose (g/L)

C2 = Concentração de açúcares redutores (g/L)

v = Volume total da solução de açúcar (L)

m = massa da amostra seca (g)

2.4 Microrganismo

Para a produção do extrato enzimático celulolítico foi utilizado *Aspergillus niger* 11T53A14 cedido pela Embrapa (RJ). *A. niger* foi mantido, ativado e propagado de acordo com Couri e Farias (1995).

2.5 Estocagem e ativação do fungo *Aspergillus niger* 11T53A14

Os conídios de *A. niger* foram estocados a - 4 °C em solo estéril. Os fungos foram ativados e mantidos em meio básico denominado SOCAREAN descrito por Couri e Farias (1995). Para o preparo do meio básico, cuja composição está indicada na Tabela 4, os reagentes foram pesados em balança analítica (Mettler Toledo, modelo AL204) e dissolvidos individualmente, exceto o ágar-ágar. Os reagentes dissolvidos foram transferidos analiticamente para um *erlenmeyer* contendo a massa de ágar, e o restante da água foi adicionada aquecendo a solução em manta de aquecimento para completa solubilização. O pH foi ajustado entre 5-6 com ácido clorídrico 2N. Em seguida, aproximadamente 12 ml de meio foram transferidos para cada tubos de ensaio. Rolhas de algodão cardado e gaze foram usadas para fechar os tubos. Os tubos contendo o meio foram esterilizados em autoclave (PHOENIX) a 0,5 atm por 15 minutos e posteriormente inclinados para a formação da gelose inclinada. O repique foi realizado com auxílio de uma alça de níquel cromo estéril, em fluxo laminar. Em seguida os tubos foram incubados em incubadora (B.O.D 411D) por 7 dias a 32 °C. Para a ativação do fungo foram realizados repiques sucessivos.

Tabela 4 - Composição do meio básico SOCAREAN.

Reagente	Concentração (g/L)
Cloreto de Potássio (KCl) (ISO FAR [®])	0,50
Fosfato dibásico de potássio (K ₂ HPO ₄) (ISO FAR [®])	1,00
Nitrato de sódio (NaNO ₃) (ISO FAR [®])	3,00
Sulfato de ferro (FeSO ₄ .7H ₂ O) (MERCK [®])	0,01
Sulfato de Magnésio (MgSO ₄ .7H ₂ O) (ISO FAR [®])	0,50
Ágar-ágar (ISO FAR [®])	18,00
Glicose (SYNTH)	20,00

Fonte: COURI; FARIAS, 1995

2.6 Obtenção do inóculo

2.6.1 Preparo do meio de sabugo de milho

Para propagação dos conídios foi utilizado o meio de sabugo de milho de acordo com a metodologia descrita por Gomes (1995). O meio é composto por sabugo de milho cominuído e uma solução nutriente cujo preparo é descrito a seguir. A solução nutriente foi preparada seguindo três etapas: Primeiramente foram preparados 100 mL de solução A contendo fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) (Reagen[®]) 200 g/L. Em seguida foram preparados 100 mL de uma solução B, com a seguinte composição: sulfato de zinco ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Vetec[®]) 39,6 g/L, sulfato de ferro (FeSO_4) (MERCK[®]) 46 g/L, sulfato de manganês ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 0,1g/L e 0,5 mL de ácido sulfúrico (95-97%). Por último foram preparados 50 mL de uma solução C, contendo: 56 g/L de peptona de carne, 1 gota de ácido clorídrico (HCl) 2N (Vetec[®]), 0,19 mL da solução A e 0,025mL da solução B. O meio foi preparado em erlenmeyer de 125 mL, onde foram adicionados 4,6 g de sabugo de milho e 6 mL da solução nutriente C. O meio foi homogeneizado e esterilizados em autoclave a 1 atm por 1 h.

2.6.2 Produção de conídios e preparo do inóculo

A um tubo de ensaio contendo *A.niger* ativado em gelose inclinada (item 2.5) foram adicionados 10 ml de solução Tween 80 (0,3% v/v). Com o auxílio de uma alça de níquel-cromo os conídios foram desprendidos da gelose inclinada e transferidos para um béquer. A suspensão foi homogeneizada e 1 ml desta foi adicionado ao *erlenmeyer* contendo o meio de sabugo de milho (item 2.6.1). O meio inoculado foi manualmente homogeneizado e incubado em estufa (B.O.D 411D) a 32°C por 5 dias.

Após o quinto dia de incubação, uma nova suspensão de esporos foi preparada, adicionando 20 mL de solução 0,3% (v/v) de Tween 80 ao meio de sabugo de milho rico em conídios. A mistura foi homogeneizada e filtrada em gaze estéril para a obtenção da

suspensão de conídios. A suspensão de conídios foi diluída de 1:100 para a contagem do número de conídios/ mL na câmara de Neubauer em microscópio (Nikon Eclipse, modelo E100). O volume de inóculo a ser empregado no CES foi calculado para obter-se uma concentração final de 10^7 conídios/mL de meio. O preparo das suspensões de esporos assim como as inoculações dos meios de cultura foram realizados em capela de fluxo laminar (BioGreen) e todos os materiais utilizados foram previamente esterilizados, em autoclave, por 15 minutos a 1 atm.

2.7 Cultivo em estado sólido (CES) para a produção de celulases.

O meio utilizado para o CES foi farelo de trigo (Arma Zen[®]). Em frascos *erlenmeyers* de 500 mL, foram adicionados 50 g de farelo de trigo (base seca). Água destilada, o farelo de trigo e todo material necessário para a inoculação foram autoclavados por 15 minutos a 1 atm. Na capela de fluxo laminar, o farelo de trigo foi umedecido com a quantidade de água necessária para atingir 50 % de umidade, descontando o volume de inóculo a ser adicionado. O meio foi inoculado, homogeneizado vigorosamente e incubado em estufa (B.O.D 411D) a 32 °C por 72 h. O cultivo foi realizado em triplicata. A Figura 20 mostra o meio após 72 h de cultivo.

Após 72 horas de cultivo foi realizada a extração enzimática. Para isso, foram adicionados 250 mL de tampão citrato de sódio 0,05 M (pH 4,8) em cada *erlenmeyer*. A mistura foi homogeneizada vigorosamente e com bastão de vidro e foram posteriormente filtrados com auxílio de gaze estéril e espremedor. O extrato obtido foi centrifugado (HERMLE, modelo 2206A) por 15 minutos a 4000 rpm.

Figura 20- Produção de celulases por *A. niger* por cultivo em estado sólido utilizando farelo de trigo com 50% de umidade como meio de cultivo a 32 °C por 72 h.



Fonte: O autor, 2022.

2.8 Determinação da atividade de celulases totais (FPase)

A atividade de papel filtro foi determinada por espectrofotometria de acordo com a metodologia padrão descrita pela IUPAC (GHOSE, 1987). Em tubos de ensaio foram adicionados 1 mL de tampão citrato de sódio 0,05 M, pH 4,8 e 0,5 mL de extrato enzimático. Estes foram aclimatados a 50 °C em banho de água (QUIMIS, Banho Dubnoff microprocessado, modelo Q226M2) e em seguida foi adicionada uma tira de papel filtro Whatman N°1 de 1,0 x 6,0 cm (aproximadamente 50 mg) em cada tubo. Para o branco, o substrato (tira de papel de filtro) não foi adicionado, somente o tampão e o extrato enzimático. A partir da adição do substrato nas amostras, a reação ocorreu por 60 minutos a 50 °C, sem agitação. Ao final da reação, os açúcares liberados foram então dosados pelo método do DNS (item 2.9). Para isso, 3 mL de reagente de DNS (item 2.9.1) foram adicionados e os tubos foram incubados a 100 °C por 5 min. Em seguida, adicionou-se 20 mL de água e as soluções contidas nos tubos foram homogeneizadas por inversão. Por fim, as absorbâncias a 540 nm foram registradas em espectrofotômetro (HACH, modelo 5000). Cada análise foi realizada em triplicata.

As atividades foram expressas em unidades internacionais por mL de extrato enzimático (U.mL⁻¹). A atividade foi calculada a partir da Equação 8, que é utilizada para calcular o valor da atividade FPásica quando a quantidade de glicose liberada do papel filtro for menor do que 2 mg.

$$\text{FPU} = \text{mg glicose liberada} \times 0,185 \text{ unidade/mL} \quad (8)$$

O valor 0,185 é derivado de 1 mg de glicose, dividido por 0,18 μmol^{-1} (para converter a massa de glicose em mols), 0,5 mL (volume de enzima que produziu essa quantidade de glicose) e 60 minutos (tempo da reação), como na Equação 9:

$$1 \text{ mg de glicose} = \frac{1 \text{ mg}}{0,18 \mu\text{mol}^{-1} \times 0,5 \text{ ml} \times 60 \text{ min}} = 0,185 \text{ unidades/mL} \quad (9)$$

A partir do cálculo da atividade FPásica em U.L^{-1} , foi feito cálculo da atividade FPásica em U.g^{-1} a partir da equação 10:

$$A\left(\frac{\text{U}}{\text{g}}\right) = \frac{A\left(\frac{\text{U}}{\text{mL}}\right) \times V_{\text{tampão}}}{Q_{mf} - \frac{Q_{mf} \times U}{100}} \quad (10)$$

Em que:

$A_{(\text{U/g})}$ = atividade em U.g^{-1}

$A_{(\text{U/mL})}$ = atividade FPásica em U.mL^{-1}

Q_{mf} = quantidade de massa (g) usada no cultivo

$V_{\text{tampão}}$ = Volume de solução tampão usada extração

U = umidade inicial do meio de cultivo

2.9 Análise de açúcares redutores pelo método de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)

Os açúcares redutores foram determinados pelo método de DNS, segundo Miller (1959) com algumas modificações. Em tubos de follin-Wu adicionou-se 1 mL de tampão, 0,5 mL da amostra a ser analisada (assim como os padrões de glicose) e 3,0 mL do reagente de DNS. Posteriormente os tubos foram agitados e aquecidos (100°C) por 5,0 minutos em banho

de água. Em seguida, foram adicionados 20 mL de água aos tubos e as absorvâncias dos padrões e das amostras foram determinadas a 540 nm.

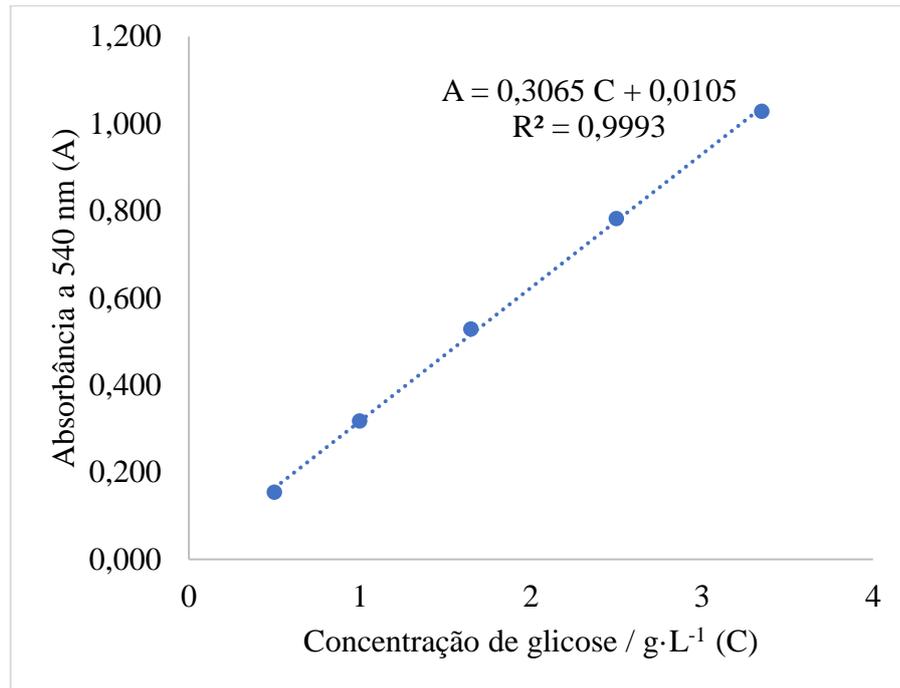
2.9.1 Preparo do reagente DNS

O reagente DNS foi preparado pela adição de 300 g de sal de Rochelle (tartarato duplo de sódio e potássio-ISO FAR[®]) em água destilada e pela adição de 10 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico (INLAB[®]) em uma solução aquosa contendo 16 g de hidróxido de sódio aquecida. Em seguida essas soluções foram aquecidas, misturadas e avolumadas a 1000 ml com água destilada.

2.9.2 Preparo da curva padrão método de DNS

A curva padrão de glicose foi preparada a partir de uma solução estoque de 10 mg/ml e diluída em diferentes concentrações (0,5; 1,0; 1,65; 2,5; 3,35 g/0,5mL) com tampão citrato de sódio 0,05 M, pH 4,8. A curva padrão com a equação da reta e o valor de R^2 são apresentados a Figura 21.

Figura 21- Curva padrão de glicose (método de DNS)



Fonte: O autor, 2022.

2.10 Análise de açúcares redutores pelo método de DNS em escala reduzida

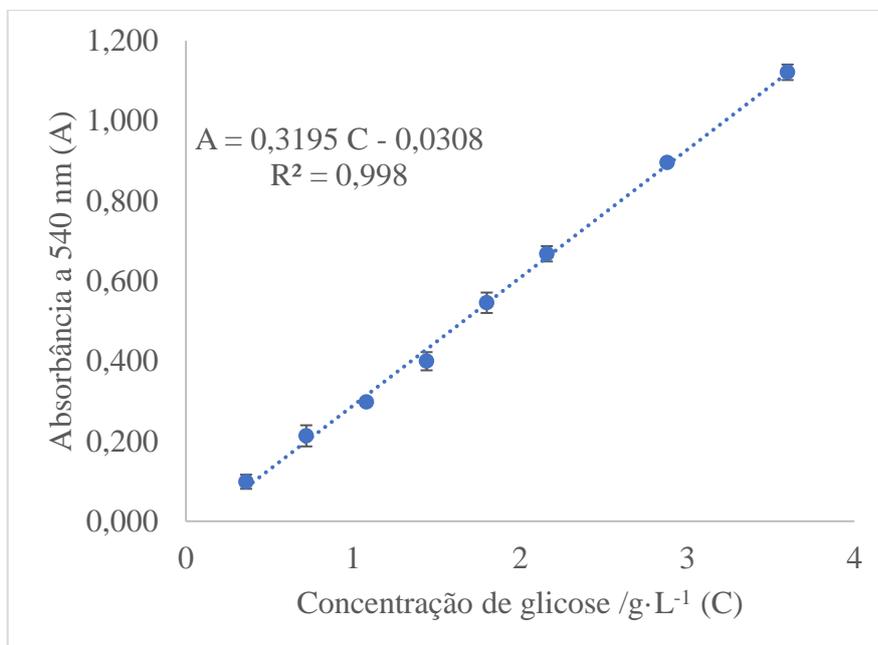
Para a determinação de açúcares redutores da hidrólise enzimática, o ensaio de DNS em escala reduzida utilizando microtubos de Eppendorff foi realizado de acordo com MAEDA, 2010. Em microtubos, adicionou-se 100 µL da amostra (ou padrão) a ser analisada. Adicionou-se, em seguida, 300 µL de reagente de DNS. Depois de homogeneizados, os tubos foram aquecidos (100° C) por 5,0 minutos em banho de água. Após este período, foram adicionados 1,5 mL de água aos tubos e as absorbâncias dos padrões foram determinadas a 540 nm.

2.10.1 Curva padrão de glicose Método de DNS em escala reduzida

A curva padrão de glicose foi preparada a partir de uma solução estoque de 3,6 g/L. A solução estoque foi diluída com água destilada em diferentes concentrações em tubos

Eppendorf. A curva padrão com a equação da reta e o valor de R^2 são apresentados na Figura 22.

