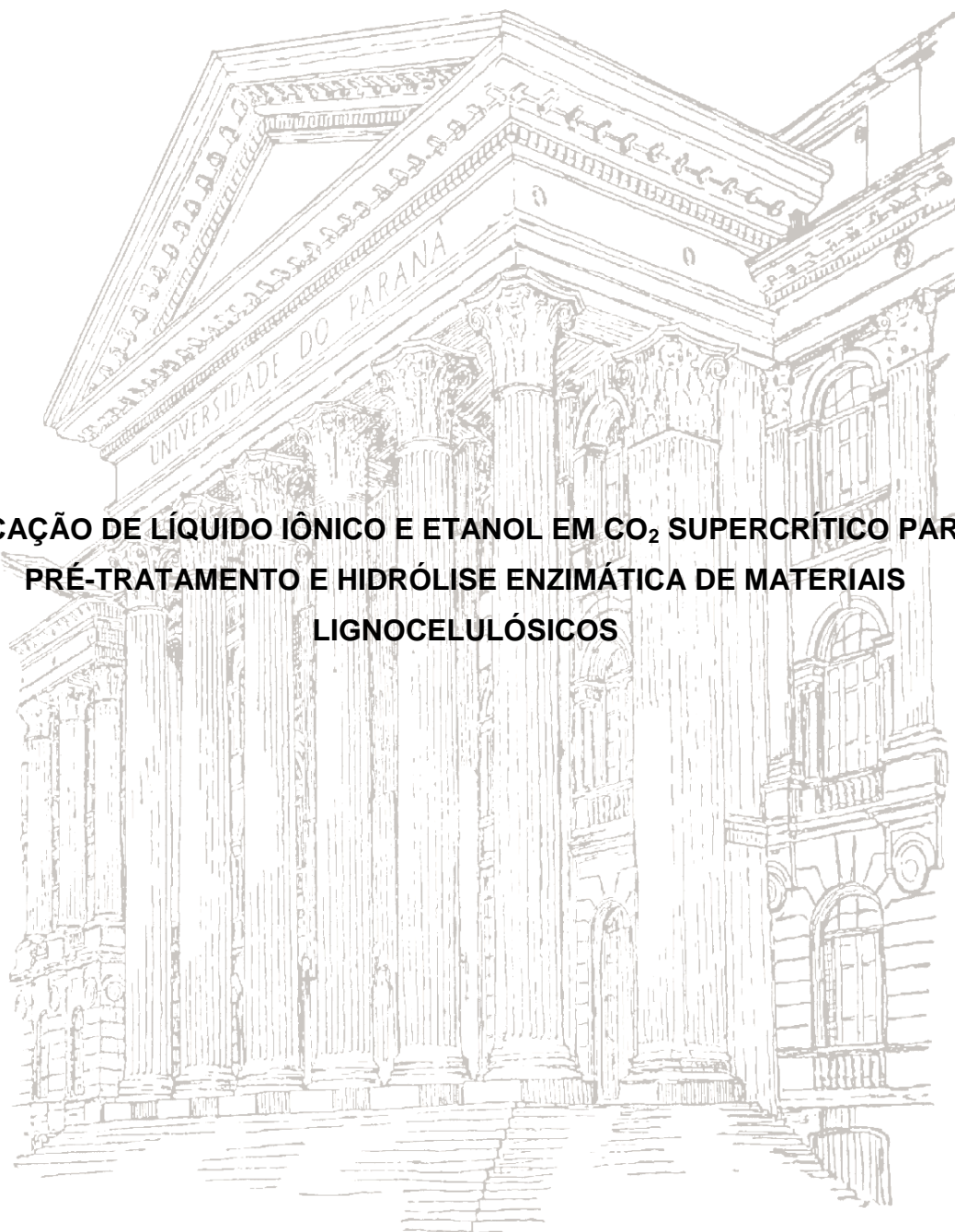


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRUNO ANGELO VANELLI

**APLICAÇÃO DE LÍQUIDO IÔNICO E ETANOL EM CO₂ SUPERCRÍTICO PARA O
PRÉ-TRATAMENTO E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE MATERIAIS
LIGNOCELULÓSICOS**



CURITIBA

2014

BRUNO ANGELO VANELLI

**APLICAÇÃO DE LÍQUIDO IÔNICO E ETANOL EM CO₂ SUPERCRÍTICO PARA O
PRÉ-TRATAMENTO E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE MATERIAIS
LIGNOCELULÓSICOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Química (sub-área de Química Orgânica), no curso de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos

CURITIBA

2014

V252a

Vanelli, Bruno Angelo

Aplicação de líquido iônico e etanol em co2 supercrítico para o pré-tratamento e hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos / Bruno Angelo Vanelli. – Curitiba, 2014.

113f. : il. [algumas color.] ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-graduação Química, 2014.

Orientador: Luiz Pereira Ramos

Bibliografia: p. 87-99.

1. Lignocelulose. 2. Hidrólise enzimática. 3. Química orgânica. I. Universidade Federal do Paraná. II. Ramos, Luiz Pereira. III. Título.

CDD: 660.63

TERMO DE APROVAÇÃO

**APLICAÇÃO DE LÍQUIDO IÔNICO E ETANOL EM CO₂ SUPERCRÍTICO PARA O
PRÉ-TRATAMENTO E A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE MATERIAIS
LIGNOCELULÓSICOS**

por

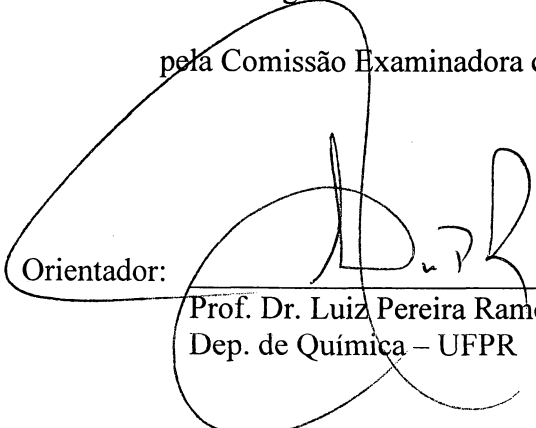
BRUNO ANGELO VANELLI

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de

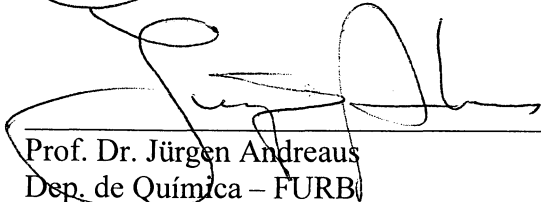
Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química,

pele Comissão Examinadora composta por:

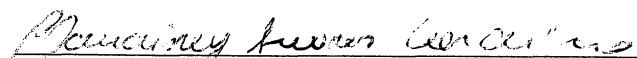
Orientador:



Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos
Dep. de Química – UFPR



Prof. Dr. Jürgen Andreaus
Dep. de Química – FURB



Prof. Dr. Claudiney Soares Cordeiro
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 30 de setembro de 2014.

"The time has gone, the song is over, thought I'd something more to say".

Roger Waters

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Luciana e Francisco, pelo amor, educação e apoio incondicional.

À minha namorada Camille pelo amor, carinho e companheirismo demonstrado mesmo nas horas mais difíceis.

Ao meu irmão Vinícius e meu primo Gabriel por serem desde sempre meus grandes parceiros.

Aos meus queridos avós Rosa e José, meus tios Natal, José e Maria, por terem me acolhido e ajudado desde os primeiros anos de graduação.

À minha vó Jandira, meus tios Cristiano e Angela, meu afilhado Pedro César e minha prima Mariana, que mesmo estando longe nunca deixaram de demonstrar seu carinho e consideração por mim.

Ao Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos pela orientação, competência e ótimo exemplo de caráter e profissionalismo.

Ao grande amigo Dr. Marcos Silveira, que foi meu companheiro e “co-orientador” do início ao fim dessa jornada e que sempre será lembrado com carinho por todos os momentos que passamos.

Ao brother Mateus Barbian Urio pelos momentos de descontração e pela ajuda incansável no término desse trabalho.

À sister Priscila Vinholi pela parceria desde os primeiros experimentos até a conclusão desta etapa.

Aos amigos e colegas de CEPESQ, em especial para os amigos Luana e Edilson, Ana Paula, Arion, Marcus, Esther, Vinícius, Carlos, Douglas, Tatyana, Kanda, Alexis, Débora, Laís, Gustavo.

Aos queridos amigos em especial para Gustavo Lima, Willian Levinski, Acauã Kindlein, Felipe Amaral Silva, Alberto Granzotto, Luiz Chesini, Felipe Poyer, Ana Paula Moreira por terem sido importantes durante toda a minha vida.

Ao professor Marcos Corazza, pela ajuda e esclarecimentos nos ensaios realizados em seu laboratório.

À professora Elina Caramão, pela oportunidade de uso de suas instalações e por me receber de braços abertos no período que estava em Porto Alegre.

À CAPES pela bolsa concedida.

Ao CNPq pelo financiamento.