Figura 22- Curva padrão de glicose (método de DNS em escala reduzida)



Fonte: O autor, 2022.

2.11 Preparo e propriedades físicas dos solventes eutéticos profundos (DES)

Para o preparo dos DES foram usados o cloreto de colina puro (êxodo científica[®]), comoceptor de ligação de hidrogênio (HBA) e como doadores de ligação de hidrogênio (HBD) foram usados o ácido láctico 85 % P.A. (NEON[®]) e glicerol P.A. (NEON[®]). Os reagentes foram pesados em balança técnica (SHIMADZU, Modelo BL3200H) e misturados em frascos reagentes de vidro com tampa, agitados em placa de agitação magnética (Ika color squid) a 500 rpm até um líquido homogêneo ser formado (Figura 23). Cloreto de colina (ChCl) foi misturado com o glicerol (gli) na proporção 1:2 e com o ácido láctico (AL) na proporção 1:5.

Os valores de densidade, viscosidade dinâmica e viscosidade cinemática desses solventes a 25 °C e a 80 °C foram obtidos através do viscosímetro dinâmico (Anton Paar, modelo SVM 4001).

Figura 23- Solvente eutético profundo, formado por cloreto de colina e ácido lático na proporção molar de 1:5.



Fonte: O autor, 2022

2.12 Efeito do DES na atividade enzimática.

Com a finalidade de investigar a adequação dos DES ao processo de conversão da biomassa em açúcares fermentescíveis, foi estudada a estabilidade da enzima na presença de uma baixa concentração dos DES formados por cloreto de colina como HBA e ácido lático e glicerol como HBD. A estabilidade das celulases nos DES foi determinada submetendo as celulases produzidas no laboratório ao contato com soluções tampão citrato de sódio 0,05M (pH 4,8) contendo 1% de cada DES a 30 °C na incubadora (B.O.D 411D) por 24 h. A atividade de celulases totais foi então medida para todas as amostras como descrito na sessão (4.4) e para o branco contendo somente o extrato enzimático e tampão. A metodologia realizada foi baseado nos trabalhos de SATLEWAL et al., 2019 e GUNNY et al., 2014. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

2.13 Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica com solventes eutéticos profundos

O pré-tratamento foi realizado em células encamisadas associadas a um banho termostático (Banho Ultratermostático - Quimis) sobre placas de agitação (Ika color squid) (Figura 24). Nas células, a biomassa lignocelulósica foi misturada ao solvente formado por cloreto de colina e ácido láctico na proporção molar (1:5), utilizando 0,05 g de sólido/mL de solvente, a 80 ° C, as condições escolhidas foram baseadas nos artigos de Satlewal et al. (2019) e Chourasia et al. (2021), o pré-tratamento foi realizado em diferentes tempos (3, 9, 12 e 15) h. Após o pré-tratamento, água destilada (150 mL) foi adicionada. O bagaço pré-tratado foi quantitativamente transferido para o funil de Buechner de vidro com placa porosa nº 3, para ser filtrado a vácuo. A etapa posterior a filtração a vácuo foi realizada através de dois procedimentos (A e B) diferentes. Procedimento A: lavagem com 50 mL de água destilada a 60 °C. Procedimento B: lavagem com 1,5 L de água destilada (a 60 °C) mais 300 mL de etanol 60 % (v/v). O bagaço foi então seco em estufa de circulação de ar a 40 °C por 24 h.

Figura 24 - Pré-tratamento do bagaço de cana-de açúcar com o solvente eutético formado por cloreto de colina e ácido láctico na proporção molar 1:5, utilizando 0,05 g de sólido /mL de solvente a 80° C.



Fonte: O autor, 2022.

2.14 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As análises de MEV foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura (LABMEV) do Programa de pós-graduação em química do instituto de química - UERJ. O equipamento utilizado foi o Microscópio Eletrônico de varredura, Marca: Jeol JSM-6510 LV com filamento de tungstênio. As amostras foram fixadas no porta-amostra com fita adesiva e foram recobertas com ouro para que pudessem ser analisadas.

2.15 Difração de Raios X (DRX)

As medidas de DRX foram realizadas no Laboratório de Raio X do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF). O equipamento utilizado é difratômetro Empyrean da empresa Panalytical. As medidas foram realizadas utilizando uma fonte de com alvo de cobre, gerando uma radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 0,15405$ nm), na geometria Bragg-Brentano com 2θ variando de 5° a 70° , e com passo angular de $0,003^\circ$.

O índice de cristalinidade (IC) foi determinado de acordo com método empírico de Segal (SEGAL et al., 1957) de altura de pico, usando a equação 11 (OLIVEIRA, 2020):

$$IC (\%) = \frac{(I_{200} - I_{am})}{I_{200}} \times 100 \quad (11)$$

IC = índice de cristalinidade.

I_{200} = pico mais intenso da celulose (situado entre os ângulos $22^\circ \leq 2\theta \leq 23^\circ$)

I_{am} = intensidade da região amorfa (situado entre os ângulos $18^\circ \leq 2\theta \leq 19^\circ$)

2.16 Análise de Espectroscopia de absorção no infravermelho (FT-IR)

As análises de FT-IR foram realizadas no Laboratório de Caracterização Instrumental do Programa de pós-graduação em química do instituto de química - UERJ. O equipamento

utilizado foi o Espectrômetro PerkinElmer FT-IR/FIR Frontier. E as condições de análise: método pastilha de KBr, este método usa comprimentos de onda na região do infravermelho na faixa de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} .

2.17 Análise Termogravimétrica (TGA)

As análises termogravimétricas foram realizadas no Laboratório de Caracterização Instrumental do Programa de pós-graduação em química do instituto de química - UERJ. O equipamento utilizado foi da marca TA Instruments, modelo TGA Q50 e série 0050-0390. As condições de análise foram: Atmosfera inerte, taxa de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ de 50 $^{\circ}\text{C}$ a 600 $^{\circ}\text{C}$ ou 800 $^{\circ}\text{C}$.

2.18 Hidrólise enzimática

Os materiais pré-tratados e *in natura* foram hidrolisados enzimaticamente para obtenção de açúcares redutores. A hidrólise foi conduzida em Erlenmeyer empregando enzimas celulasas produzidas em laboratório por *Aspergillus niger* 11T53A14 a 40 $^{\circ}\text{C}$, com agitação de 100 rpm em incubadora (Tecnal, modelo: TE-420). Foi adicionado 0,10 g de bagaço e o volume de 20 mL de extrato enzimático, valor necessário para se obter uma atividade de 15 FPU/g de bagaço. Alíquotas de 200 μL foram retiradas em tempos de reação pré-estabelecidos até 48 h para observação da cinética da reação. Os açúcares redutores das amostras foram determinados pelo método DNS (item 2.10). A absorbância foi medida em espectrofotômetro (Biospectro SP-220) com o comprimento de onda de 540 nm.

2.19 Plaqueamento e coloração de Gram

Com o objetivo de investigar possível contaminação durante a hidrólise enzimática, foi realizado o plaqueamento por semeadura em superfície de alíquotas do hidrolisado após o fim da reação, utilizando ágar Sabouraud (de composição 10 g/L de peptona, 20 g/L de glicose,

0,01 g/L de extrato de levedura, 18 g/L de agar-agar em água destilada) e gelose simples (de composição: 3g/L de extrato de carne, 10g/L de peptona, 1g/L de Na₂HPO₄, 5g/L de NaCl e 18 g/L de agar-agar em água destilada.). O meio de cultura fundido foi colocado na placa de Petri, deixado solidificar e sobre a placa foi adicionada a amostra de hidrolisado. Espalhou-se o material por toda a superfície da placa com espátula de Drigalsky e foi incubado em estufa a 25° C.

Foi realizada também a técnica de coloração de gram, adaptada de Hucker (MOREIRA et al., 2015). Com o auxílio de uma alça de platina foi retirado uma pequena quantidade do crescimento do micro-organismo da gelose simples, e ressuspendido em uma gota de água adicionada no meio da lâmina. Em seguida foi realizada a fixação do esfregaço por calor. Para a coloração a preparação foi coberta com Gram I (solução de cristal violeta), que foi lavada com água destilada após 60 segundos. Posteriormente a preparação foi recoberta com gotas de Gram II (solução de Lugol - Iodo com iodeto de potássio) que foi lavado com água destilada após 30 segundos. O esfregaço foi tratado também com Gram III (etanol) até descorar e então foi lavada com água destilada. Por último, a lâmina foi recoberta com Gram IV (solução de safranina), que foi lavada com água destilada após 7 segundos. As células foram observadas em microscópio óptico (Nikon Eclipse, modelo E100) com a objetiva de imersão.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Composição química do bagaço de cana-de-açúcar

Os resultados encontrados para a composição química do bagaço de cana e os valores reportados na literatura são apresentados na Tabela 5. Os resultados obtidos estão próximos da faixa reportada na literatura.

Tabela 5- Composição de bagaço de cana *in natura* determinado neste trabalho e reportados na literatura

Referência	Este trabalho	Procentese et al. (2015)	Liu et al. (2020)	Espirito Santo (2020)	Pego et al. (2019)
Fração	Teor (%)				
Celulose	29,1 ($\pm 1,2$)	31,5 ($\pm 1,2$)	37,72 ($\pm 0,69$)	36,7 ($\pm 2,2$)	43,43 ($\pm 1,44$)
Hemicelulose	21,1 ($\pm 1,2$)	22,1 ($\pm 0,4$)	22,95 ($\pm 0,42$)	24,5 ($\pm 0,7$)	17,63 ($\pm 1,02$)
Lignina insolúvel	18,2 ($\pm 0,3$)	13,7 ($\pm 0,1$)	-	-	22,63 ($\pm 0,25$)
Lignina solúvel	4,7 ($\pm 0,1$)	3,2 ($\pm 0,1$)	-	-	2,71 ($\pm 0,15$)
Lignina total	22,9 *	-	22,34 ($\pm 0,09$)	24,5 ($\pm 0,5$)	25,34 ($\pm 0,20$)
Cinzas	12,6 ($\pm 0,0$)	-	-	5,2 ($\pm 0,2$)	0,79 ($\pm 0,13$)
Extrativos	11,6 ($\pm 0,0$)	-	-	-	12,81 ($\pm 0,78$)

Legenda: *soma da quantidade de lignina solúvel e lignina insolúvel.

Fonte: O autor, 2023.

3.2 Produção de celulases por *Aspergillus niger* 11T53A14.

A atividade de celulases totais das enzimas produzidas por cultivo em estado sólido pela cepa de *A. niger*, por 72 h utilizando como matéria-prima farelo de trigo com 50 % de umidade foi de 0,37 ($\pm 0,025$) UI/g.

Rodríguez-Zúñiga et al. (2011) também produziram celulases por cultivo em estado sólido de *A. niger*, utilizando farelo de trigo como matéria-prima, com 50 % de umidade. Os autores obtiveram a máxima atividade de celulases totais, 0,4 UI/g com 72 h de cultivo.

3.3 Preparo e propriedades físicas do Solventes eutéticos profundos

O solvente eutético profundo formado por cloreto de colina e ácido láctico foi preparado na proporção molar 1:5. Para a formação desse DES não se precisou de aquecimento e para que se obtivesse um líquido homogêneo foi necessário aproximadamente 30 minutos de agitação magnética a 500 rpm. O solvente formado pela mistura de cloreto de colina e glicerol na proporção molar de 1:2 formou mistura homogênea em aproximadamente 2 h de agitação e também não se precisou de aquecimento. Esses dois solventes foram selecionados da literatura como potenciais DES para o pré-tratamento do bagaço de cana. São apresentados, na Tabela 6, os valores de densidade, viscosidade dinâmica e viscosidade cinemática desses solventes a 25 °C e a 80 °C, obtidos através do viscosímetro dinâmico (Anton Paar, modelo SVM 4001).

Esfahini et al. (2020) determinaram as propriedades físico-químicas dos DES ChCl:Gli (1:2) a 25 °C e reportaram os valores 1,18 g/cm³ para a densidade e 302 cP de viscosidade. Os autores relataram que na literatura os valores de densidade e viscosidade variam de 1,18 a 1,19 g/cm³ e de 302 a 376 cP, respectivamente.

Viscosidade e densidade são características importantes de um DES. No pré-tratamento, a alta viscosidade do DES pode afetar negativamente o processo de transferência de massa. A densidade pode revelar a atividade e a mobilidade molecular da solução. Esses fatores contribuíram na seleção do DES a ser utilizado neste trabalho (XU et al., 2020).

Tabela 6 - Propriedades físicas dos solventes eutético formados pela mistura de cloreto de colina (ChCl) com ácido láctico (AL) e com glicerol (Gli).

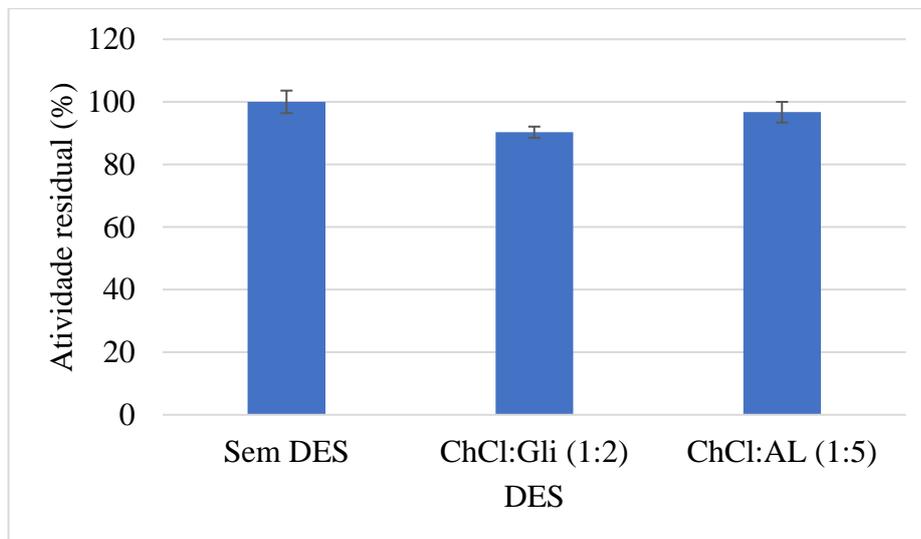
	ChCl:AL (1:5)	ChCl:AL (1:5)	ChCl:Gli (1:2)	ChCl:Gli (1:2)
Temperatura (°C)	25	80	25	80
Densidade (g/cm³)	1,18	1,14	1,19	1,16
Viscosidade dinâmica (mPa.s)	45,42	5,51	307,87	23,86
Viscosidade cinemática (mm²/s)	38,53	4,85	258,48	20,55

Fonte: O autor, 2022.

3.4 Efeito do DES na atividade enzimática.

Conforme apresentado na Figura 25, o DES formado por cloreto de colina e glicerol em baixa concentração (1% v/v) causou uma redução de aproximadamente 10% na atividade da celulase. A presença de 1% do DES formado por ChCl e Ácido láctico não influenciou de forma significativa a atividade enzimática. Esta informação é importante, pois indica que a inibição causada por resíduos de DES nas enzimas celulase na etapa de hidrólise é mínima. Consequentemente, a quantidade de água utilizada durante a etapa de lavagem após o processo de pré-tratamento pode ser reduzida (GUNNY et al., 2014).

Figura 25- Atividade residual das celulases totais em 1% (v/v) de diferentes solventes eutéticos em solução tampão de citrato de sódio após 24 h.



Legenda: ChCl:Gli (1:2) - DES formado por ChCl e glicerol na razão molar de 1:2,
 ChCl:AL (1 :5) - DES formado por ChCl e ácido láctico em razões molar 1:5
 Fonte: O autor, 2022

Satlewal et al. (2019) compararam os efeitos da presença de um DES, ChCl:Ácido láctico (1:5), e de um LI (Acetato de 1-butil-3-metilimidazólio) na estabilidade das celulases (Accellerase 1500, DuPont Industrial Biosciences). Neste trabalho os autores observaram a maior estabilidade das enzimas no DES. Após 24 h de contato com o DES em baixa concentração (1% de DES), não houve redução significativa da atividade enzimática das celulases, e após 48 h a atividade residual era de aproximadamente 80%. O LI, por sua vez, com a mesma concentração causou a redução em aproximadamente 15% na atividade das celulases após 24 h e de cerca 55% em 48 h.

Outros DESs também foram relatados como compatíveis com as enzimas celulases, ao contrário da maioria dos líquidos iônicos que muitas vezes são inibidores de enzimas (SATLEWAL et al. 2019).

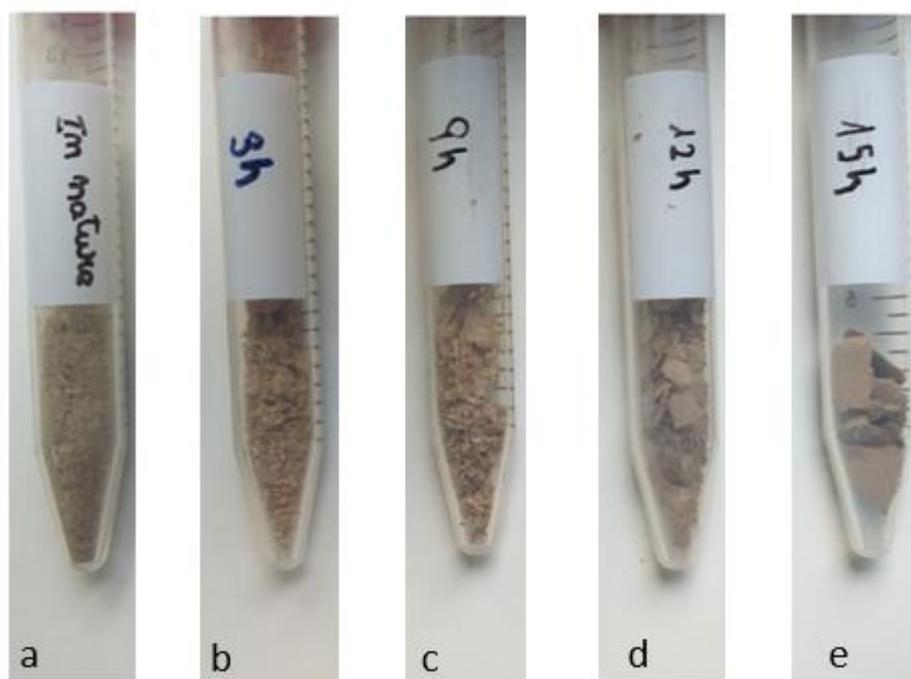
Gunny et al., (2014) também estudaram a biocompatibilidade dos DES formados por ChCl com glicerol (1:2), ChCl e etilenoglicol (1:2) e ChCl com ácido malônico (1:2) com as enzimas celulolíticas. Os autores reportaram que não houve redução significativa da atividade das enzimas estudadas (Celulases de *Aspergillus* sp. Sigma-Aldrich) na presença de 1% de glicerol, mas que houve queda de aproximadamente 10% com o DES formado por etileno glicol e uma redução maior (cerca de 20%) com o DES formado por ácido malônico.

3.5 Pré-tratamento do bagaço de cana com DES seguido de lavagem com água destilada.

O bagaço de cana-de-açúcar cominuído foi pré-tratado com DES formado por cloreto de colina e ácido lático na proporção molar 1:5 (ChCl:AL-1:5) em diferentes tempos. O pré-tratamento foi seguido da adição de água destilada, para regenerar o bagaço de cana e diminuir a viscosidade da mistura.

A Figura 26 apresenta o bagaço de cana-de-açúcar antes e após o pré-tratamento com DES e adição do anti-solvente. Pode-se observar a maior compactação do material com o tempo de pré-tratamento. Após a lavagem, as amostras foram filtradas a vácuo e secas, portanto ficam compactadas.

Figura 26- Bagaço de cana antes e após diferentes tempos (3h, 9h, 12h e 15h) de pré-tratamento com solvente eutético formado por cloreto de colina e ácido lático a proporção molar de 1:5 a 80 °C.

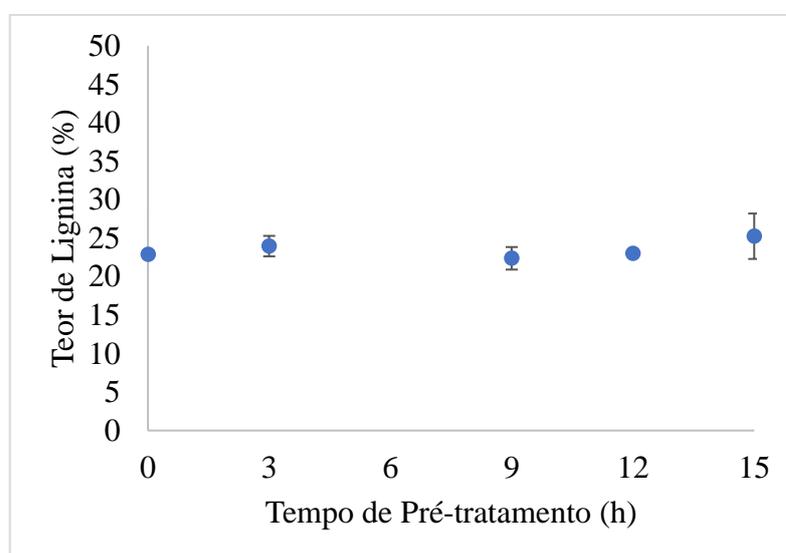


Legenda: Bagaço de cana *in natura* e pré-tratados por 3 h (b), 9 h (c), 12 h (d), 15 h (e).
Fonte: O autor, 2022.

3.5.1 Teor de Lignina

O esperado do pré-tratamento com solventes eutéticos é principalmente a remoção da lignina da biomassa lignocelulósica. Como pode-se observar no gráfico da Figura 27, o pré-tratamento do bagaço com o DES ChCl:AL (1:5) aparentemente não promoveu a remoção da lignina da biomassa.

Figura 27- Teor de lignina do bagaço em função do tempo de pré-tratamento com solvente eutético formado por cloreto de colina e ácido lático a proporção molar de 1:5 a 80 °C.



Fonte: O Autor, 2022

O pré-tratamento foi seguido da adição de água destilada, para regenerar no bagaço de cana pré-tratado. A adição de água foi necessária também para diminuir a viscosidade da mistura e facilitar a separação das fases líquida e sólida. Porém, com os resultados obtidos, supõe-se que a fração de lignina na biomassa não diminuiu porque a adição de água destilada à mistura causou a precipitação desta, que antes estava solubilizada no solvente. Ou seja, a lignina foi removida da estrutura lignocelulósica, mas esta precipitou sobre a biomassa tratada e as análises químicas indicaram ainda a presença delas no material sólido recuperado.

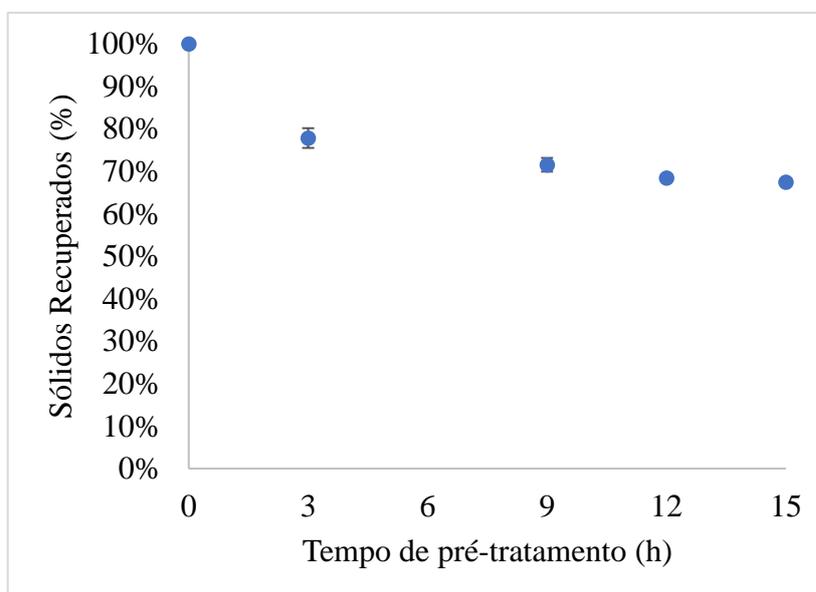
Rocha (2016) avaliou o pré-tratamento do bagaço de cana utilizando quatro líquidos iônicos diferentes. O autor também observou a regeneração estrutural da lignina com a adição da água como anti-solvente, que antes estava solubilizada no LI. Ademais, para pré-tratamentos com LI até 100 °C, o autor não observou remoção seletiva da fração de lignina,

que era 23,37% na biomassa in natura, passando para (20,67 a 23,18)% (dependendo do LI e da temperatura) no bagaço pré-tratado.

3.5.2 Recuperação de Sólidos

A recuperação dos sólidos é uma informação importante para determinar a remoção de lignina e está diretamente relacionada à eficiência global do processo. Espera-se que ocorra perda de sólidos durante o pré-tratamento, pois este visa à remoção de lignina e outros componentes da biomassa. Por outro lado, uma baixa recuperação dos sólidos pode estar associada a perda do produto de interesse, a celulose. A Figura 28 contém as informações de recuperação de sólidos do pré-tratamento do bagaço de cana. Observa-se que a partir de 6 h de pré-tratamento há pouca perda de sólido, chegando a 67% de sólidos recuperados com 15 h de pré-tratamento.

Figura 28- Sólidos recuperados do pré-tratamento com solvente eutéctico formado por cloreto de colina e ácido láctico a proporção molar de 1:5 a 80 °C.



Fonte: O autor, 2022

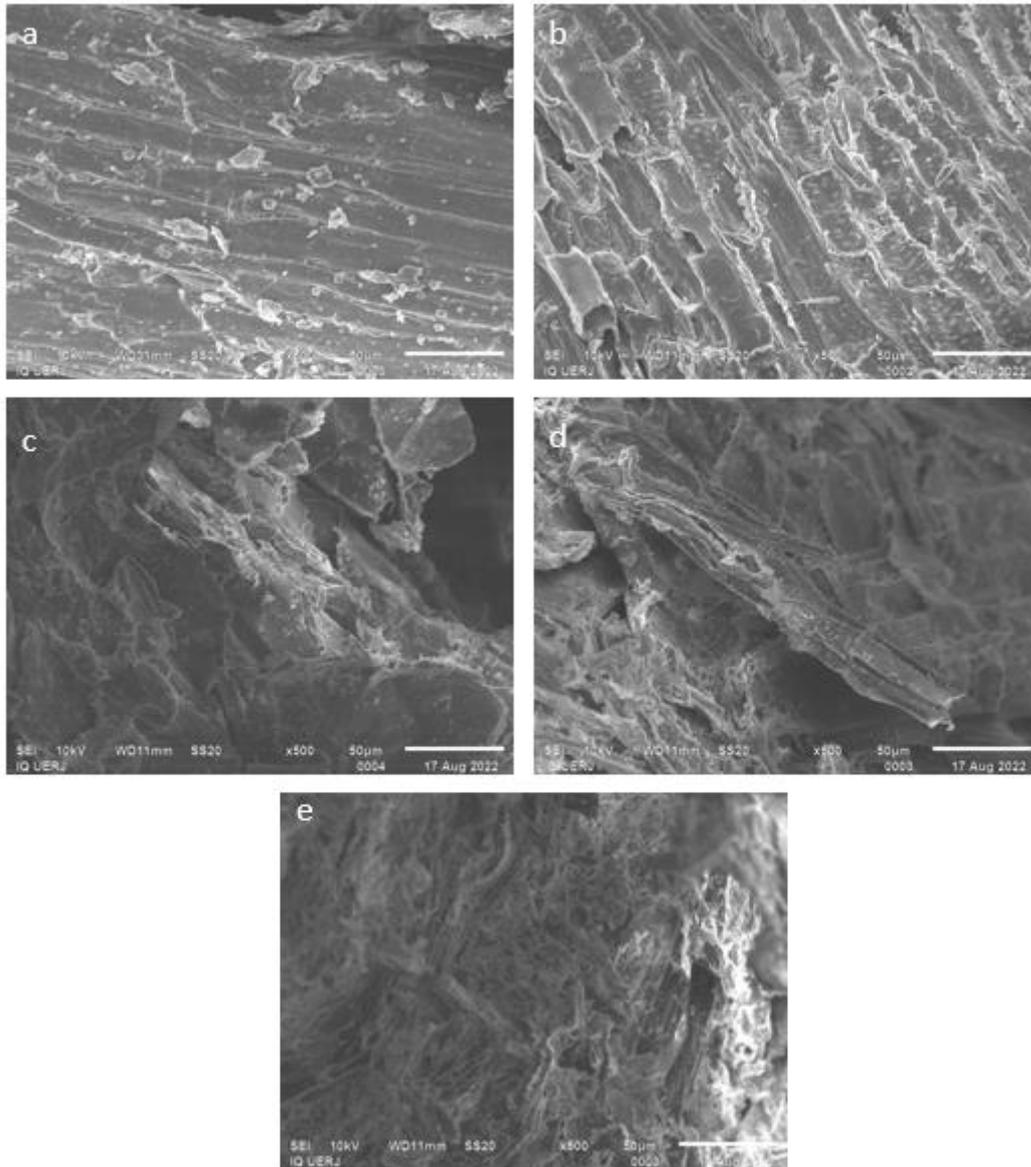
Uma alta recuperação de sólidos é desejável para um bom rendimento total do processo, e comparado aos dados da literatura 67% está dentro do esperado para o pré-tratamento com o DES utilizado. Sattlewal et al., (2019) obtiveram 68,8 % de sólidos recuperados, e Chourasia

et al., (2021) obtiveram entre 60,33 e 65,67 % com o mesmo solvente, tempo e carga de biomassa.

3.5.3 Microscopia eletrônica de varredura

A amostra de biomassa *in natura* e as amostras obtidas após cada tempo de pré-tratamento foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura para elucidar a extensão das mudanças na morfologia da superfície da biomassa com o pré-tratamento (Figura 29).

Figura 29 - Microscopia eletrônica de varredura com aumento de 500x das amostras de bagaço (a) antes e após o pré-tratamento com solvente eutético formado por cloreto de colina e ácido lático a proporção molar de 1:5 a 80 °C por (b) 3 h, (c) 9 h, (d) 12 h e (e) 15 h.



Fonte: O autor, 2022

A biomassa *in natura* exibiu uma superfície intacta, com fibras lisas, compactas e sem ruptura (Figura 29 a). Em contrapartida, as imagens de MEV das amostras pré-tratadas mostraram buracos (Figura 29 b), estrutura deformada e aumento superficial (Figura 29 a, b, c, de e). Essas alterações tenderam a ser maiores com o tempo de pré-tratamento. As análises revelaram que a superfície rígida e ordenada da biomassa foi quebrada após o pré-tratamento. Essa ruptura é importante para aumentar a acessibilidade das enzimas à superfície da biomassa durante a etapa de hidrólise. Sharma et al., (2020) também trataram o bagaço de

cana-de-açúcar com solventes eutéticos profundos e observaram alterações morfológicas semelhantes.