À Universidade Federal do Paraná, minha casa há 8 anos e que considero um dos lugares mais especiais da minha vida.

RESUMO

Materiais lignocelulósicos são recursos renováveis considerados promissores para a produção de combustíveis e insumos químicos em processos denominados biorrefinarias. Atualmente, as biorrefinarias baseadas em rotas bioquímicas são voltadas à produção de etanol celulósico. No entanto, a alta coesão entre os principais componentes da parede celular - celulose, hemiceluloses e lignina - dificulta a acessibilidade química dos polissacarídeos à hidrólise enzimática. Desta maneira, diversos tipos de pré-tratamento têm sido desenvolvidos para se superar as barreiras físico-químicas da lignocelulose e obter maiores rendimentos em monossacarídeos. Dentre estes, a utilização de líquidos iônicos (LI) como solventes de lignocelulose ganhou destaque no meio científico devido à capacidade destes em dissolverem ou desconstruírem seletivamente estes materiais. Porém, o uso de baixa consistência de lignocelulose em relação aos LI torna este processo oneroso devido ao custo desses reagentes. Por este motivo, uma nova tecnologia foi desenvolvida onde o LI acetato de 1-butil-3-metilimidazol ([Bmim][OAc]) e etanol foram utilizados como cossolventes na presença de CO₂ supercrítico, em processo denominado scCO₂/EtOH-LI, com o intuito de diminuir o uso de LI a 1 g g⁻¹ de biomassa. Esta nova tecnologia está baseada na deslignificação parcial da biomassa pela remoção de complexos lignina-carboidrato (CLC) e no aumento da acessibilidade dos substratos produzidos à hidrólise enzimática. No presente trabalho, a aplicabilidade deste método foi investigada para quatro tipos de biomassas, a palha da cana-de-açúcar, o capim-elefante e as serragens de *Pinus taeda* e *Eucalyptus urograndis*, utilizando materiais pré-extraídos com etanol 95 % e condições que foram pré-otimizadas para o bagaço de cana em estudos anteriores (250 bar a 110 e 180 °C). Em linhas gerais, observou-se que o uso da maior temperatura promoveu uma maior deslignificação dos materiais, que foi de 42,3 % para a palha, 45,9 % para capim-elefante, 26,6 % para pinus e 32,8 % para eucalipto, e permitiu a recuperação mássica da maior parte dos carboidratos presentes nos materiais de origem. A remoção de CLCs permitiu grandes ganhos de acessibilidade que resultaram em maiores conversões em monossacarídeos utilizando-se uma pequena quantidade da enzima Cellic CTec3 (10 mg de enzima líquida por grama de substrato; 2,26 ARS_{Tot} g⁻¹), cujos rendimentos de hidrólise em relação ao material de origem aumentaram 3,4 vezes para a palha, 2,1 vezes para o capim-elefante, 2,2 vezes para pinus e 5,9 vezes para o eucalipto. A hidrólise também foi realizada na presença de atividade hemicelulásica da Cellic HTec3 (10 % em relação à Cellic CTec3) e esta não só permitiu a recuperação dos carboidratos das hemiceluloses em alto rendimento como também aumentou as conversões de glucanas em 18,4 % para a palha, 21,8 % para o capim-elefante, 17,8 % para o pinus e 22,4 % para o eucalipto. O grau de deslignificação dos substratos e seus rendimentos de hidrólise, nas condições utilizadas neste estudo, apresentaram correlação direta com mudanças no seu índice de cristalinidade (Crl), mas o aumento da acessibilidade foi preferencialmente atribuído ao efeito da deslignificação. Por fim, os extratos etanólicos oriundos do preparo das amostras para o pré-tratamento foram analisados por GCxGC/TOF-MS e seus componentes majoritários caracterizados.

Palavras-chave: lignocelulose, pré-tratamento, CO₂ supercrítico, líquidos iônicos, deslignificação, hidrólise enzimática.

ABSTRACT

Lignocellulosic materials are considered promising renewable resources for the production of fuels and chemicals in processes generically called biorefineries. Currently, most biorefineries are based on biochemical pathways aiming to produce cellulosic ethanol and other coproducts. However, the high cohesion between the main components of the cell wall – cellulose, hemicelluloses and lignin – hinders the chemical accessibility of polysaccharides to enzymatic hydrolysis. Thus, different types of pretreatment have been developed to overcome these physicochemical barriers and to obtain higher yields monosaccharides from the lignocellulosic matrix. Among these, the use of ionic liquids (IL) as biomass solvent stood out in the scientific community due to their ability to selectively dissolve or deconstruct these recalcitrant materials. However, the use of low total solids in relation to the amount of IL makes this process very expensive due to the cost of the required reagents. For this reason, a new technology was developed in which the IL 1-butyl-3-methylimidazolium acetate ([Bmim][OAc]) and ethanol were used together as co-solvents in the presence of supercritical CO₂ in an attempt to reduce the required amount of IL to 1 g g⁻¹ or less. This new technology, which was recently named scCO₂/EtOH-IL, is based on the partial delignification of biomass through the removal of lignin-carbohydrate complexes (LCC) with the aim to increase of accessibility of these substrates to enzymatic hydrolysis. In the present work, the applicability of this method was investigated for four types of biomass, sugarcane straw, elephant grass and *Pinus taeda* and *Eucalyptus urograndis* sawdusts, by employing materials that were pre-extracted with ethanol 95 % and conditions that have been pre-optimized for sugarcane bagasse in previous studies (250 bar at 110 and 180 °C). In general, higher pretreatment temperatures promoted higher biomass delignification, which were 42.3 % for cane straw, 45.9 % for elephant grass, 26.6 % for pine sawdust and 32.8 % eucalypt sawdust, resulting in the mass recovery of most of the carbohydrates present in the original materials. Removal of LCCs allowed large gains in accessibility that resulted in higher conversion plant polysaccharides into soluble sugars by using a small amount of the enzyme Cellic CTec3 (10 mg of liquid enzyme per gram of substrate; 2.26 ARS_{Tot} g⁻¹), whose hydrolysis yields increased 3.4-fold for cane straw, 2.1-fold for elephant grass, 2.2-fold for pine and 5.9-fold for eucalyptus compared to the original materials. Hydrolysis was also performed in the presence of the hemicelulase activity of Cellic HTec3 (10 % in relation of Cellic CTec3) and this not only allowed the recovery of hemicellulose carbohydrates at high yield but also increased conversions of glucan in 18.4 % for cane straw, 21.8 % for elephant grass, 17.8 % for pinus and 22.4 for eucalyptus. The degree of delignification of the substrates and their hydrolysis yields under the conditions used in this study showed a direct correlation with changes in their crystallinity index (CrI), but the increased accessibility of pretreated substrates was preferably attributed to the effect of the delignification. Finally, the ethanolic extracts that were obtained during sample preparation for pretreatment were analyzed by GCxGC/TOF-MS and their major components were characterized.

Keywords: lignocellulose, pretreatment, supercritical CO₂, ionic liquids, delignification, enzymatic hydrolysis.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESTRUTURA QUÍMICA DA CELULOSE. (A) CELOBIOSE, (B) CADEIAS DE CELULOSE ADJACENTES, EVIDENCIANDO A FORMAÇÃO DE UMA REDE DE LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO INTRAMOLECULARES (EM AZUL) E INTERMOLECULARES (EM VERMELHO).....	22
FIGURA 2 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DE COMPONENTES ENCONTRADOS NAS HEMICELULOSES.....	24
FIGURA 3 – MODELO ESTRUTURAL DE 4-O-METIL-GLUCURONOARABINOXILANA TÍPICAMENTE PRESENTE EM GRAMÍNEAS. ...	26
FIGURA 4 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS ÁLCOOIS CINÂMICOS PRECURSORES DA LIGNINA.	27
FIGURA 5 – MODELOS ESTRUTURAIS DE LIGNINA ISOLADA DA CONÍFERA ABETO E OS PRINCIPAIS TIPOS DE LIGAÇÕES QUÍMICAS EVIDENCIADAS POR QQ-HSQC E RMN DE ³¹ P.....	29
FIGURA 6 – ESTRUTURA HIPOTÉTICA DE COMPLEXO LIGNINA-CARBOIDRATO DE 4-O-METILGLUCURONOARABINOXILANAS DE GRAMÍNEAS.....	32
FIGURA 7 – POSSÍVEIS INTERAÇÕES DO CÁTION E ÂNION DO LI [Bmim][OAc] COM AS HIDROXILAS DOS RESÍDUOS DE ANIDROGLUCOSE PRESENTES NA CELULOSE.	38
FIGURA 8 – REPRESENTAÇÃO PICTÓRICA DA AÇÃO DAS ENZIMAS E PROTEÍNAS AUXILIARES DO COMPLEXO CELULOLÍTICO SOBRE A ESTRUTURA ASSOCIATIVA DA CELULOSE.....	45
FIGURA 9 – DIAGRAMA DA PRODUÇÃO DE BIOETANOL BASEADO NA UTILIZAÇÃO DE ETANOL, LÍQUIDO IÔNICO E CO ₂ SUPERCRÍTICO NO PRÉ-TRATAMENTO DE BIOMASSA.	50
FIGURA 10 – DIAGRAMA 3D DERIVADO DA ANÁLISE DO EXTRATO ETANÓLICO DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR POR GCXGC/TOF-MS.....	58
FIGURA 11 – DIAGRAMA 3D DERIVADO DA ANÁLISE DO PADRÃO DE ÁCIDO <i>p</i> -CUMÁRICO POR GCXGC/TOF-MS.	59
FIGURA 12 – DIAGRAMA 3D DERIVADO DA ANÁLISE DO EXTRATO ETANÓLICO DO CAPIM-ELEFANTE POR GCXGC/TOF-MS.	60
FIGURA 13 – DIAGRAMA 3D DERIVADO DA ANÁLISE DO EXTRATO ETANÓLICO DA SERRAGEM DE <i>Pinus taeda</i> POR GCXGC/TOF-MS.....	62
FIGURA 14 – DIAGRAMA 3D DERIVADO DA ANÁLISE DO EXTRATO ETANÓLICO DA SERRAGEM DE <i>Eucalyptus urograndis</i> POR GCXGC/TOF-MS.....	62