3.5.4 Difração de raios X

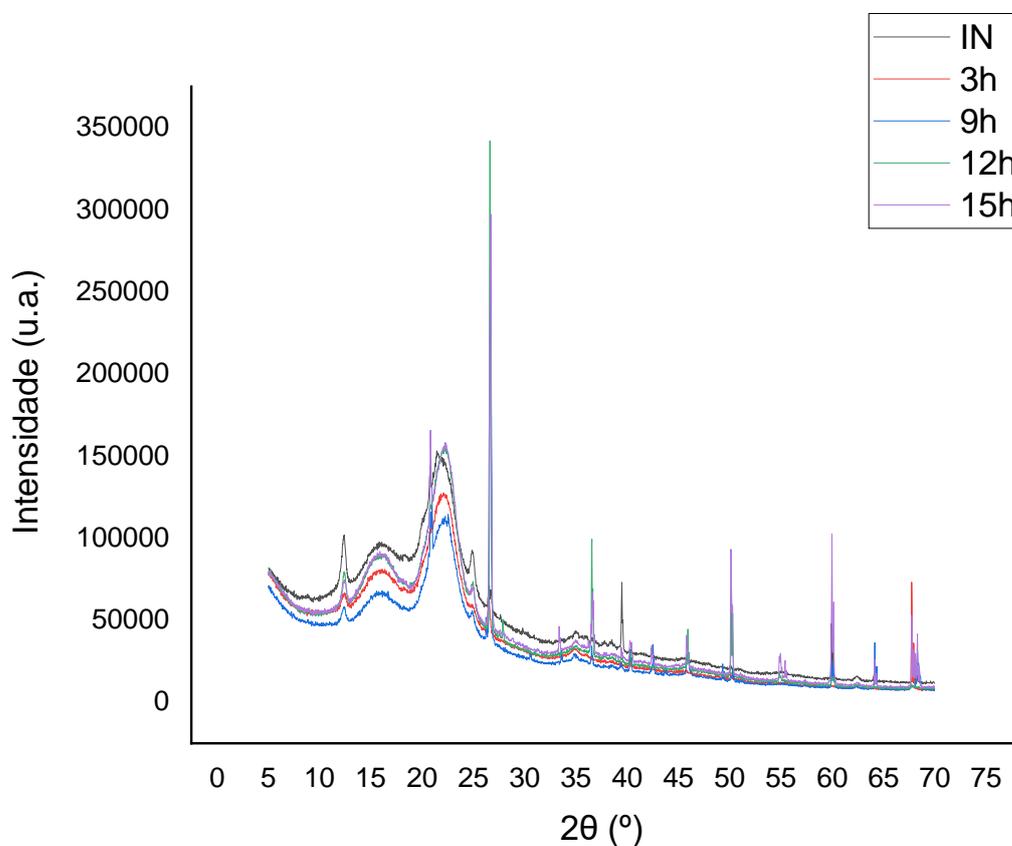
O índice de cristalinidade (IC) é um parâmetro usado para determinar a quantidade de celulose cristalina em materiais celulósicos. A análise por DRX das amostras de bagaço de cana, tratados e *in natura*, foram realizadas para observar o efeito do pré-tratamento com DES no IC do bagaço de cana e na alteração da estrutura cristalina da celulose. Os difratogramas são apresentados na Figura 30.

Como pode ser observado na Figura 30, em todas as amostras, o halo amorfo e o pico cristalino ficaram situados respectivamente entre os ângulos $18^\circ \leq 2\theta \leq 19^\circ$ e $22^\circ \leq 2\theta \leq 23^\circ$, característicos de celulose tipo I (LENGOWSKI et al., 2013). Notou-se também a presença de picos de difração que podem ser atribuídos aos compostos inorgânicos. Como picos próximos a $2\theta = 12^\circ$ e 25° , que costumam ser atribuídos à presença de caulinita ($\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 2\text{SiO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (ALBERS et al., 2002), e picos em $2\theta = 21^\circ$, 27° , entre outros, característicos de quartzo (SAMPAIO et al., 2014), indicando uma possível contaminação proveniente do solo (POGGIALI et al., 2012).

Outros trabalhos também relataram que os perfis de DRX do bagaço pré-tratado com DES ChCl:AL permaneceram semelhantes aos do bagaço não tratado, apontando a estrutura da celulose tipo I antes e após o pré-tratamento (CHOURASIA et al., 2021; SATLEWAL, et al., 2019).

A alteração da celulose do tipo I para o tipo II é esperada quando ocorre a dissolução da celulose e reprecipitação ou regeneração das fibras, ou pelo processo de mercerização da celulose (SOUZA, 2009). Muitos trabalhos concordam que no pré-tratamento da biomassa lignocelulósica com DES, a lignina e a hemicelulose são removidas na fase líquida enquanto as fibras de celulose não são solubilizadas (XU et al., 2020; SOARES et al., 2020). Os perfis de DRX das amostras de bagaço pré-tratado, referentes à celulose tipo I, sugerem que não houve dissolução e reprecipitação da celulose. O que está de acordo com o esperado com base na literatura.

Figura 30- Difratoograma de raios-X das amostras de bagaço de cana *in natura* (IN) e tratados com solvente eutético formado por cloreto de colina e ácido láctico a proporção molar de 1:5 a 80 °C em diferentes tempos (3 h, 9 h, 12 h e 15 h)



Fonte: O autor, 2022.

O índice de cristalinidade (IC) foi calculado segundo a equação 11 (item 2.15). Os valores calculados para o índice de cristalinidade podem ser vistos na Tabela 7. Pode-se observar na Tabela que o pré-tratamento aumentou o índice de cristalinidade. O IC do bagaço aumentou 28,6 % ao final de 12 h de pré-tratamento quando comparado com o bagaço *in natura*. O que provavelmente indica que o pré-tratamento promoveu a remoção de partes amorfas da biomassa lignocelulósica (CHOURASIA et al., 2021).

Tabela 7 - Índice de cristalinidade das amostras de bagaço *in natura* e pré-tratado por diferentes tempos (3 h, 9 h, 12 h e 15 h) com solvente eutético formado por cloreto de colina e ácido láctico a proporção molar de 1:5 a 80 °C.

Amostra de bagaço	Índice de cristalinidade (%)
<i>In natura</i>	42
Pré-tratado 3 h	47
Pré-tratado 9 h	50
Pré-tratado 12 h	54
Pré-tratado 15 h	55

Fonte: O autor, 2023.

Outros trabalhos relataram a variação no índice de cristalinidade do bagaço de cana após o pré-tratamento com DES ChCl:AL (1:5) a 80 °C por 12 h. Um estudo relatou o aumento da cristalinidade da biomassa de 56,2% para 88,7% (aumento de 57.8%) (CHOURASIA et al., 2021) enquanto outro observou uma variação de cristalinidade bem menor, de 68% no bagaço *in natura* para 72%, no bagaço pré-tratado (6% de aumento) (SATLEWAL et al., 2019).

Segundo Chourasia et al., (2021), dois fatores devem ser considerados na avaliação da alteração do índice de cristalinidade pelo pré-tratamento. O primeiro deles é o inchaço e dissolução da celulose cristalina, que causa a redução do índice de cristalinidade da biomassa. O outro fator é a remoção da parte amorfa do material, como a lignina, hemicelulose e a celulose amorfa que causa o aumento do índice da cristalinidade porque aumenta a proporção de celulose cristalina no material.

Karimi et al., (2016) relataram que apesar de geralmente a redução da cristalinidade estar associada ao aumento da bioconversão do material lignocelulósico, esse não é sempre o caso. Em muitos estudos (OH et al., 2020; CHOURASIA et al., 2021) o pré-tratamento promoveu o aumento da cristalinidade devido a da remoção de partes amorfas, e o material pré-tratado apresentou alta digestibilidade por causa de outros fatores como maior área de superfície acessível, maior porosidade, menor teor de lignina e hemicelulose e tamanho de partícula.

3.5.5 Análise de Espectroscopia de absorção no infravermelho (FTIR)

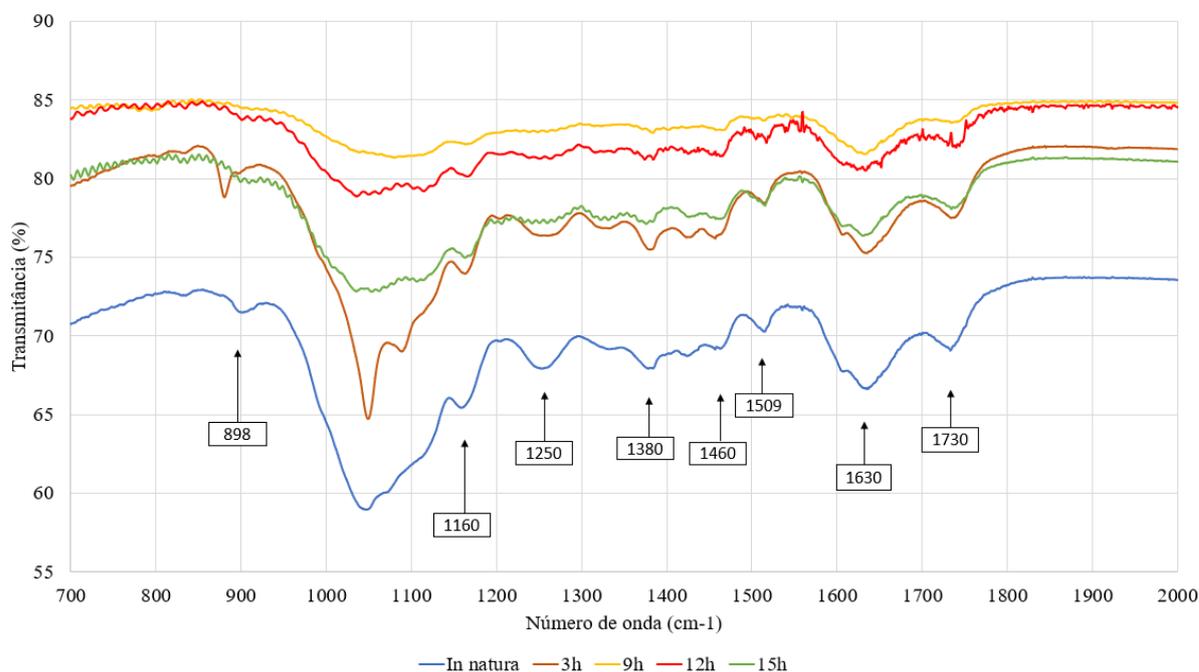
A análise de FTIR foi realizada para avaliar e comparar as alterações de grupos funcionais no bagaço de cana antes e após o pré-tratamento com DES em diferentes tempos. Como o bagaço de cana-de-açúcar é um material lignocelulósico busca-se identificar nos espectros as principais bandas associadas aos grupos funcionais presente na lignina, hemicelulose e celulose. A Figura 31 mostra os espectros de FTIR de 700 a 2000 cm^{-1} para as amostras de bagaço *in natura* e pré-tratados por 3 h, 9 h, 12 h e 15 h.

As maiores modificações, observadas com os espectros de FT-IR, ocorreram entre as amostras não tratadas e as amostras tratadas com o pré-tratamento até 9 h. Pode ser observado nos espectros a redução das bandas próximas a 1250 cm^{-1} e 1380 cm^{-1} com o pré-tratamento, principalmente a partir do pré-tratamento de 9h. A banda 1380 cm^{-1} corresponde a deformações da ligação C-H em celulose e hemicelulose (SHARMA et al., 2020) e a banda 1250 cm^{-1} é atribuída ao grupo acetil da celulose (RIBEIRO, 2013). Este resultado sugere uma redução no teor de hemicelulose nas amostras de bagaço pré-tratado.

Algumas bandas referentes a lignina, como as bandas de 1460 cm^{-1} (característica de deformações assimétricas de C-H na lignina) e 1510 cm^{-1} (estiramento C=C-C do anel aromático) (OH et al., 2020) se mantiveram nas amostras pré-tratadas. Esse resultado aponta a presença de lignina nas amostras pré-tratadas, o que está de acordo com a análise do teor de lignina nas amostras.

Outras bandas importantes presentes no material lignocelulósico são as bandas 896 cm^{-1} e 1160 cm^{-1} atribuídas ao estiramento da ligação C-O-C na celulose e na hemicelulose (ZHUANG, et al., 2020; OH et al., 2020). A primeira banda desapareceu nas amostras pré-tratadas enquanto a segunda apresentou uma pequena redução. A banda 1745 cm^{-1} é atribuída por Zhuang et al., 2020 ao estiramento C=O em hemicelulose e lignina. Essa banda também apresentou pouca alteração.

Figura 31- Espectros de FT-IR de amostra de bagaço antes e após o pré-tratamento com solvente eutético formado por cloreto de colina e ácido lático a proporção molar de 1:5 a 80 °C por 3, 9, 12 e 15 h.

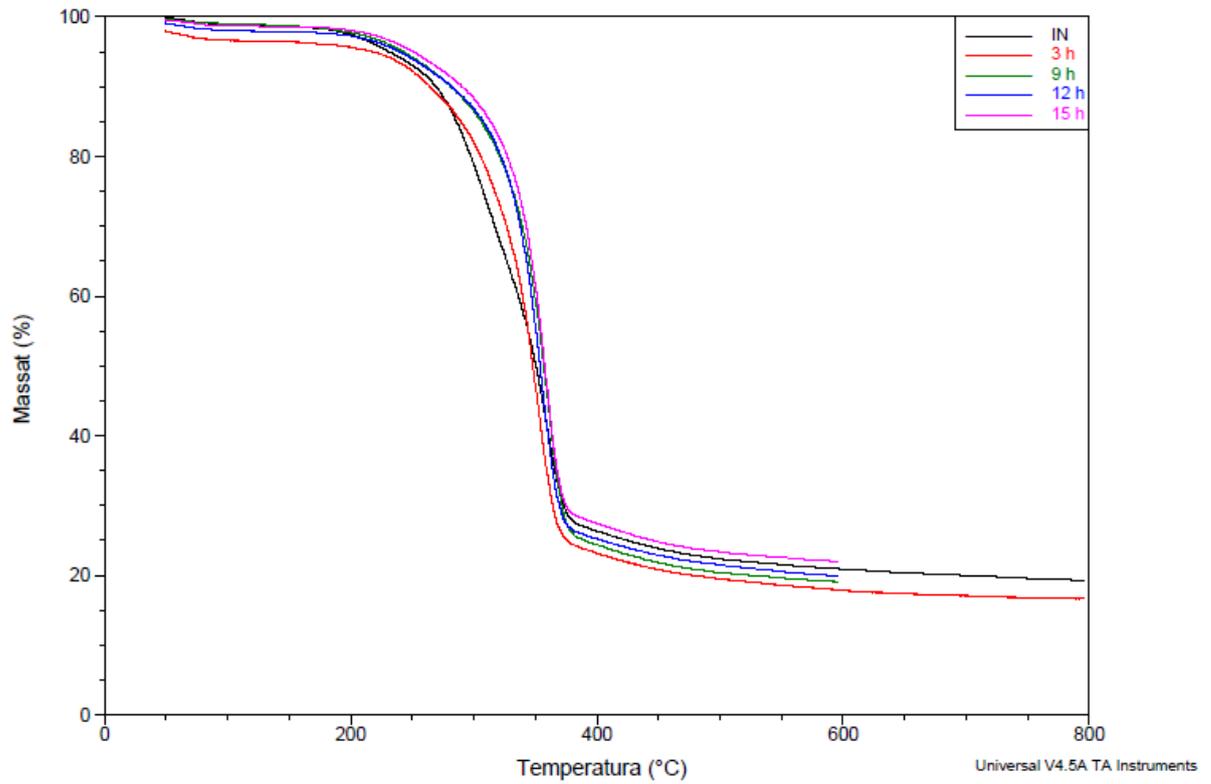


Fonte: O autor, 2022.