FIGURA 15 – DESEMPENHO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA FRENTE AOS DIFERENTES TEORES DE GLUCANAS PRESENTES NOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS.....	77
FIGURA 16 – DIFRATOGRAMAS DE RAIOS-X DOS MATERIAIS DERIVADOS DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR E CAPIM ELEFANTE: MEE (PRETO), PRÉ-TRATADOS EM 110 °C (VERMELHO) E EM 180 °C (AZUL).....	81
FIGURA 17 – DIFRATOGRAMAS DOS MATERIAIS DERIVADOS DE SERRAGEM DE PINUS E DE EUCALIPTO: MEE (PRETO), PRÉ-TRATADOS EM 110 °C (VERMELHO) E EM 180 °C (AZUL).....	82
FIGURA 18 – CORRELAÇÃO ENTRE ÍNDICE DE CRISTALINIDADE DOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS E SEUS (A) TEORES DE LIGNINA, (B) CONVERSÃO ENZIMÁTICA COM Cellic CTec3, E (C) CONVERSÃO ENZIMÁTICA COM Cellic CTec3 + 10% DE Cellic HTec3 (●, PALHA DE CANA; ○, CAPIM-ELEFANTE; ◐, SERRAGEM DE PINUS; ◑, SERRAGEM DE EUCALIPTO).	84

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS <i>IN NATURA</i>	64
TABELA 2 – BALANÇO MÁSSICO DO PRÉ-TRATAMENTO DOS DIFERENTES MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS UTILIZANDO $scCO_2/EtOH-LI$	67
TABELA 3 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS EXTRAÍDOS COM ETANÓL 95 % E PRÉ-TRATADOS POR $scCO_2/EtOH-LI$	69
TABELA 4 – RECUPERAÇÃO MÁSSICA RELATIVA DOS COMPONENTES MAJORITÁRIOS DOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS APÓS O PRÉ-TRATAMENTO COM $scCO_2/EtOH-LI$	70
TABELA 5 – TEOR MOLAR DE CARBOIDRATOS E GRUPOS ACETILA POR 100 g DOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS SUBMETIDOS AO PRÉ-TRATAMENTO.	73
TABELA 6 – CONVERSÕES ENZIMÁTICAS OBTIDAS PARA OS DIFERENTES MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS EMPREGANDO Cellic CTec3 NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE Cellic HTec3.	75
TABELA 7 - PARÂMETROS CRISTALOGRÁFICOS CALCULADOS A PARTIR DOS DIFRATOGRAMAS DE DIFRATOMETRIA DE RAIOS-X.	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

[Bmim][OAc] – Acetato de 1-butil-3-metilimidazol

[Emim][OAc] – Acetato de 1-etil-3-metilimidazol

[Emim][PO₄] – Fosfato de 1-etil-3-metilimidazol

[Mmim][Cl] – Cloreto de 1-metil-3-metilimidazol

¹D – Primeira dimensão nas análises de GCxGC/TOFMS

¹t_R – Tempo de retenção da primeira dimensão nas análises de GCxGC/TOFMS

²D – Segunda dimensão nas análises de GCxGC/TOFMS

²t_R – Tempo de retenção da segunda dimensão nas análises de GCxGC/TOFMS

AA9 – Atividades Auxiliares da família 9

ARS – Atividade capaz de liberar açúcar redutor (do inglês, *Activity Able to Release Reducing Sugars*)

AR_{Tot} – Açúcares redutores totais

CBM – Módulo de ligação a carboidrato (do inglês, *Carbohydrate Binding Module*)

CE – Capim-Elefante

CLAE – Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência

CLC – Complexo Lignina-Carboidrato

CrI – Índice de cristalinidade

DC – Domínio Catalítico

DHE – Desempenho da Hidrólise Enzimática

DI – Diâmetro Interno

DNS – Ácido 3,5-dinitrosalicílico

DRX – Difractometria de Raios-X

EnG – Endoglucanase

EtOH – Etanol

ExG – Exoglucanase

FPU – Unidade de papel filtro (do inglês Filter Paper Unit)

FT-IR – Espectrometria na região do infravermelho com transformada de Fourier (do inglês *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)

GCxGC/TOF-MS – cromatografia de fase gasosa bidimensional abrangente com detecção por espectrometria de massas por tempo de voo

GH61 – Glucosil hidrolases da família 61

HDSF – do inglês *High Density Steam Flash-Explosion*.

HMF – Hidroximetilfurfural

IC – Cromatografia iônica (do inglês *ion chromatography*)

IR – Índice de retenção

LI – Líquido Iônico

LPMO – Monooxigenases polissacarolíticas (do inglês *Lytic Polysaccharide Monooxygenases*)

MEE – Material extraído com etanol 95 %

MWL – Lignina de madeira moída (do inglês *milled wood lignin*)

NIST – *National Institute of Standards and Technology*

NREL – *National Renewable Energy Laboratory*

P_c – Pressão crítica

PFW – Papel filtro Whatman nº1

QQ-HSQC – do inglês *Quick Quantitative-Heteronuclear Single-Quantum Correlation*

R_M – Rendimento mássico

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

SCB – Bagaço de cana-de-açúcar (do inglês, *sugarcane bagasse*)

scCO₂ – Dióxido de carbono supercrítico

T_c – Temperatura crítica

TOF-MS – Espectrometria de massas por tempo de voo (do inglês *Time of Flight Mass Spectrometry*)

UI – Unidades Internacionais

UV – Ultravioleta

β G – Beta-glucosidase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1. ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA BIOMASSA.....	18
2.1.1. ULTRAESTRUTURA DA PAREDE CELULAR	18
2.1.2. CELULOSE.....	20
2.1.3. HEMICELULOSES	23
2.1.4. LIGNINA	27
2.1.5. COMPLEXOS LIGNINA-CARBOIDRATO	30
2.1.6. COMPONENTES MINORITÁRIOS	31
2.2. PRÉ-TRATAMENTO DE LIGNOCELULOSE	33
2.3. PRÉ-TRATAMENTO UTILIZANDO LÍQUIDOS IÔNICOS	37
2.4. PRÉ-TRATAMENTO UTILIZANDO CO ₂ SUPERCRÍTICO	40
2.5. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE LIGNOCELULOSE	42
3. OBJETIVOS	46
3.1. OBJETIVO PRINCIPAL.....	46
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
4.1. MATERIAIS	47
4.2. EXTRAÍVEIS	47
4.2.1. EXTRAÇÃO DE BIOMASSA	47
4.2.2. CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRAÍVEIS POR CROMATOGRAFIA DE FASE GASOSA BIDIMENSIONAL ABRANGENTE E ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CGXCG/TOF-MS).....	48
4.3. DETERMINAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE CINZAS.....	49
4.4. PRÉ-TRATAMENTO DE SUBSTRATOS EM SISTEMA SUPERCRÍTICO	49
4.5. ANÁLISE DE ÂNION ACETATO RESIDUAL NOS MATERIAIS PRÉ- TRATADOS.....	51
4.6. ANÁLISE QUÍMICA DOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS.....	51
4.7. DETERMINAÇÃO DO BALANÇO DE MASSA NOS ENSAIOS DE PRÉ- TRATAMENTO.....	53
4.8. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.....	53
4.8.1. DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE CELULÁSICA TOTAL	53