3.5.6 Análise Termogravimétrica (TGA) e Termogravimetria derivada (DTG)

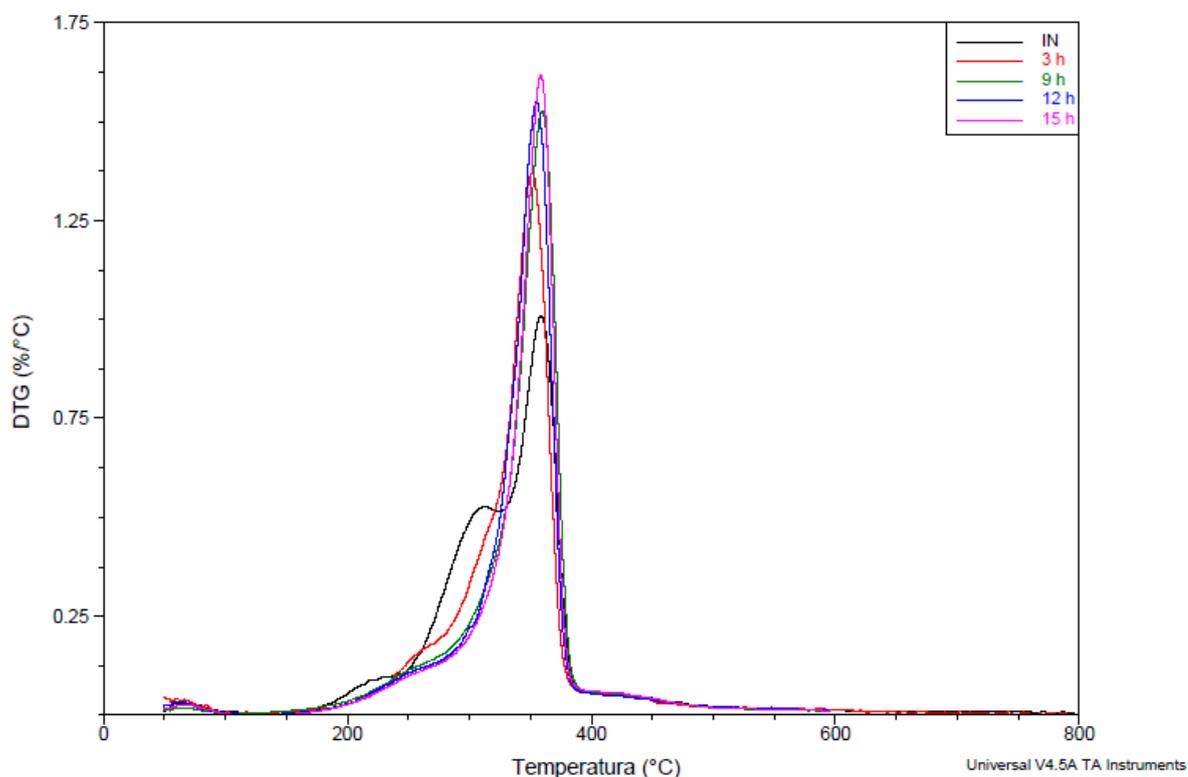
A termogravimetria (TG) é uma técnica de análise térmica que acompanha a variação da massa da amostra em função do tempo ou temperatura enquanto a amostra é submetida a uma programação controlada de temperatura (SANTANA JUNIOR, 2013). Enquanto a Termogravimetria Derivada (DTG) é a derivada primeira da TGA. As análises de TG e DTG da biomassa lignocelulósica fornecem informações sobre os perfis de decomposição térmica de seus componentes, o que permite avaliar as mudanças físico-químicas causadas pelo pré-tratamento (ZHANG et al., 2014). As Figuras 32 e 33 apresentam, respectivamente, as curvas de TGA e DTG obtidas para as amostras de bagaço de cana *in natura* e pré-tratado com DES em atmosfera inerte com taxa de aquecimento de 10 °C/min.

Figura 32- Curvas de TGA das amostras de bagaço de cana *in natura* (IN) e pré-tratado (por 3, 9, 12 e 15h) com solvente eutético formado por cloreto de colina e ácido láctico a proporção molar de 1:5 a 80 °C.



Fonte: O autor, 2022.

Figura 33 - Curvas de DTG das amostras de bagaço de cana *in natura* (IN) e pré-tratado (por 3, 9, 12 e 15h) com solvente eutético formado por cloreto de colina e ácido lático a proporção molar de 1:5 a 80 °C.



Fonte: O autor, 2022.

Com as curvas de TGA e DTG da amostra de bagaço *in natura* foi possível notar a presença de pelo menos quatro estágios de degradação. O primeiro deles, que terminou próximo a 100 °C, pode ser atribuído principalmente à perda de umidade do material (OLIVEIRA, 2020). Esse estágio está presente em todas as amostras, e o teor de umidade das amostras variou de 0,7 a 1,6 %.

O segundo estágio iniciou próximo a 180 °C, esse estágio de degradação é geralmente atribuído ao início da degradação da lignina (MENDES, 2014). Segundo Oliveira (2020) a lignina se decompõe em uma ampla faixa de temperatura, que inicia a 170° C e continua até o final da reação. De acordo com as curvas de DTG, a biomassa continua a perder massa após o quarto estágio (após 380 °C). Iniciando também próximo a 180 °C, observa-se um pico diferente no material *in natura*, que provavelmente indica a degradação térmica dos extrativos, presentes no material lignocelulósico.

O terceiro estágio, que na biomassa não tratada apresenta o pico próximo a 307 °C, é referente à degradação da hemicelulose (LIN; CHEN, 2015; MENDES, 2014). Segundo

dados reportados na literatura, a faixa de decomposição da hemicelulose é de 220 °C a 315 °C (MENDES 2014). Nas amostras pré-tratadas foi possível observar o desaparecimento deste pico de hemicelulose, indicando que o pré-tratamento promoveu a remoção de hemicelulose.

O quarto estágio, o que formou o maior pico, é atribuído à decomposição térmica da celulose (SANTANA JUNIOR, 2013), e ocorre aproximadamente entre 315 e 400 °C (LIN; CHEN, 2015; MENDES, 2014). Pode se observar nas curvas de DTG (Figura 33) que todas as amostras apresentam este pico. As temperaturas de velocidade máxima de degradação ($T_{Máx}$) deste estágio e as temperaturas de início de degradação (T_{onset}) de todas as amostras são apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8 - Temperaturas de velocidade máxima de degradação ($T_{Máx}$) e temperaturas de início de degradação (T_{onset}) das amostras *in natura* (IN) e pré-tratadas por 3, 9, 12 e 15 h com solvente eutético formado por cloreto de colina e ácido láctico a proporção molar de 1:5 a 80 °C.

Amostra	$T_{Máx}$ (°C)	T_{onset} (°C)
IN	358	299
3 h	351	314
9 h	360	325
12 h	355	323
15 h	358	327

Fonte: O autor, 2022.

Como pode ser visto na Tabela 8, não houve tendência de redução da $T_{Máx}$ com o pré-tratamento, assim como não ocorre o alargamento do pico de degradação na curva de DTG (Figura 33), indicando que o pré-tratamento provavelmente não promoveu a degradação das cadeias de celulose.

A T_{onset} , que é menor no bagaço *in natura*, indica que o início da degradação se dá em uma temperatura menor porque este material possui mais componentes que apresentam temperaturas de degradação mais baixas, como hemicelulose e extrativos. A amostra de 3 h, apresentou um aumento no T_{onset} comparada ao bagaço *in natura*, porém é menor do que as amostras de pré-tratados a partir de 9 h (que se mantém quase constantes). Indicando que com até 3 h de pré-tratamento, o material ainda pode perder hemicelulose, mas que a partir de 9 h essa remoção provavelmente não ocorre mais.

3.6 Pré-tratamento da bagaço de cana com DES seguido da adição de etanol 60 % (v/v)

Com o objetivo de testar a hipótese de que o tratamento com o DES estudado promovia a remoção da lignina da estrutura lignocelulósica, mas que ocorria precipitação de parte da lignina com a adição da água, foi adicionada, ao final da filtração e lavagem, uma mistura de etanol e água 60% (v/v).

O pré-tratamento do bagaço com o DES ChCl:AL (1:5) foi repetido com o tempo de pré-tratamento de 12 h e com as mesmas condições anteriores, com 0,05g de bagaço/mL de solvente, a 80 °C e água destilada como anti-solvente. Entretanto, desta vez, durante a filtração, o material foi lavado com 1,5 L de água destilada com o objetivo de remover todo o solvente para que este não interferisse nas análises da composição do bagaço. Além da lavagem com água, foram adicionados 300 mL de etanol 60% (v/v), para que a lignina precipitada fosse solubilizada e removida da biomassa.

A Figura 34 mostra, da esquerda para a direita, a sequência de filtrados obtidos após o pré-tratamento e adição do anti-solvente (primeiro bécher), mais 1,5 L de água, até obtenção de pH igual ao da água destilada, e depois (os três últimos bécheres), a lavagem com 300 mL de etanol 60 % (v/v). Como a lignina é solúvel em etanol, a lignina já desconstruída pelo pré-tratamento com o DES, presente no sólido, foi removida com a adição deste.

Figura 34- Filtrados obtidos após o pré-tratamento com solvente eutético formado por cloreto e colina e ácido láctico na proporção molar de 1:5 a 80 °C por 12 h e lavagem com água destilada e etanol 60% (v/v).



Legenda: Da esquerda para a direita tem-se a sequência de filtrados obtidos após o pré-tratamento. Os últimos três béqueres contém o filtrado após a adição de etanol.

Fonte: O autor, 2022.

3.6.1 Caracterização do bagaço pré-tratado com DES e lavado com etanol 60% (v/v).

A recuperação dos sólidos deste pré-tratamento foi de 55%. Uma redução na recuperação de sólidos era esperada com a lavagem da biomassa com etanol, comparada ao pré-tratamento de 12 h realizado anteriormente. O pré-tratamento causou também uma mudança expressiva na composição da biomassa, como pode ser visto na Tabela 9. Segundo os dados apresentados, as reduções dos teores de lignina e da hemicelulose foram maiores do que a redução do teor de celulose no material analisado após o pré-tratamento. Isso indica que o pré-tratamento mais a lavagem com etanol promoveu uma remoção seletiva da hemicelulose e lignina.

Observa-se também, na Tabela 9, o aumento significativo do teor de cinzas insolúveis no material analisado após o pré-tratamento. Essa quantidade de cinzas é superior à quantidade absoluta de cinzas no material *in natura*, indicando que houve incorporação, ao pré-tratado, de vidro proveniente do filtro. Isso pode ter ocorrido durante a filtração, na qual foi feita uma agitação com o bastão de vidro. Essa fricção pode ter rompido a placa porosa do filtro, que foi incorporada ao sólido retido.

Na literatura, o teor de cinzas do bagaço de cana costuma variar pouco no pré-tratamento com DES. Chourasia et al. (2021), avaliando o pré-tratamento com DES ChCl:AL (1:5) a 80 °C por 12 h, de cinco tipos de bagaço de cana diferentes, observaram pequenas variações do teor de cinzas, como de 4,47% para 4,70% na variedade SRA1, 4,00% para 4,47% na variedade SRA5, 4,83% para 5,20% na variedade Q208, 5,10% para 4,5% para a variedade MQ239 e de 5,43% para 4,67 % na variedade ISB. Satlewal et al., (2019) reportaram a variação do teor de cinzas de $4,3 \pm 0,1$ para $7,2 \pm 1,1$ com o pré-tratamento usando o mesmo DES.

Com o objetivo de estimar a remoção de lignina e recuperação de celulose no pré-tratamento, parâmetros importantes para avaliação da eficiência do solvente, algumas considerações foram feitas. Considerou-se que toda cinza insolúvel do bagaço *in natura* tenha ido para o bagaço pré-tratado. O que permitiu excluir a quantidade de cinzas proveniente do filtro e estimar o teor das frações do material lignocelulósico do pré-tratado. Os teores calculados também podem ser vistos na Tabela 9.

Tabela 9 - Composição química do bagaço *in natura* e pré-tratado com solvente eutético formado por cloreto de colina e ácido láctico a proporção molar de 1:5 a 80 °C por 12 h e lavado com etanol 60% (v/v).

Bagaço	in natura	pré-tratado analisado	Pré-tratado calculado*
Frações	Teor (%)		
Celulose	29,1 ($\pm 1,2$)	28,4 ($\pm 5,3$)	41,0%
Hemicelulose	21,1 ($\pm 1,2$)	10,2 ($\pm 1,0$)	14,7%
Lignina	23,8 ($\pm 0,3$)	10,9 ($\pm 0,3$)	15,7%
Cinzas Insolúveis	6,8 ($\pm 0,5$)	39,3 ($\pm 2,2$)	12,4%

Legenda: *O valor de pré-tratado calculado desconsiderando as cinzas provenientes do filtro.
Fonte: O autor, 2022.

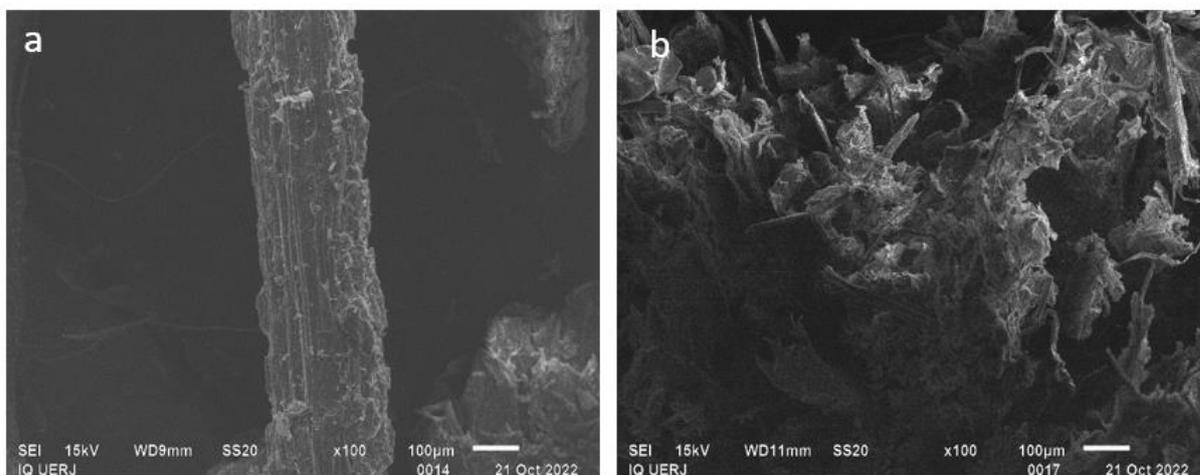
A partir destes dados, pode-se estimar a remoção de lignina, que foi de 63,6% e a recuperação de celulose foi de 77,4%. Outros estudos que avaliaram a eficiência do mesmo solvente pré-tratando a mesma biomassa obtiveram resultados parecidos. Chourasia et al., (2021) reportaram uma remoção de lignina de 65,35% e uma recuperação de celulose de 83,84% para a biomassa Q208. Satlewal et al. (2019) obtiveram uma menor remoção de lignina (50,5%), porém obtiveram uma maior recuperação de celulose (93,0%).

Outras análises, como o TGA, DRX, FTIR e MEV, reforçam o que foi discutido acima.

3.6.2 Microscopia eletrônica de varredura

As imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (Figura 35) deixam evidente a ruptura da organização da fibra lignocelulósica.

Figura 35- Microscopia eletrônica de varredura (aumento de 100x) das amostras de bagaço (a) antes e (b) após o pré-tratamento com solvente eutético formado por cloreto de colina e ácido láctico a proporção molar de 1:5 a 80 °C por 12 h e lavagem com etanol.



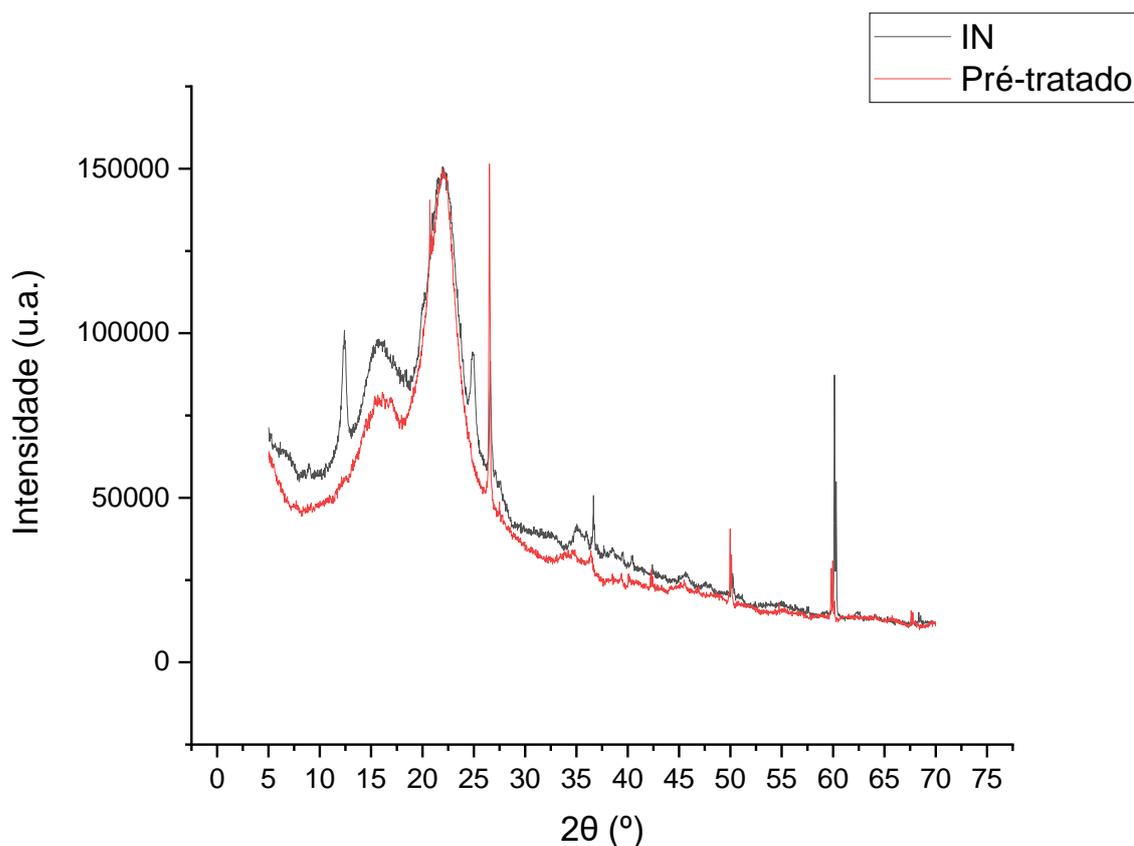
Fonte: O autor, 2022.

3.6.3 Difração de raios X

A Figura 36 apresenta os difratogramas do material *in natura* e pré-tratado com DES e lavagem com etanol 60 % (v/v). O padrão de difração foi observado como sendo característico de celulose tipo I, assim como o padrão da biomassa tratada com DES sem a etapa de lavagem com etanol (Item 3.5.4). O índice de cristalinidade aumentou após este pré-tratamento, passando de 42 % na biomassa *in natura* para 51 % no material pré-tratado (um aumento de 21,4 % na cristalinidade). Este valor aponta a remoção da lignina e hemicelulose que correspondem a parcela amorfa do material lignocelulósico.

Pode ser visto na Figura 36 que os picos nos ângulos próximos a $2\theta = 12^\circ$ e 25° , atribuídos a presença de caulinita, presentes no difratograma do bagaço *in natura* não aparecem no difratograma do bagaço pré-tratado, indicando a remoção ou conversão deste argilomineral. Entretanto, ambos os difratogramas apresentam os picos característicos de quartzo, que incluem os picos observados próximos aos ângulos $2\theta = 21^\circ$, 27° , 36° , 50° e 60° (SAMPAIO et al., 2014).

Figura 36- Difratoformas de raios X das amostras de bagaço de cana *in natura* (IN) e tratado com solvente eutético formado por cloreto de colina e ácido láctico a proporção molar de 1:5 a 80 °C por 12 h e lavado com etanol.



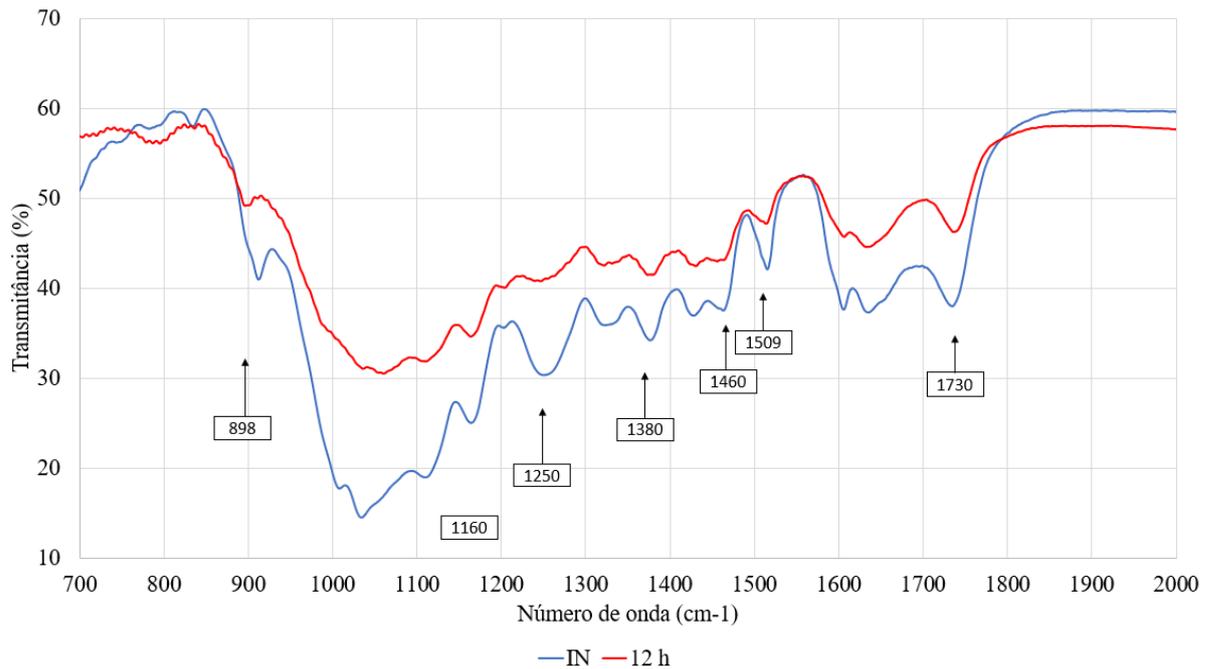
Fonte: O autor, 2022.

3.6.4 Análise de Espectroscopia de absorção no infravermelho (FTIR)

Os espectros de FT-IR da Figura 37 são referentes aos materiais *in natura* e pré-tratado com DES e lavado com etanol 60 % (v/v). A comparação entre os espectros aponta mudanças na composição do material, corroborando a discussão do efeito do pré-tratamento do bagaço com o DES. Pode-se observar uma redução importante de bandas características de hemicelulose, 1250 cm^{-1} e 1380 cm^{-1} e das banda atribuídas a presença lignina, como as bandas 1510 cm^{-1} e 1460 cm^{-1} (ZHUANG, et al., 2020; OH et al., 2020; RIBEIRO, 2013) discutidas com mais detalhes no item 3.5.5. Esses resultados indicam a remoção parcial da lignina e da hemicelulose do material.

Segundo Sharma et al., 2020, os autores observaram a redução da intensidade da banda próximo de 1380 cm^{-1} , atribuído por eles a deformações da ligação C-H em celulose e hemicelulose no bagaço de cana pré-tratado com DES, e relataram que isso está de acordo com o resultado que indica a remoção de hemicelulose durante o pré-tratamento.

Figura 37- Espectros de FT-IR de amostra de bagaço antes e após o pré-tratamento com solvente eutético formado por cloreto de colina e ácido láctico a proporção molar de 1:5 a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 12 h e lavagem com etanol.

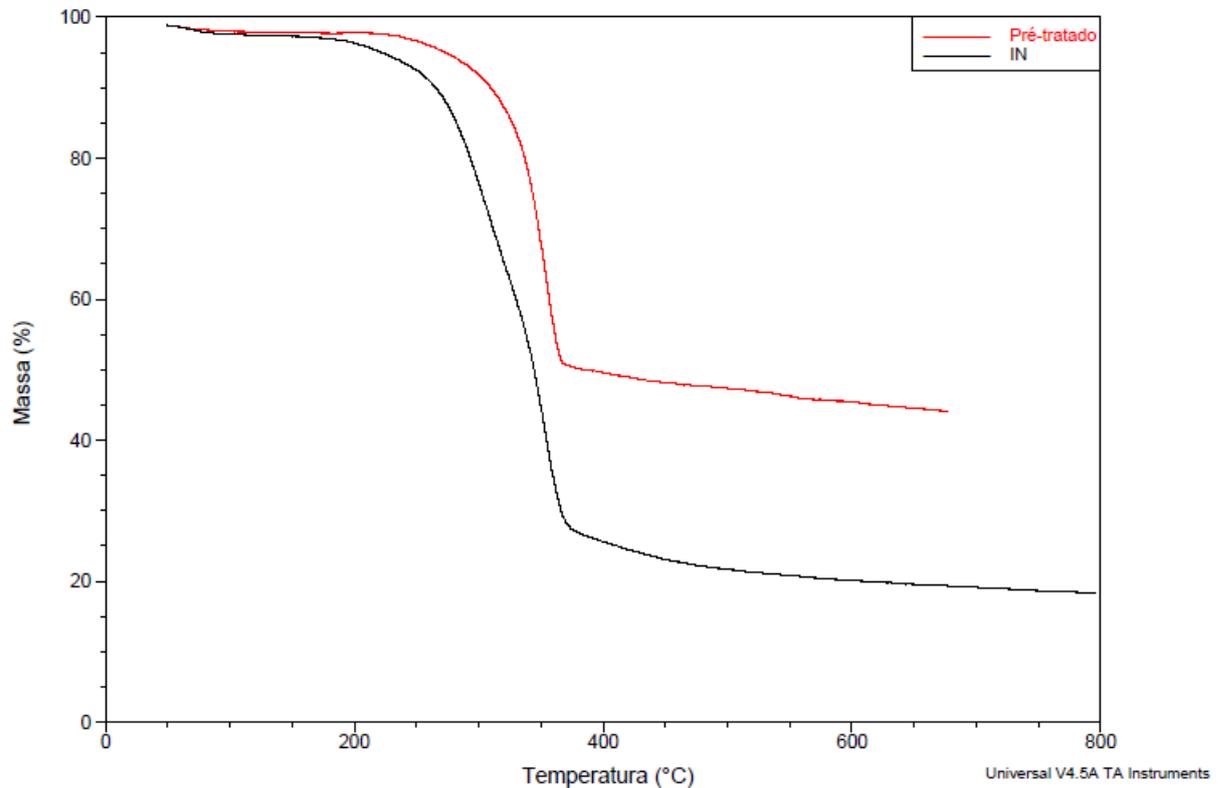


Fonte: O autor, 2022.

3.6.5 Análise Termogravimétrica (TGA) e Termogravimetria derivada (DTG)

A curva de TGA (Figura 38) do pré-tratado que foi lavado com etanol, mostra o aumento da fração mássica residual comparado com a curva do material *in natura*, apontando o aumento do teor de cinzas.

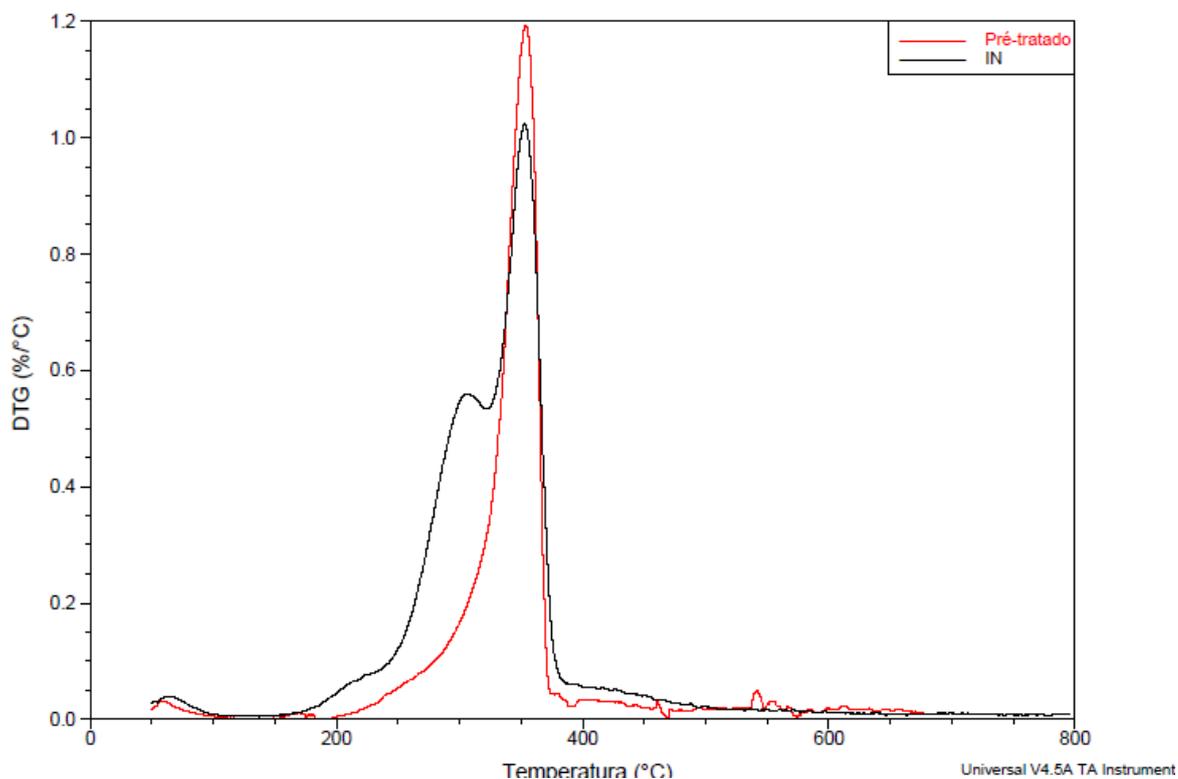
Figura 38 - Curvas TGA das amostras de bagaço *in natura* (IN) e pré-tratados com solvente eutético formado por cloreto de colina e ácido lático a proporção molar de 1:5 a 80 °C por 12 h e lavado com etanol.



Fonte: O autor, 2022

Já com a curva de DTG (Figura 39), pode-se observar o desaparecimento do terceiro estágio de degradação térmica, que tem o pico em 307° C, onde, no gráfico, é identificado com um ombro do pico principal. Esse estágio é atribuído a presença de hemicelulose na amostra, logo esse resultado indica a redução expressiva da concentração de hemicelulose com o pré-tratamento (LIN; CHEN, 2015; MENDES, 2014).

Figura 39- Curvas DTG das amostras de bagaço *in natura* (IN) e pré-tratados com solvente eutéctico formado por cloreto de colina e ácido lático a proporção molar de 1:5 a 80 °C por 12 h e lavado com etanol.



Fonte: O autor, 2022.

As amostras de bagaço *in natura* e pré-tratado apresentaram umidade de 1,7 e 1,0 % respectivamente. A temperatura de taxa de degradação máxima ($T_{M\acute{a}x}$) quase não variou, sendo 352 °C no bagaço *in natura* e 354 °C do bagaço pré-tratado. Enquanto o T_{onset} variou de 295 °C do bagaço não tratado para 325 °C no bagaço pré-tratado, mostrando que o pré-tratamento foi eficiente na remoção de componentes como extrativos e hemicelulose e não degradou a celulose.