4.8.2. DETERMINAÇÃO DE DESEMPENHO ENZIMÁTICO NA HIDRÓLISE DOS SUBSTRATOS PRÉ-TRATADOS POR $scCO_2/EtOH-LI$	54
4.9. DIFRATOMETRIA DE RAIOS-X.....	55
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
5.1. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRAÍVEIS.....	57
5.1.1. CROMATOGRAFIA DE FASE GASOSA BIDIMENSIONAL (GCxGC/TOF-MS).....	57
5.2. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS MATERIAIS <i>IN NATURA</i>	63
5.3. PRÉ-TRATAMENTO DOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS COM $scCO_2/EtOH-LI$	66
5.4. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS SUBSTRATOS PRÉ-TRATADOS POR $scCO_2/EtOH-LI$	68
5.5. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.....	74
5.6. DIFRATOMETRIA DE RAIOS-X (DRX).....	78
6. CONCLUSÃO.....	85
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
ANEXO 1 – RESULTADOS DE CGXCG/TOF-MS PARA O EXTRATO ETANÓLICO DE PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	100
ANEXO 2 – RESULTADOS DE CGXCG/TOF-MS PARA O EXTRATO ETANÓLICO DE CAPIM ELEFANTE.....	103
ANEXO 3 – RESULTADOS DE CGXCG/TOF-MS PARA O EXTRATO ETANÓLICO DE <i>Pinus taeda</i>	106
ANEXO 4 – RESULTADOS DE CGXCG/TOF-MS PARA O EXTRATO ETANÓLICO DE <i>Eucalyptus urograndis</i>	110

1. INTRODUÇÃO

A biomassa é a fonte de energia renovável de maior disponibilidade para produção de biocombustíveis e insumos químicos (SCHUCHARDT *et al.*, 2000). Esta alternativa é fundamental para que haja uma mudança significativa no panorama mundial do uso de recursos energéticos, onde cerca de 75 % do consumo primário de energia é suprido pelo petróleo, carvão e gás natural (STOCKER, 2008). A substituição progressiva da matriz energética é urgente em virtude da necessidade de diminuição das emissões de um dos principais gases causadores do efeito estufa, o dióxido de carbono (CO₂), que também é gerado na utilização de combustíveis obtidos a partir da biomassa, mas que, neste caso, é parcialmente absorvido durante a fotossíntese (STOCKER, 2008).

Um importante exemplo da produção de combustíveis a partir de recursos renováveis vem da indústria sucroalcooleira do Brasil, que converte a sacarose presente na cana-de-açúcar em etanol cuja utilização em comparação com a gasolina pode diminuir em até 80 % as emissões de gases causadores do efeito estufa (FAO, 2008). Durante a safra 2012/2013 foram produzidos no Brasil 24 bilhões de litros de etanol a partir de 602 milhões de toneladas de cana (CANILHA *et al.*, 2012). Entretanto, este processo compete diretamente com a produção de alimentos, pois a sacarose utilizada na fermentação poderia ser destinada ao refino para obtenção de açúcar, que pode ser, inclusive, mais rentável para esta indústria devido às oscilações do valor de mercado desses produtos (CHANDEL *et al.*, 2014). Além disso, no processamento da cana-de-açúcar foram gerados como resíduos 169 e 84 milhões de toneladas de bagaço e palha, respectivamente (CANILHA *et al.*, 2012). Usualmente, estes resíduos podem ser utilizados tanto para a co-geração de energia através de sua queima, como para adubagem e preparo da terra para um novo plantio. Porém, essas técnicas consomem apenas uma pequena parte do que é gerado e, desta maneira, milhões de toneladas de biomassa permanecem acumuladas nos entornos das sucroalcooleiras. Outros tipos de biomassas residuais relevantes são obtidos no Brasil a partir das indústrias florestais, como a de papel e celulose, que se utilizam de matérias-primas como pinus e eucalipto. Estima-se que o Brasil produza mais de 38 milhões de toneladas de resíduos florestais desse tipo por ano, dos quais aproximadamente 16 milhões de toneladas são gerados nas indústrias sob a forma de cavacos e serragem (FERREIRA-LEITÃO *et al.*, 2010). Por

outro lado, alguns vegetais de crescimento rápido se encontram em grande disponibilidade e produzem altas quantidades de biomassa em pouco tempo. Um exemplo disso é o capim-elefante, que pode atingir até 40 toneladas de biomassa seca em um hectare por ano e pode ser colhido de 2 a 4 vezes ao ano devido ao seu rápido crescimento, principalmente em regiões tropicais (CARVALHO, 1985).

Estes resíduos agroindustriais, florestais e agrícolas de crescimento rápido são materiais lignocelulósicos constituídos basicamente por polissacarídeos como celulose e hemiceluloses e compostos poliaromáticos substituídos como a lignina, além de componentes minoritários de baixa massa molecular (extrativos), proteínas e compostos inorgânicos. Sabe-se que estes recursos podem ser potencialmente utilizados como matéria-prima para a obtenção de inúmeros produtos como combustíveis e insumos químicos.

Neste contexto, surgiu o advento das biorrefinarias lignocelulósicas que, por analogia às refinarias de petróleo, podem ser definidas como processos integrados que visam o aproveitamento e conversão máximos da lignocelulose a combustíveis, energia e insumos para a indústria química (NREL, 2014). Além disso, a utilização destes recursos não compromete a produção de alimentos e contribui com um desenvolvimento regional sustentável (PETROU e PAPPIS, 2009). Dentro das biorrefinarias, os processos de conversão da lignocelulose podem ser realizados a partir de rotas termoquímicas ou bioquímicas. As rotas termoquímicas consistem na conversão total da biomassa através de sua queima utilizando-se ou não de catalisadores para se obterem produtos intermediários, como o bio-óleo e gás de síntese, que, em uma nova etapa, são transformados em combustíveis e outros derivados (FOUST *et al.*, 2008). Por outro lado, as rotas bioquímicas utilizam biocatalisadores, como enzimas e células microbianas, cujo objetivo principal é desconstruir os polissacarídeos da biomassa em carboidratos para a produção de etanol e coprodutos que também podem ser convertidos a outros combustíveis e produtos químicos ou ainda serem utilizados na geração de energia para o processo (ADEN *et al.*, 2002).

Atualmente, o foco do desenvolvimento científico e tecnológico das rotas bioquímicas está voltado à conversão de celulose e hemiceluloses em etanol que, neste caso, é denominado etanol celulósico. A produção de biocombustível é realizada em cinco etapas principais, envolvendo (1) o pré-condicionamento da matéria-prima; (2) o pré-tratamento de biomassa, que tem por objetivo aumentar a

acessibilidade dos carboidratos à bioconversão; (3) a hidrólise enzimática, que consiste em converter os carboidratos a açúcares fermentescíveis; (4) a fermentação dos xaropes obtidos na etapa de hidrólise e por fim, (5) a recuperação do etanol através da destilação (WYMAN, 2007). O pré-tratamento é necessário porque a arquitetura e a eficiência da coesão entre os componentes na parede celular da lignocelulose limitam sua acessibilidade química e dificultam a utilização das macromoléculas. Por este motivo, esta etapa é crucial e deve proporcionar uma desestruturação ou fracionamento do material, tornando-o mais suscetível à degradação enzimática.

Dentre as tecnologias de pré-tratamento, os líquidos iônicos (LIs) têm sido propostos como solventes promissores para o processamento de biomassa com base na capacidade destes em dissolver a celulose (SWATLOSKI *et al.*, 2002) ou a lignocelulose como um todo (FORT *et al.*, 2007; KILPELÄINEN *et al.*, 2007; SUN *et al.*, 2009). Neste caso, o pré-tratamento consiste inicialmente na dissolução do material em LI, seguida da precipitação das frações obtidas pela adição de um antissolvente (geralmente aquoso) e filtração para regeneração do material celulósico. Por outro lado, os LI podem ser aplicados como solventes seletivos para a deslignificação de biomassa, principalmente com o auxílio de cossolventes orgânicos, com o intuito de produzir materiais ricos em carboidratos e frações de lignina sem grandes modificações químicas. Esta conservação da estrutura majoritária da lignina é importante para que as futuras biorrefinarias sejam economicamente viáveis, pois a recuperação de uma fração polifenólica de alta qualidade é vital para a obtenção de inúmeros materiais renováveis como fibras de carbono, membranas poliméricas, elastômeros e termoplásticos, além de hidrocarbonetos e compostos fenólicos em geral (RAGAUSKAS *et al.*, 2014).

Desta maneira, pré-tratamentos utilizando LIs como solventes de lignocelulose ou como ferramenta para desconstruí-la seletivamente resultam num aumento da acessibilidade do substrato à bioconversão, além de permitir a remoção parcial da lignina, dependendo-se do tipo de LI e das condições utilizadas como a temperatura da reação, por exemplo (BRANDT *et al.*, 2013). No entanto, a viabilidade de seu uso é ainda algo questionável devido ao alto custo desses reagentes e a baixa quantidade de biomassa em relação à de LI usualmente utilizada experimentalmente (BRANDT *et al.*, 2013). Diferentemente dos LIs, fluidos supercríticos, como o dióxido de carbono, são viáveis do ponto de vista industrial

devido a sua fácil recuperação, facilidade no reuso e em gerar substratos com baixo teor de umidade. Em contrapartida, os substratos gerados por estes pré-tratamentos apresentam baixa acessibilidade à bioconversão quando comparados com substratos pré-tratados por dissolução em LIs.

Com o intuito de desenvolver uma nova tecnologia de pré-tratamento, foi recentemente proposto por Silveira (2014) um método de fracionamento de bagaço de cana (SCB) empregando LIs na presença de dióxido de carbono supercrítico (scCO_2) e etanol ($\text{scCO}_2/\text{EtOH-LI}$). Esta tecnologia de pré-tratamento proporcionou 41 % de deslignificação de amostras de bagaço de cana livre de extraíveis e gerou um material rico em carboidratos que, por sua vez, apresentou alta acessibilidade frente à hidrólise enzimática. Uma das grandes contribuições deste método está no aumento da relação mássica entre biomassa e LI para 1 g g^{-1} , o que diminuiu drasticamente a quantidade de LI necessária no pré-tratamento.

Desta forma, o presente trabalho foi baseado no efeito do pré-tratamento por $\text{scCO}_2/\text{EtOH-LI}$ para outras matérias-primas relevantes no cenário nacional como a palha de cana de açúcar, o capim elefante e as serragens de pinus e eucalipto, com o objetivo de verificar a aplicabilidade do método para biomassas de diferentes estruturas de parede celular e composição química, utilizando-se das condições reacionais otimizadas para o bagaço de cana.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA BIOMASSA

O entendimento dos fatores químicos e estruturais que são responsáveis pela recalcitrância da parede celular de vegetais superiores é fundamental para a utilização da lignocelulose como matéria-prima nas biorrefinarias, principalmente para melhorar o rendimento dos produtos desejados como, por exemplo, na bioconversão dos polissacarídeos em seus respectivos monômeros destinados à fermentação alcoólica. Por este motivo, as próximas seções são dedicadas a uma melhor compreensão de como se organiza estruturalmente a biomassa, bem como na descrição das metodologias de pré-tratamento que podem ser utilizadas para romper as barreiras impostas pela parede celular e melhorar o seu aproveitamento como um todo.

A lignocelulose é composta majoritariamente por celulose, hemiceluloses e lignina. A distribuição média destas macromoléculas varia conforme a origem do material lignocelulósico, sendo que até $\frac{3}{4}$ de sua composição química pode ser de carboidratos na forma de polissacarídeos e aproximadamente $\frac{1}{4}$ de lignina (HENDRIKS e ZEEMAN, 2009). No caso de resíduos agroindustriais provenientes da cana-de-açúcar (gramíneas) tais como o bagaço, esta composição é 32 a 48 % de celulose, 19 a 24 % de hemiceluloses e de 23 a 32 % de lignina, enquanto que a palha da cana tem de 40 a 44 % de celulose, 30 a 32 % de hemiceluloses e 22 a 25 % de lignina (SANTOS *et al.*, 2012). Em biomassas oriundas de gimnospermas como o pinus (madeiras moles ou coníferas), o conteúdo de celulose varia de 40 a 55 %, hemiceluloses de 24 a 40 % e lignina de 18 a 25 %, enquanto que, em madeiras duras ou folhosas como o eucalipto, esta composição é de 45 a 50 % de celulose, 25 a 35 % de hemiceluloses e 25 a 35 % de lignina (HOWARD *et al.*, 2003).

2.1.1. ULTRAESTRUTURA DA PAREDE CELULAR

As células dos vegetais diferem em sua ultraestrutura e apresentam características diferentes conforme o tipo de biomassa de origem. As coníferas ou gimnospermas apresentam as paredes celulares muito homogêneas por possuírem em grande quantidade um único tipo de célula, os traqueídeos, que representam a

fase fibrilar da madeira e podem corresponder a 95 % da massa seca e do volume do xilema (CHUM *et al.*, 1985). Já as folhosas ou angiospermas possuem estruturas de maior complexidade, compostas por fibras e vasos que são responsáveis por 70 a 85 % e 10 a 15 % da massa seca do xilema, respectivamente (FENGEL e WEGENER, 1989). Entretanto, o volume ocupado pelas células presentes nas folhosas é de 45 a 65 % para as fibras e de 10 a 40 % para os vasos, respectivamente (FENGEL e WEGENER, 1989). Outras células que fazem parte das coníferas e folhosas são os parênquimas, que têm importante função no acúmulo de reservas energéticas; no entanto, estas células compõem somente 5 a 10 % e 10 a 30 % da massa seca de seus respectivos xilemas (CHUM *et al.*, 1985). A presença dos vasos para o transporte dos nutrientes e a maior quantidade relativa de células parenquimáticas são as principais características que diferenciam a parede vegetal das folhosas em relação às coníferas. Por sua vez, as gramíneas possuem uma maior quantidade de células parenquimáticas, por exemplo, para a reserva de sacarose na cana-de-açúcar. Estas podem representar de 30 a 70 % do volume do xilema, enquanto que as fibras e os vasos contribuem com 20 a 60 % e 1 a 10 % desse total, respectivamente (CHUM *et al.*, 1985). Estes dados, distintos para diferentes tipos de biomassa, permitem inferir que as coníferas ou folhosas são mais densas em relação às gramíneas devido a maior contribuição das fibras no conteúdo mássico. Neste caso, o uso de biomassas florestais em biorrefinarias pode ser vantajoso por possuírem alto conteúdo energético, porém, estas matérias-primas também implicam em maiores custos nas etapas de pré-processamento, como na diminuição do tamanho de partículas e no pré-tratamento para desconstrução da estrutura da parede celular (FOUST *et al.*, 2008). Entre os tipos de madeira, as coníferas apresentam uma ultraestrutura mais recalcitrante em relação às folhosas devido à menor presença de células parenquimáticas e da ausência do sistema vascular, que limitam a acessibilidade de agentes químicos ou enzimáticos à parede celular (JACOBS-YOUNG *et al.*, 1998).

Outro fator primordial relacionado à recalcitrância é a espessura da parede celular, que também limita a acessibilidade química aos componentes de interesse. A parede celular é normalmente dividida em lamela média, parede primária e parede secundária. A parede primária e a lamela média são pouco espessas, possuindo de 0,1 a 1,0 μm independentemente do tipo de célula (FERRAZ *et al.*, 2014). Já a parede secundária é a principal responsável pela espessura da parede celular, cuja

confilargura varia conforme o tipo de célula. Nas células parenquimáticas, por exemplo, as paredes secundárias são mais tênues, possuindo até 1,3 e 1,7 μm de espessura nas folhosas e gramíneas, respectivamente, enquanto que na fase fibrilar apresentam espessuras médias de 4,0 μm em ambos os casos (DANIEL, 2009). Por sua vez, os traqueídeos das gimnospermas possuem de 2,0 a 4,2 μm de espessura de parede secundária, cuja variação é dependente da idade da célula vegetal, ou seja, é mais espessa quanto mais antiga for a árvore (FENGEL e WEGENER, 1989).

As composições químicas das paredes primária e secundária também são diferentes. A parede primária é rica em pectinas e hemiceluloses, enquanto que a parede secundária é rica em celulose, hemiceluloses e lignina. A parede primária é mais acessível quimicamente e seus principais constituintes, as pectinas, podem ser removidas em extração com água quente (HARRIS e STONE, 2008). Porém, a maior parte dos componentes de interesse está localizada na parede secundária que é espessa e lignificada e, por este motivo, é o alvo das metodologias de pré-tratamento. Portanto, diferenças na proporção e tipo das células que compõem a parede celular já explicam grande parte da recalcitrância de diferentes materiais lignocelulósicos, bem como a dificuldade relativa ao seu processamento. As coníferas são mais difíceis de serem utilizadas em biorrefinarias por possuírem quase que exclusivamente células com paredes secundárias mais espessas e apresentarem um sistema vascular com ausência de vasos, o que dificulta a acessibilidade de agentes químicos e enzimáticos à parede celular. Por outro lado, as gramíneas podem ser mais facilmente utilizadas nestes processos por apresentarem maior quantidade de células parenquimáticas de parede secundária menos espessa. Outros fatores relacionados à recalcitrância estão relacionados à natureza e interações moleculares dos principais componentes da parede secundária, que serão abordados nos próximos itens.

2.1.2. CELULOSE

A celulose é o principal componente estrutural das células vegetais. Trata-se de um homopolímero linear constituído por unidades de anidro-D-glucose (anidro-D-glucopiranoose) unidas por ligações glicosídicas do tipo β -(1 \rightarrow 4) (FENGEL e WEGENER, 1989). O confômero, ou seja, a unidade que se repete ao longo da estrutura da celulose é a celobiose (4-O- β -D-glucopiranosil-D-glucopiranoose) que, por consequência da ligação glicosídica do tipo β -(1 \rightarrow 4), apresenta duas moléculas de

anidroglicose espacialmente invertidas entre si (FIGURA 1A). Estas ligações vão se repetindo ao longo da cadeia do homopolímero, interligando resíduos de anidroglicose cuja disposição equatorial dos grupos hidroxílicos remanescentes permite a formação de uma rede de ligações de hidrogênio que mantém o agregado termodinamicamente estável. Na celulose presente nos vegetais superiores (celulose I), cada unidade de anidroglicose pode fazer até três ligações de hidrogênio: duas intracadeia e uma com uma das hidroxilas de uma cadeia vizinha, denominada ligação intercadeia (FIGURA 1B) (QIAN, 2008). Estas interações permitem que as cadeias de celulose adjacentes se orientem linearmente umas em relação às outras formando planos ou lamelas que, por sua vez, interagem entre si por forças dispersivas de Van der Waals localizadas acima e abaixo dos anéis hemiacetálicos (NISHIYAMA *et al.*, 2002). O empacotamento origina um agregado supramolecular de alta organização que é denominada celulose cristalina (RAMOS, 2003), cuja baixa permeabilidade limita a acessibilidade química de reações de hidrólise (KRASSIG, 1993). Sabe-se, porém, que a celulose cristalina é separada por regiões de menor organização denominadas de celulose amorfa, onde as cadeias são arranjadas de maneira randomizada e, conseqüentemente, são mais suscetíveis à hidrólise (BON *et al.*, 2008).