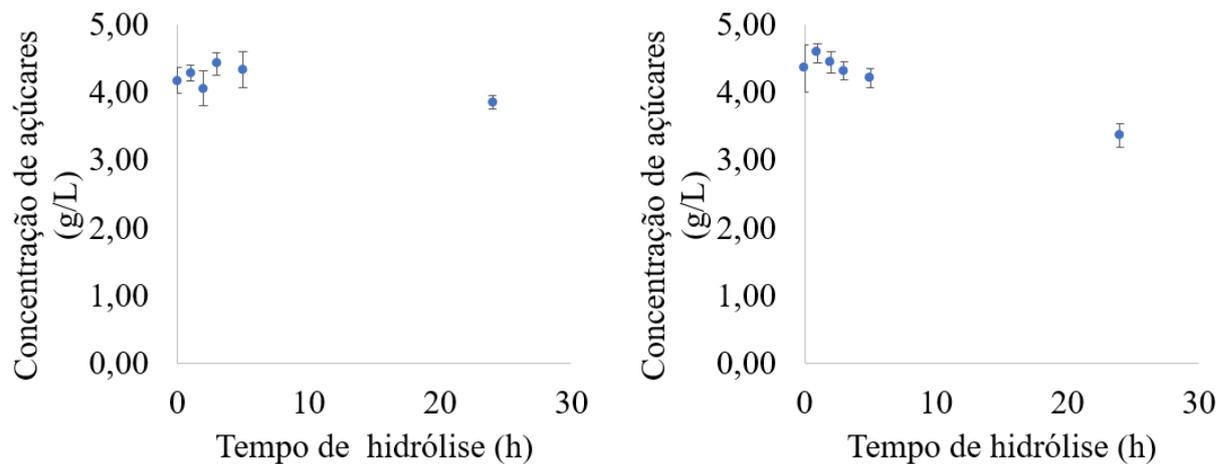
3.7 Hidrólise enzimática

Foi realizada a hidrólise do material *in natura* e do material pré-tratado com DES ChCl:AL (1:5) por 12 h, com o extrato enzimático de *Aspergillus niger* 11T53A14 produzido conforme descrito no item 2.7. A Figura 40 apresentam os resultados de concentração de

açúcares com o tempo de hidrólise do bagaço *in natura* (Figura 40 a) e pré-tratado (Figura 40 b).

Ao avaliar o efeito do pré-tratamento na eficiência da hidrólise enzimática (Figura 40) percebeu-se uma variação inexpressiva na quantidade de açúcar redutor. Sendo assim, pode-se dizer que, provavelmente, não houve hidrólise enzimática em nenhuma das amostras analisadas. Ao final das 24 h de experimento, foi observada a presença de contaminação (Figura 41), fato caracterizado pela redução da concentração de açúcares redutores tanto para o bagaço *in natura* quanto para o bagaço pré-tratado, 3,85 e 3,36 g/L, respectivamente.

Figura 40 - Concentração de açúcares redutores em função do tempo de hidrólise realizada a 40 °C, 100 rpm do bagaço *in natura* (a) do bagaço pré-tratado com solvente eutético formado por cloreto de colina e ácido láctico (b).



Fonte: O autor, 2022.

Figura 41- Meio reacional da hidrólise enzimática após 24 h



Fonte: O autor, 2022.

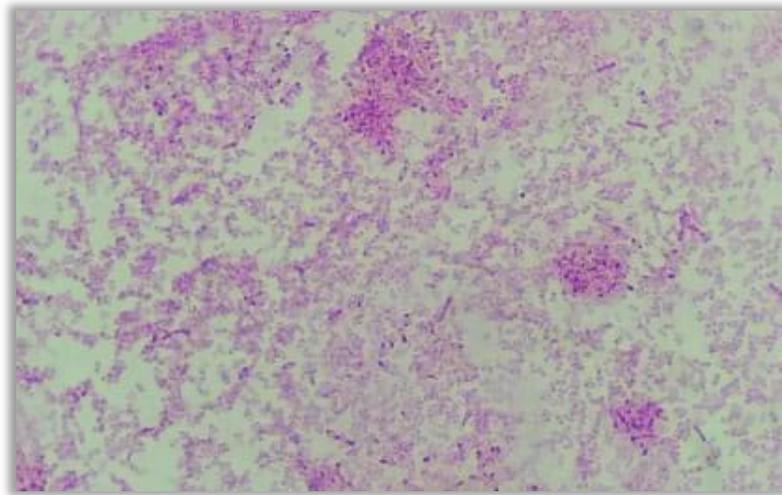
Uma amostra foi utilizada para a hidrólise enzimática adicionada de azida sódica 0,02% (m/v), com intuito de inibir possíveis contaminações. No entanto, mesmo com a adição deste agente antimicrobiano, a redução da concentração de açúcar redutor foi observada ao final das 24 h de experimento (dados não apresentados). Foi realizado o plaqueamento por semeadura em superfície em meios ágar Sabouraud e gelose simples para identificação de contaminantes. A análise da Figura 42, do plaqueamento realizado em meio Sabouraud, comprova a hipótese da presença de contaminantes, que em uma avaliação inicial foi constatada a presença de bactérias gram-positivas (Figura 43). Esta avaliação está de acordo com a literatura, pois é reportado que bactérias gram-positivas são resistentes a azida sódica (WINTER et al., 2012).

Figura 42- Plaqueamento em meio ágar Sabouraud de uma amostra de hidrolisado com azida sódica - Colônia microbiana.



Fonte: O autor, 2022.

Figura 43- Bactérias gram-positivas detectadas no plaqueamento de uma amostra de hidrolisado por microscópio.



Fonte: O autor, 2022.

Diante dos resultados acima expostos, seria necessário uma maior investigação da hidrólise enzimática, pois são muitas as hipóteses para explicar a possível ausência desta, que

não foram possíveis de serem realizadas no presentes trabalho. No entanto, os parâmetros a serem avaliados serão apresentadas no capítulo 'Perspectivas'.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

-As enzimas celulases de *Aspergillus niger* 11T53A14 produzidas por cultivo em estado sólido nas condições estudadas alcançaram uma atividade dentro do esperado na literatura.

- As enzimas produzidas por *A. niger* 11T53A14 mantiveram suas atividades em baixas concentrações dos DES estudados. Logo estes podem ser aplicado em pré-tratamentos seguido de hidrólise enzimática, podendo se pensar em uma redução do emprego de água nesse processo.

- As análises de MEV, TG, FTIR e DRX foram importantes para avaliar as mudanças sofridas pela biomassa lignocelulósica durante o pré-tratamento com DES ChCl:AL (1:5) nas condições estudadas. As imagens do MEV permitiram observar a desconstrução da biomassa lignocelulósica e aumento da superfície acessível. Enquanto as análise das curvas de TG e DTG indicaram a remoção de hemicelulose com o tempo pré-tratamento, assim como os espectros de FTIR. As análises por DRX, por sua vez, indicaram uma tendência crescente da cristalinidade com o tempo de pré-tratamento, provavelmente associado à redução da parcela amorfa da lignocelulose.

-O pré-tratamento com o DES estudado, com a adição de etanol 60 %(v/v) para solubilização da lignina precipitada, apresentou uma alta eficiência de remoção de lignina (estimada em 63,6 %) mesmo com uma temperatura abaixo da média que se encontra na literatura (80 °C) e além de uma boa recuperação de celulose (estimada em 77,4 %.).

PERSPECTIVAS

-Avaliar a hidrólise enzimática utilizando extrato enzimático com diferentes cargas enzimáticas, sendo necessário para isto fazer uma prévia concentração do extrato enzimático bruto.

- Investigar os tipos de celulase presentes no extrato enzimático do fungo *Aspergillus niger* 11T53A14 produzidas nas condições utilizadas no presentes trabalho.

-Investir na utilização de métodos que garantam a ausência de contaminação microbiana na etapa de hidrólise enzimática.

- Adequar a etapa de filtração do pré-tratamento para que não ocorra a incorporação do vidro ao material pré-tratado.

- Avaliar recuperação e a reutilização dos DES.

REFERÊNCIA

- ABBOTT, A. P.; CAPPER, G.; DAVIES, D. L.; RASHEED, R. K.; TAMBYRAIAH, V. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. **Chem. Commun.**, p. 70-71, 2003.
- ABBOTT, A. P.; BARRONA, J. C.; FRISCHA, G.; RYDERA, K. S.; SILVA, F. The effect of additives on zinc electrodeposition from deep eutectic solvents. **Electrochimica Acta**, v. 56, p. 5272–5279, May 2011.
- ADSUL, M.; SANDHU, S.K.; SINGHANIA, R.R.; GUPTA, R.; PURI, S.K.; MATHUR, A. Designing a cellulolytic enzyme cocktail for the efficient and economical conversion of lignocellulosic biomass to biofuels. **Enzyme and Microbial Technology**, v.133, p. 1-12, Feb. 2019.
- AFONSO, S. de O. M. **Aspergillus niger: sua utilização na indústria farmacêutica**. 2015. 87 f. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas) – Instituto superior de ciências da saúde Egas Moniz, Almada, Portugal, 2015.
- ALALWAN, A. H.; ALMMINSHID, A. H.; ALJAAFARI, H. A. S. Promising evolution of biofuel generations. Subject review, **Renewable Energy Focus**, v. 28, p. 127-139, Mar. 2019.
- ALONSO-GÓMEZ, L. A.; SOLARTE-TORO, J. C. BELLO-PÉREZ, L. A.; CARDONA-ALZATE, C. A. Performance evaluation and economic analysis of the bioethanol and flour production using rejected unripe plantain fruits (*Musa paradisiaca* L.) as raw material. **Food and Bioproducts Processing**. v. 121, p. 29-42, May 2020.
- ANU; KUMAR, A.; RAPOPORT, A.; KUNZE, G.; KUMAR, S.; SINGH, D.; SINGH, B. Multifarious pretreatment strategies for the lignocellulosic substrates for the generation of renewable and sustainable biofuels: A review. **Renewable Energy** v. 160, p. 1228-1252, Nov. 2020.
- ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, p. 4-4, Feb. 2010.
- BETANCOUR, G. J. V. **Otimização do pré-tratamento ácido do bagaço de cana-de-açúcar e avaliação da fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico para a produção de etanol de segunda geração**. 2010. 174 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.
- BINOD, P.; JANU, K.U.; SINDHU, R.; PANDEY, A. Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass for Bioethanol Production, In: PANDEY, A.; LARROCHE, C.; RICKE, S. C.; DUSSAP, C.; GNANSOUNOU, E. **Biofuels**, Academic Press, 2011, Cap. 10 p. 229-250
- CASTRO, A. M. de; JUNIOR, N. P. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Quim. Nova**, v. 33, n. 1, p.181-188, 2010.
- CHEN, Z., WAN, C. Ultrafast fractionation of lignocellulosic biomass by microwave-assisted deep eutectic solvent pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 250: p. 532-537, Feb. 2018

CHOURASIA, V.R., PANDEY, P., PANT, K.K., HENRY, R.J. Improving enzymatic digestibility of sugarcane bagasse from different varieties of sugarcane using deep eutectic solvent pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 337, p. 125480-125480, Oct. 2021.

COSTA, L. M. A. S. **Caracterização de isolados de *Aspergillus niger* quanto à produção de ácido cítrico e à expressão de genes da citrato sintase**. 2011. 92 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

COSTA, J. A.V.; TREICHEL, H.; KUMAR, V.; PANDEY, A. Chapter 1 - Advances in Solid-State Fermentation, in: LARROCHE, C; SANROMAN, M.; Du, G. PANDEY, A. **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**, 1. ed. Elsevier, Pages 1-17, 2018.

COURI, S.; FARIAS, A. X. Genetic manipulation of *Aspergillus niger* for increased synthesis of pectinolytic enzymes. **Revista de Microbiologia**, v. 26, n. 4, p. 314-317, out./dez. 1995.

COURI, S., Da COSTA TERZI, S.; SAAVEDRA PINTO, G. A.; PEREIRA FFREITAS, S.; Da COSTA, A.C. Hydrolytic enzyme production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8. **Process Biochem**, v. 36, p. 255-261, Oct. 2000.

COUTINHO, J. A. P. Hydrotropy and Cosolvency in Lignin Solubilization with Deep Eutectic Solvents. **ACS Sustainable Chem. Eng.**, v. 7, p. 12485–12493, 2019.

DILLON, 2004. A. J. P. Celulases. In.: SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto :Legis Summa, 2004. Cap. 14. p. 243-269.

EBADIAN, M.; van DYK, S., McMILLAN, J. D.; SADDLER, J. Biofuels policies that have encouraged their production and use: An international perspective. **Energy Policy**, v. 147 p. 111906, Dec. 2020.

ELGHARBAWY, A. A. M; HAYYAN, M; HAYYAN, A; BASIRUN, W. J.; SALLEH, H. M.; MIRGHANI, M. E. S. A grand avenue to integrate deep eutectic solvents into biomass processing. **Biomass and Bioenergy**, v. 137 p. 105550, June 2020.

ESFAHANI, H. S.; KHOSHIMA, A; PAZUKI, G. Choline chloridebased deep eutectic solvents as green extractant for the efficient extraction of 1-butanol or 2-butanol from azeotropic n-heptane + butanol mixtures. **Journal of Molecular Liquids**, v. 313, p. 113524, Sept. 2020.

ESPIRITO SANTO, M. C. **Caracterização físico-química do bagaço de cana-de-açúcar após diversos pré-tratamentos visando melhorar o rendimento de hidrólise enzimática**. 2020. 181 f. Tese (Doutorado em ciências) – Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz”. Universidade Estadual de Campinas, Universidade Estadual Paulista, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2020.

EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **RAVEN | Biologia vegetal**. revisão técnica KRAUS, J. E.; tradução VIEIRA. A. C. M. [et.al.]. - 8. ed. - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

FARIAS, F. O. **Desenvolvimento e caracterização de sistemas de duas fases aquosas compostos por solventes eutéticos profundos aplicados na separação de biomoléculas**. 128 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2019.

FARINAS, C. S. **A parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação**. São Carlos: Embrapa Instrumentação, 2011. 13 p.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulose activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, p. 257-68, 1987.

GOMIDE, F.T.F. **Modelagem da reação de hidrólise enzimática de substrato celulósico**. 2019. 248 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

GUNNY, A. A. N.; ARBAIN, D.; NASHEF, E. M.; JAMAL, P. Applicability evaluation of Deep Eutectic Solvents–Cellulase system for lignocellulose hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 181, p. 297-302, Apr. 2015.

JI, Q., YU, X., YAGOUB, A.E.A., CHEN, LI., FAKAYODE, O.A., ZHOU, C. Synergism of sweeping frequency ultrasound and deep eutectic solvents pretreatment for fractionation of sugarcane bagasse and enhancing enzymatic hydrolysis. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 73, p. 105470, May 2021.

JING, Y.; LI, F.; LI, Y.; JIANG, D.; LU, C.; ZHANG, Z.; ZHANG, Q. Biohydrogen production by deep eutectic solvent delignification-driven enzymatic hydrolysis and photo-fermentation: Effect of liquid–solid ratio. **Bioresource Technology**, v. 349, p. 126867, Apr. 2022.

JOPPERT C. L. **Análise da substituição energética do bagaço de cana-de-açúcar por biogás produzido a partir de resíduos de usinas de açúcar e álcool para produção de etanol 2G**. 2019. 232 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Energia e Ambiente, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Karimi, K.; TAHERZADEHA, M. J.; A critical review of analytical methods in pretreatment of lignocelluloses: Composition, imaging, and crystallinity. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 1008–1018, Jan. 2016.