Nas regiões de maior organização estrutural, a celulose apresenta planos de simetria que podem ser medidos pela técnica de difração de raios-X (DRX). O perfil difratométrico obtido apresenta, quando utilizada a raia $K\alpha$ de átomos de cobre, picos inerentes aos planos $1\bar{1}0$, 110, 200 e 400 que possuem seu ponto de máximo nos ângulos de Bragg de $14,9^\circ$, $16,8^\circ$, $22,5^\circ$ e $34,5^\circ$ de 2θ , respectivamente (WADA *et al.*, 2003). A análise dos difratogramas permite obter, através da Lei de Bragg (BRAGG, 1913), as distâncias interplanares definidas na estrutura, enquanto que a largura média dos cristais de celulose pode ser calculada a partir da equação de Scherrer descrita por Patterson (1939). Por fim, através de metodologias como a de Segal *et al.* (1959) pode-se determinar o índice de cristalinidade de materiais lignocelulósicos, que advém da relação entre as intensidades da reflexão 200 em $22,5^\circ$ de 2θ e da contribuição de fase amorfa em $18,5^\circ$ de 2θ . Portanto, a interpretação dos dados obtidos por DRX permite inferir sobre alterações estruturais da celulose e/ou de materiais lignocelulósicos, porém, isto depende de um preparo adequado da amostra, evitando artefatos causados pelos procedimentos de secagem e moagem do material (PARK *et al.*, 2010).

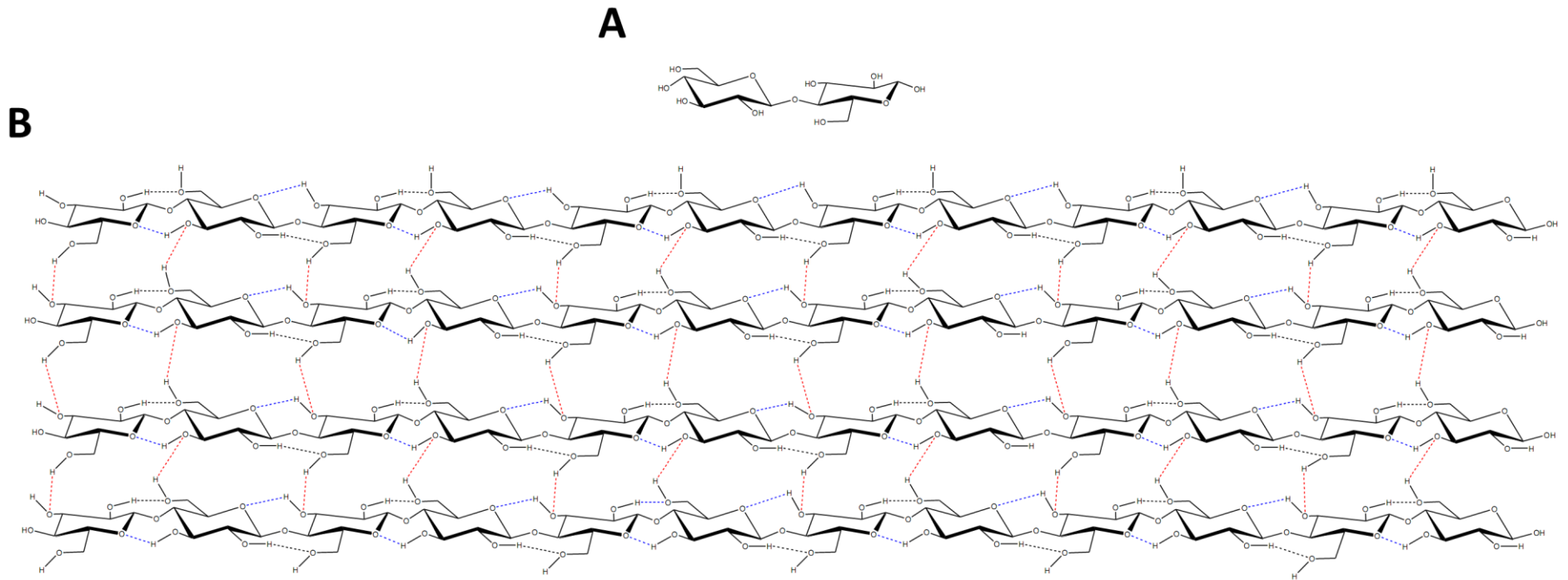


FIGURA 1 – ESTRUTURA QUÍMICA DA CELULOSE. (A) CELOBIOSE, (B) CADEIAS DE CELULOSE ADJACENTES, EVIDENCIANDO A FORMAÇÃO DE UMA REDE DE LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO INTRAMOLECULARES (EM AZUL) E INTERMOLECULARES (EM VERMELHO).
FONTE: SILVEIRA *et al.* (2014b).

As análises de DRX também permitem diferenciar a celulose nativa (ou celulose I), que é a sua forma alomórfica mais comum, da celulose mercerizada (ou celulose II), que é obtida a partir do tratamento alcalino da primeira com hidróxido de sódio aquoso e posterior regeneração (DINAND *et al.*, 2002). Neste caso, a estrutura da celulose mercerizada é mais estável que a celulose nativa por apresentar uma disposição antiparalela das cadeias de glucanas, o que leva à formação de uma rede de ligações de hidrogênio mais rígida, caracterizada inclusive pelo aumento da incidência de ligações de hidrogênio interplanares (KOLPAK e BLACKWELL, 1976; NISHIYAMA *et al.*, 2002). Este fato explica porque não pode se reverter uma transformação de celulose nativa em celulose mercerizada, pois isto seria termodinamicamente proibitivo devido à diminuição na entropia do sistema (SARKO, 1986). Além das celuloses do tipo I e II, existem ainda outras formas alomórficas decorrentes do tratamento química da celulose nativa, mas estas estruturas não foram revisadas por não apresentarem relevância para o presente trabalho.

Finalmente, o comprimento da cadeia de celulose é caracterizado pelo seu grau de polimerização, que representa o número de unidades de anidroglicose interligadas ao longo da cadeia. Segundo alguns autores, o grau de polimerização da celulose I varia de acordo com sua origem e localização na parede celular, sendo de até 6000 unidades de anidroglicose na parede primária e de até 14000 na parede secundária (HARRIS e STONE, 2008).

2.1.3. HEMICELULOSES

Ao contrário da celulose, as hemiceluloses são heteropolissacarídeos que podem apresentar ramificações em sua cadeia cuja composição química varia conforme a matriz lignocelulósica (FENGEL e WEGENER, 1989). Assim, as hemiceluloses podem conter pentoses (D-xilose, L-arabinose), hexoses (D-glucose, D-manose e D-galactose), ácidos urônicos (ácido 4-O-metil-D-glucurônico, por exemplo) e, eventualmente, ácido acético (BEG *et al.*, 2001), cujas estruturas estão representadas na FIGURA 2. Além disso, devido às ramificações presentes nos polissacarídeos que as constituem, as hemiceluloses formam arranjos estruturais menos organizados do que a celulose e por isto são mais acessíveis à hidrólise por agentes químicos ou enzimáticos.

As estruturas formadas pelas hemiceluloses ocorrem, geralmente, nas paredes celulares primárias e secundárias, onde recobrem a superfície das fibrilas

de celulose. Neste caso, a associação entre a celulose e as hemiceluloses é realizada por interações não-covalentes como ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals (HANSEN e BJØRKMANN, 1998). Na matriz formada na parede secundária, as hemiceluloses associam-se covalentemente à lignina através dos complexos lignina-carboidrato, que fortalecem a coesão entre as macromoléculas e aumentam a recalcitrância do composto (HARRIS e STONE, 2008) (detalhamento na seção 2.1.5).

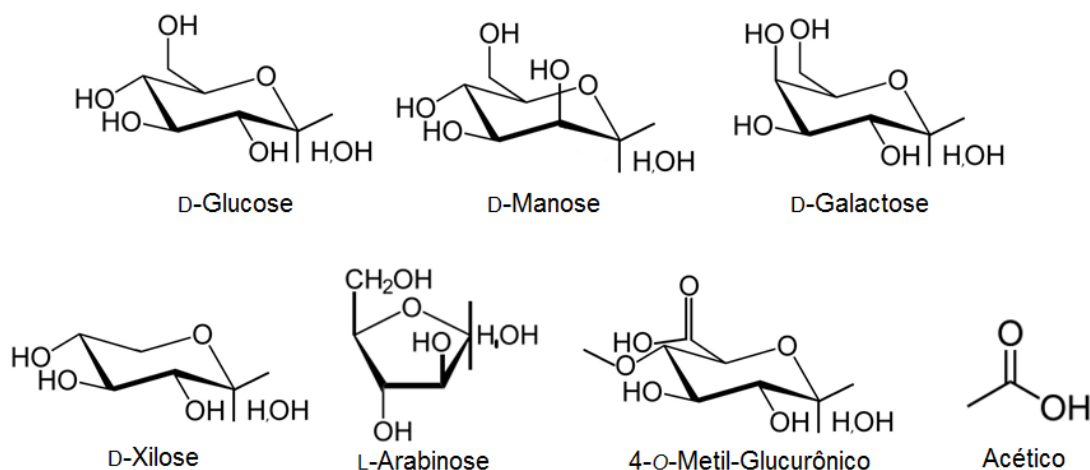


FIGURA 2 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DE COMPONENTES ENCONTRADOS NAS HEMICELULOSES.

Dentre os principais tipos de hemiceluloses presentes na parede celular estão as xilanas, cuja cadeia principal é formada por unidades de anidroxilopiranosse unidas por ligações glicosídicas do tipo β -(1 \rightarrow 4). Após a celulose, as xilanas são os polissacarídeos de maior ocorrência na natureza, se fazendo presentes em praticamente todos os vegetais superiores (BEG *et al.*, 2001). Como exemplo, as heteroxilanas são os principais componentes hemicelulósicos das paredes secundárias de dicotiledôneas e, no caso de folhosas, correspondem de 10 a 35 % da massa seca da madeira (HARRIS e STONE, 2008). A FIGURA 3 apresenta a estrutura de uma 4-O-metil-glucuronoarabinoxilana, que é a hemicelulose mais abundante nas paredes celulares primárias e secundárias de gramíneas (HARRIS e STONE, 2008). Esta estrutura ainda pode sofrer substituições nos oxigênios das hidroxilas dos carbonos C2 e C3 dos resíduos de anidroxilose, denominadas posições O-2 e O-3, respectivamente. Neste caso, os substituintes das posições O-3

são, majoritariamente, unidades de anidroarabinofuranose unidas por ligação do tipo α -(1 \rightarrow 3) (em vermelho). Já nas posições O-2 podem ocorrer grupos acetila através de ligação éster (em azul) e resíduos de ácido 4-O-metil-D-glucurônico, unidos por ligação do tipo α -(1 \rightarrow 2) (em verde). Diferentes 4-O-metil-glucuronoarabinoxilanas podem ser interconectadas na matriz por uma ponte diferúlica (em preto, ao centro), que corresponde a duas moléculas de ácido ferúlico unidas por ligação C-C do tipo 5-5'. A ligação entre a ponte diferúlica e este tipo de hemicelulose ocorre pela formação de ligação éster na posição O-5 dos resíduos de anidroarabinofuranose. Também esterificados às unidades de anidroarabinofuranose apresentam-se resíduos de ácido *p*-cumárico (em rosa), que podem unir este polissacarídeo à lignina. As 4-O-metil-glucuronoarabinoxilanas também são as principais xilanas encontradas em coníferas, correspondendo de 7 a 12 % da massa seca da madeira, entretanto, neste caso, não apresentam substituições com grupos acetila (BEG *et al.*, 2001). Por sua vez, as xilanas das folhosas são as 4-O-metil-glucuronoxilanas de alto grau de acetilação, com 3,5 a 7 grupos acetila a cada 10 resíduos de anidroxilopiranosose (WHISTLER e CHEN, 1991). Nas 4-O-metil-glucuronoarabinoxilanas das coníferas, assim como nas glucuronoxilanas das madeiras duras, podem existir unidades de anidrogactopiranosose conectadas aos resíduos de ácido 4-O-metil-D-glucurônico, formando ramificações oligoméricas (SHATALOV *et al.*, 1999).

Outros tipos relevantes de hemiceluloses são as heteromananas. Dentre elas estão as galactoglucomananas, cuja cadeia principal é formada por resíduos de anidromanopiranosose intercalados por um segmentos compostos por resíduos de anidroglucopiranosose em ligações do tipo β -(1 \rightarrow 4). Ao longo do polímero, resíduos de anidrogactopiranosose são distribuídos em ambos os tipos de monossacarídeos da cadeia principal por ligações do tipo α -(1 \rightarrow 6). As galactoglucomananas são as hemiceluloses mais abundantes nas coníferas, onde são encontradas majoritariamente na parede secundária, podendo corresponder de 12 a 18 % de sua massa seca (BACIC *et al.*, 1988). Variações na proporção dos monossacarídeos sugerem que a cada unidade de anidroglucopiranosose possam existir de 3 a 4 unidades de anidromanopiranosose e uma ramificação com um resíduo de anidrogactopiranosose (HARRIS e STONE, 2008).

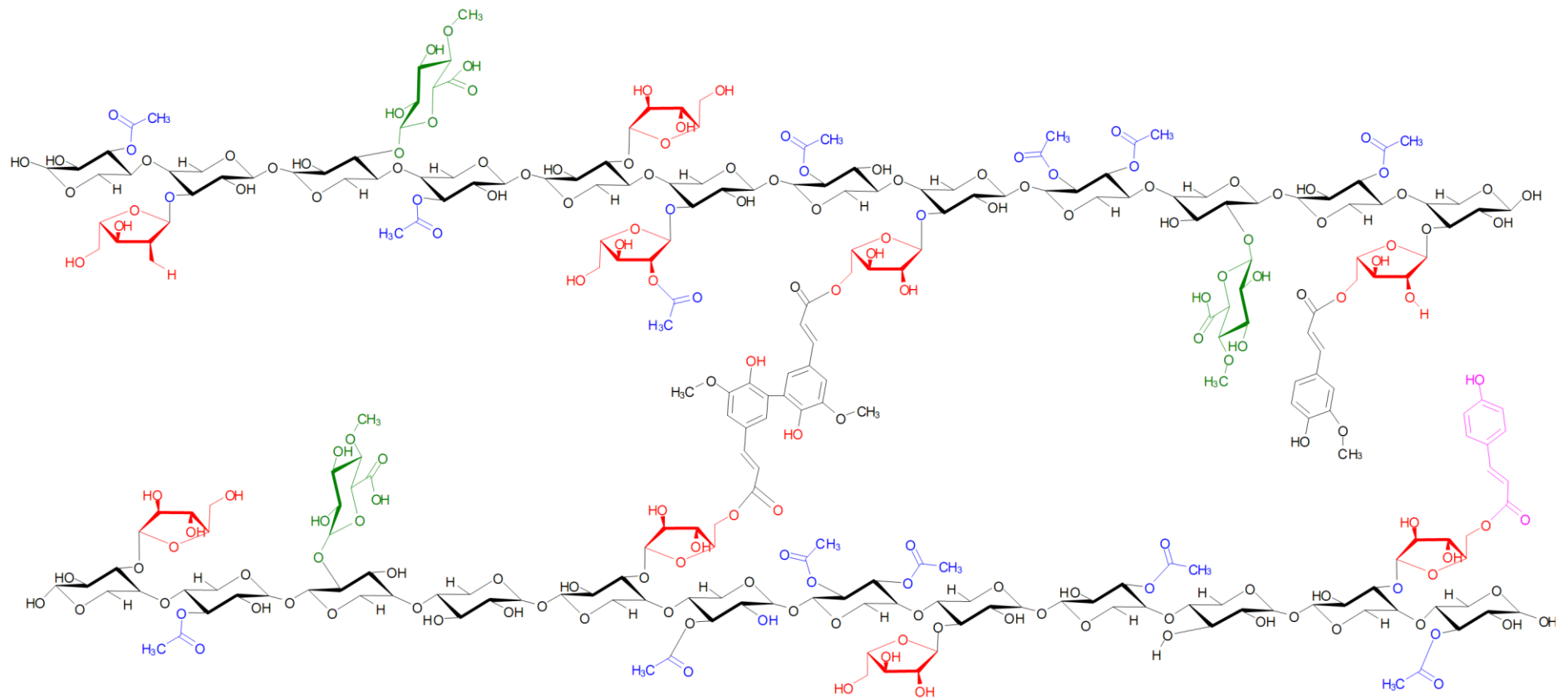


FIGURA 3 – MODELO ESTRUTURAL DE 4-O-METIL-GLUCURONOARABINOXILANA TÍPICAMENTE PRESENTE EM GRAMÍNEAS.
 FONTE: ADAPTADO DE MCDUGALL *et al.* (1993).