LEITE, P.; SOUSA, D.; FERNANDES, H.; FERREIRA, M.; COSTA, A. P.; FILIPE, D.; GONÇALVES, M.; PERES, H., BELO, I.; SALGADO, J. M. Recent advances in production of lignocellulolytic enzymes by solid-state fermentation of agro-industrial wastes. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**. v. 27, p. 100407, Feb. 2021.

LENGOWSKI, E. C. **Caracterização e predição da cristalinidade de celulose através de espectroscopia no infravermelho e análise multivariada**. 2012. 73 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

LENGOWSKI, E. C.; MUNIZ, G. I. B.; NIGOSKI, S.; MAGALHÃES, W. L. E. Cellulose acquirement evaluation methods with different degrees of crystallinity. **Sci. For.**, Piracicaba, v. 41, n. 98, p. 185-194, jun. 2013.

LIN, C.; LU, C. Development perspectives of promising lignocellulose feedstocks for production of advanced generation biofuels: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** v.136, p. 110445, Feb. 2021.

LIU, Y., ZHENG, X., TAO, S. HU, L. ZHANG, X., LIN, X. Process optimization for deep eutectic solvent pretreatment and enzymatic hydrolysis of sugar cane bagasse for cellulosic ethanol fermentation. **Renewable Energy**, v. 177, p. 259-267, Nov. 2021.

MAEDA, R. N. **Produção de celulasas por *Penicillium funiculosum* em fermentação submersa de bagaço de cana pré-tratado e sua aplicação na produção de etanol de segunda geração**. 2010. 197 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

MALODE, S. J.; PRABHU, K. K.; MASCARENHAS, R. J. SHETTI, N. P.; AMINABHAVI, T. M. Recent advances and viability in biofuel production. **Energy Conversion and Management: X**, v. 10, p. 100070, June 2020.

MARTINS, M. A. R.; PINHO, S. P.; COUTINHO, J. A. P. Insights into the Nature of Eutectic and Deep Eutectic Mixtures. **Journal of Solution Chemistry**, v. 48, n. 7, p. 962-982, Aug. 2019.

MENDES, C. A. C. **Caracterização e utilização do resíduo de palha de milho para obtenção de nanocelulose**. 2014. 104 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, Mar. 1959.

MOREIRA, J. L. B., CARVALHO, C. B. M de, FROTA, C. C. **Visualização bacteriana e colorações**. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2015. E-book.

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

OH, Y.; PARK, S.; JUNG, D.; OH, K. K.; LEE, S. H. Effect of hydrogen bond donor on the choline chloride-based deep eutectic solvent-mediated extraction of lignin from pine wood. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 165, part A, p. 187-197, Dec. 2020.

OLIVEIRA M. R. de. **Aplicação da análise termogravimétrica na avaliação da interação entre os componentes do bagaço e da palha de cana-de-açúcar**. 2020. 102 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) - Faculdade de Engenharia do Campus de Guaratinguetá, Universidade Estadual Paulista, Guaratinguetá, 2020.

PEGO, M. F. F.; BIANCHI, M. L.; VEIGA, T. R. L. A. Avaliação das propriedades do bagaço de cana e bambu para produção de celulose e papel. **Revista de Ciência Agrária**, v. 62, Dec. 2019.

PELEGRINI, B. L.; RÉ, F.; OLIVEIRA, M. M.; FERNANDES, T.; OLIVEIRA, J. H.; JUNIOR, A. G. O.; GIROTTO, E. M.; NAKAMURA, C. V.; SAMPAIO, A. R. VALIM, A. LIMA, M. M. de S. Cellulose Nanocrystals as a Sustainable Raw Material: Cytotoxicity and Applications on Healthcare Technology. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 304, p. 1900092 June, 2019.

PEREIRA, F.C. **Bioconversão de açúcares provenientes de biomassa hidrolisada a etanol e pré-tratamento de materiais lignocelulósicos com líquidos iônicos**. 2015. 168 f. Tese

(Doutorado em Engenharia Química) - Escola de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2015.

PIN, T. C.; BRENELLI, L. B.; NASCIMENTO, V. M.; COSTA, A. C.; PU, YUNGIAO, RAGAUSKAS, A. J.; RABELO, S. C. Influence of chain length in protic ionic liquids on physicochemical and structural features of lignins from sugarcane bagasse. **Industrial Crops & Products**, v. 159, p. 113080, Jan. 2021.

POGGIALI, F. S. J.; BEZERRA, A. C. da S.; FIGUEIREDO, R.; AGUILAR, M. T. P. CELTIN, P. R.; SORAES, M. M. S. Caracterização da cinza de bagaço de cana de açúcar contaminada com quartzo proveniente da lavoura. In: 20º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, Joinville, 2012 **Anais...**, p. 238-244, 2012.

POLI, M. de. **Roadmap Tecnológico da Produção de Etanol de Segunda Geração a Partir do Bagaço e da Palha da Cana-de-Açúcar**. 2019. 226 f. Dissertação (Mestrado em Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

PROCENTESE, A.; JOHNSON, E.; ORR, V.; CAMPANILE, A. G.; WOOD, J. A.; MAEZOCHELLA, A.; REHMANN, L. Deep eutectic solvent pretreatment and subsequent saccharification of corncob. **Bioresource Technology** v.192, p. 31–36, Sept. 2015.

R. BCC, Global markets for enzymes in industrial applications, (Access 6 September 2021) <https://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/global-markets-for-enzymes-in-industrial-applications.html>, 2021

ROCHA, E. G. A. **Síntese, caracterização, uso e reciclo de líquidos iônicos próticos no pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar visando a produção de etanol de segunda geração**. 2016. 158 f. Tese (Doutor em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2016.

ROBAK, K.; BALCEREK, M. Review of Second Generation Bioethanol Production from Residual Biomass. **Food Technol Biotechnol**, v. 56, p. 174-187, June 2018.

RODRIGUEZ-ZÚÑIGA U. F.; FARINAS, C. S.; NETO, V. B.; COURI, S.; CRESTANA, S. Produção de celulasas por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. **Microbiologia. Pesq. agropec. bras.** v. 46, p. 912-919, ago. 2011.

ROY, R.; RAHMAN, Md S.; RAYNIE, D. E., Recent advances of greener pretreatment technologies of lignocellulose. **Current Research in Green and Sustainable Chemistry**, v.3, p. 100035, June 2020.

SAINI, J. K.; SAINI, R.; TEWARI, L. Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. **3 Biotech**, v. 5, p. 337-353, Aug. 2015.

SALDARRIAGA-HERNÁNDEZ, S.; VELASCO-AYALAA, C.; FLORES, L. P.; RASTRO-ALANIS, R.; PARRA-SALDIVAR, R.; IQBAL, H. M. N.; CARRILLO-NIEVES, D. Biotransformation of lignocellulosic biomass into industrially relevant products with the aid of fungi-derived lignocellulolytic enzymes. **International Journal of Biological Macromolecules** v. 161, p. 1099-1116, Oct. 2020.

SAMPAIO, Z. L. M.; SOUZA, P. A. B. F; GOUVEIA, B. G. Análise da influência das cinzas do bagaço de cana-de-açúcar no comportamento mecânico de concretos. **Revista IBRACON de Estruturas e Materiais**. v. 7, n. 4, 2014

SANTANA JUNIOR J. A. **Decomposição térmica da casca de soja pura e misturada com NaCl, MgCl₂ e ZnCl₂**. 2013. 169 f. Dissertação (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia Uberlândia-MG, 2013.

SANTOS, F.A.; QUEIRÓZ, J.H. DE; COLODETTE, J.L.; FERNANDES, S.A.; GUIMARÃES, V.M. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química nova**, v.35, n.5, p.1004–1010, Jan. 2012.

SANTOS, T. C.; GOMES, D. P. P.; BONOMO, R. C. F.; FRANCO, M. Optimisation of solid state fermentation of potato peel for the production of cellulolytic enzymes. **Food Chemistry**, v. 133, p. 1299-1304, Aug. 2012.

SANTOS, T. C. **Fermentação em estado sólido do farelo de palma forrageira: obtenção de enzimas industriais e enriquecimento proteico para utilização na alimentação de ruminantes**. 2013. 128 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2013.

SARAVANAN, A. P.; PUGAZHENDHI, A.; MATHIMANI, T. A comprehensive assessment of biofuel policies in the BRICS nations: Implementation, blending target and gaps. **Fuel** v. 272, p. 117635, July 2020.

SATLEWAL, A.; AGRAWAL, R.; DAS, P.; BHAGIA, S.; PU, Y.; PURI, S.K.; RAMAKUMAR, S.S.V.; RAGAUSKAS, A.J. Assessing the Facile Pretreatments of Bagasse for Efficient Enzymatic Conversion and Their Impacts on Structural and Chemical Properties. **ACS Sustainable Chem. Eng.** v.7 p. 1095-1104, Jan. 2019

SCHUSTER E.; Dunn-Coleman, N.; FRISVAD, J. C.; van DIJCK, P. W. M. On the safety of *Aspergillus niger* – a review. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.59 (4-5), p. 426–435, Jan. 2002.

SEGAL, L. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. **Textile Research Journal**, v. 29, n. 10, p. 786-794, Oct. 1959.

SILVA, A. S. da. **Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com líquidos iônicos: efeito na desestruturação da parede celular e na eficiência da hidrólise enzimática**. 2013. 127 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

SILVEIRA, R. L. **Aspectos moleculares da degradação da biomassa lignocelulósica: Dinâmica de enzimas e nanoarquitetura de paredes celulares de plantas**. 2014. 264 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de química, Universidade Estadual de Campinas, Instituto, Campinas, 2014.

SINGH, A.; BAJAR, S.; DEVI, A.; PANT, D. An overview on the recent developments in fungal cellulase production and their industrial applications. **Bioresource Technology Reports**, v. 14, p. 100652, June 2021.

SHARMA, V.; NARGOTRA, P.; SHARMA, S.; BAJAJ, B. Efficacy and functional mechanisms of a novel combinatorial pretreatment approach based on deep eutectic solvent and ultrasonic waves for bioconversion of sugarcane bagasse. **Renewable Energy**, v. 163, p. 1910-1922, Jan. 2020.

SLUITER, A., HAMES, B., RUIZ, R., SCARLATA, C. SLUITER, J., TEMPLETON, D. **Determination of Ash in Biomass**. In Laboratory Analytical Procedure (LAP), Biomass Anal Technol Team Lab Anal Proced, p. 1-5, Jan. 2008.

SLUITER, A., HAMES, B., RUIZ, R., SCARLATA, C. SLUITER, J., TEMPLETON, D. **Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass**. Laboratory Analytical Procedure (LAP). Biomass Anal Technol Team Lab Anal Proced, p. 1-14. Aug. 2012.

SMITH, E. L., ABBOTT, A. P., RYDER, K. S.: Deep eutectic solvents (DESs) and their applications. **Chem. Ver.**, v. 114, p. 11060–11082, Nov. 2014.

SOARES, B.; SILVESTRE, A. J. D.; PINTO, P. C. R.; FREIRE, C. S. R.; CARMEN, S. R. Hydrotrophy and Cosolvency in Lignin Solubilization with Deep Eutectic Solvents. **ACS Sustainable Chem. Eng.**, v. 7, p. 12485–12493, 2019.

SONG, Y.; CHANDRA, R. ZHANG, X.; TAN, T. SADDLER, J. Comparing Deep Eutectic Solvent (DES) to Hydrotropes for their Ability to Enhance the Fractionation and Enzymatic Hydrolysis of Willow and Corn Stover. **Sustainable Energy Fuels**, v. 3, p. 1329-1337, Apr. 2019.

SOUZA, E. E. de. **Síntese e caracterização de membranas de celulose regenerada a partir de celulose extraída do bagaço de cana-de-açúcar para produção de cuprofan**. 2009. 71 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2009.

SOUZA, G. de A. L. e. **Deep eutectic solvent como uma alternativa para a separação da mistura azeotrópica etanol e água via destilação extrativa**. 2019. 163 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2019.

STANKOVIC, I. **Dinâmica molecular de celulases, estudo de reconhecimento de substrato e propriedades conformacionais**. 2014. 123 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade estadual de campinas. Campinas, 2014.

STEFANOVIC, R.; LUDWIG, M.; WEBBER, G. B.; ATKIN, R.; PAGE, A. J. Nanostructure, hydrogen bonding and rheology in choline chloride deep eutectic solvents as a function of the hydrogen bond donor. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 19, p. 3297-3306, 2017.

TRILOKESH, C. & UPPULURI, K. B. Isolation and characterization of cellulose nanocrystals from jackfruit peel. **Sci Rep**, v. 9, p. 16709, Nov. 2019.

TRIVEDI, T. J.; LEE, J. H.; LEE, H. J.; JEONG, Y. K.; CHOI, J. W. Deep Eutectic Solvents as Attractive Media for CO₂ Capture. **Green Chemistry**, v. 18, p. 2834-2842 Jan. 2016

TURSI, A. A review on biomass: importance, chemistry, classification, and conversion. **Biofuel Research Journal**, v. 6, p. 962-979, June 2019.

TURA, A.; FONTANA, R.C.; CAMASSOLA, M., Schizosaccharomyces pombeas an Efficient Yeast to Convert Sugarcane Bagasse Pretreated with Ionic Liquids in Ethanol. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 186, p. 960-971 Dec. 2018.

VALERIANO, I. H., MARQUES, G. L., FREITA, S. P., COURI, S., PENHA, E. M., GONÇALVES, M. M. M. Cassava Pulp Enzymatic Hydrolysate as a Promising Feedstock for Ethanol Production. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 61, 2018.

VELOSO, E. C. T. **Aproveitamento de subprodutos agroindustriais para produção de lipase por fermentação em estado sólido pela linhagem mutante *Aspergillus niger* 11T53A14**. 2018. 100 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

WANG, L.; YANG, S.; Solid State Fermentation and Its Applications, In: YANG, S. **Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources**, Elsevier, 2007, cap. 18, p. 465-489.

WANG, Q.; YAO, X.; GRENG, Y.; ZHOU, Q.; LU, X.; ZHANG, S. Deep eutectic solvents as highly active catalysts for the fast and mild glycolysis of poly(ethylene terephthalate)(PET) **Green Chem.**, v. 17, p. 2473-2579, 2015.

WANG, W.; LEE, D. Lignocellulosic biomass pretreatment by deep eutectic solvents on lignin extraction and saccharification enhancement: A review. **Bioresource Technology**, v. 339, p. 125587, Nov. 2021.

WINTER, C.; KERROS, E.; & WEINBAUER, M. G. Effects of Sodium Azide on the Abundance of Prokaryotes and Viruses in Marine Samples. **PLOS ONE**, v. 7, p. e37597, May. 2012.

XING, W.; XU, G.; DONG, J.; R HAN, R.; NI, Y. Novel dihydrogen-bonding deep eutectic solvents: Pretreatment of rice straw for butanol fermentation featuring enzyme recycling and high solvent yield. **Chemical Engineering Journal**, v. 333, p. 712–720, Feb. 2018.

XU, H.; KONG, Y.; PENG, J.; SONG, X.; CHE, X.; LIU, S.; TIAN, W. Multivariate analysis of the process of deep eutectic solvent pretreatment of lignocellulosic biomass. **Industrial Crops and Products**, v. 150, p. 112363, Aug. 2020.

YOON, L. W.; ANG, T. N.; NGOH, G. C.; CHUA, A. S. M. Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production. **Biomass and Bioenergy**, v. 67, p. 319-338, Aug. 2014.

ZHANG, C.; XIA, S.; MA, P. Facile pretreatment of lignocellulosic biomass using deep eutectic solvents. **Bioresource Technology**, v. 219, p.1–5, Nov. 2016.

ZHUANG, J.; LI, M.; Pu, Y.; RAGAUSKAS, A.; YOO, C. G. Observation of Potential Contaminants in Processed Biomass Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy. **Applied Sciences**, v. 10, p. 4345, June 2020.