2.1.4. LIGNINA

A lignina é um componente polimérico amorfo presente majoritariamente na parede secundária das células vegetais, onde atua como uma barreira e, por este motivo, protege os polissacarídeos de processos de degradação química e biológica. A matriz formada pela lignina é sintetizada após a celulose e as hemiceluloses para conferir resistência à parede celular, permitindo com que as células do sistema vascular se desenvolvam (DAVIN *et al.*, 2008). No processo de lignificação da parede secundária, moléculas de água são deslocadas do agregado devido à natureza hidrofóbica da lignina e isso favorece a formação de ligações de hidrogênio entre as hemiceluloses e a celulose (NORTHCOTE, 1972; DONALDSON, 2001). As unidades presentes na lignina são resultantes da combinação de radicais oriundos da deshidrogenação enzimática de moléculas derivadas do ácido *p*-cumárico denominadas álcool coniferílico, álcool sinapílico e álcool *p*-cumarílico (FENGEL e WEGENER, 1989), cujas estruturas químicas estão apresentadas na FIGURA 4.

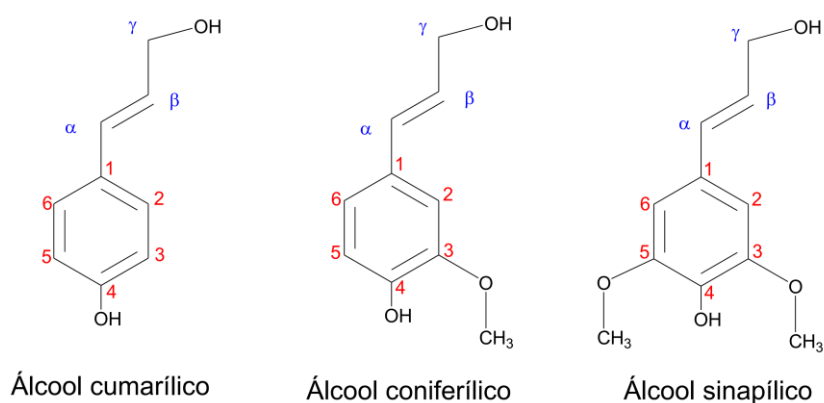


FIGURA 4 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS ÁLCOOIS CINÂMICOS PRECURSORES DA LIGNINA. FONTE: SILVEIRA (2014).

Assim como as hemiceluloses, a composição da lignina varia entre diferentes plantas e mesmo entre tecidos de uma mesma planta e esta depende dos álcoois precursores envolvidos em sua síntese. No caso de madeiras moles (coníferas) a lignina é basicamente derivada do álcool coniferílico e os fenil-propanóides são denominados unidades guaiacílicas, donde a denominação de lignina do tipo G; para madeiras duras (folhosas ou angiospermas dicotiledôneas), além das guaiacilas, existe a presença de fenil-propanóides denominados siringilas,

que são originários do álcool sinapílico e dão origem à lignina do tipo GS; em gramíneas como a cana-de-açúcar (angiospermas monocotiledôneas), existem ainda em menor quantidade unidades aromáticas não metoxiladas derivadas do álcool *p*-cumarílico, denominadas *p*-hidroxibenzilas, que assim compõem a lignina do tipo HGS (RAMOS, 2003).

Dentre as frações aromáticas, o tipo de ligação mais abundante é a β -O-4, que corresponde de 30 a 40 % do total de ligações nas coníferas e de 40 a 50 % nas folhosas (BRUNOW e LUNDQUIST, 2010). Outros tipos de ligações representativas correspondem às β -5', β - β ', 5-5' e 4-O-5', bem como as dibenzodioxocina (DBDO, FIGURA 5), cuja ocorrência foi demonstrada em amostras de lignina de madeira moída (MWL, do inglês *milled wood lignin*) isoladas de abeto por extração com dioxano/água (4:1; v v⁻¹), cujas estruturas foram elucidadas utilizando-se a técnica de QQ-HSQC (do inglês, *Quick Quantitative-Heteronuclear Single-Quantum Correlation*) e ressonância magnética nuclear (RMN) de ³¹P (CRESTINI *et al.*, 2011). As labilidades químicas das ligações presentes na lignina são diferentes e, apesar de predominantes, as ligações β -O-4 reagem mais facilmente em reações de hidrólise ácida ou básica (BRUNOW e LUNDQUIST, 2010).

As unidades de álcool coniferílico que caracterizam lignina do tipo G reagem em grande extensão através de radicais formados no carbono 5 do anel benzênico, formando ligações cruzadas do tipo C-C e C-O (BRUNOW e LUNDQUIST, 2010). As ligações C-C originadas desses cruzamentos são dificilmente quebradas e este é o principal fato que torna a lignina de coníferas mais difícil de ser extraída em relação à de folhosas ou gramíneas, pois os fragmentos relacionados às unidades guaiacílicas podem compor até 95 % da lignina deste tipo de vegetal (BOERJAN e BAUCHER, 2003; BRUNOW e LUNDQUIST, 2010). Desta maneira, a grande quantidade de lignina na parede secundária e a alta proporção de lignina do tipo G fazem com que as coníferas sejam as mais difíceis de serem processadas do ponto de vista das biorrefinarias. O principal exemplo disso é a indústria de papel e celulose, que necessita de agentes nucleofílicos fortes, como sulfeto (S²⁻) e sulfito (HSO³⁻) de sódio, para obter altas taxas de deslignificação no processamento de coníferas (ZHU *et al.*, 2010).

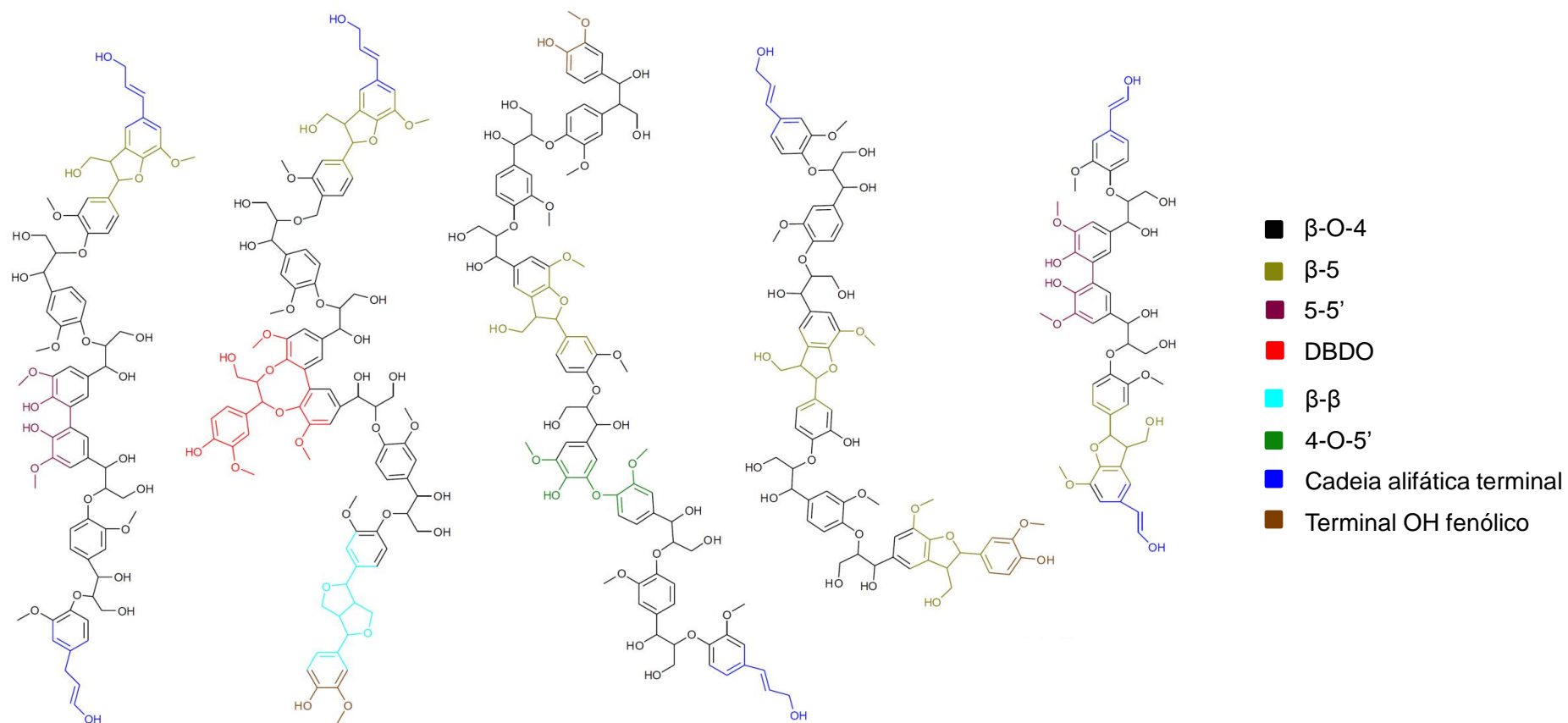


FIGURA 5 – MODELOS ESTRUTURAIS DE LIGNINA ISOLADA DA CONÍFERA ABETO E OS PRINCIPAIS TIPOS DE LIGAÇÕES QUÍMICAS EVIDENCIADAS POR QQ-HSQC E RMN DE ^{31}P . FONTE: ADAPTADO DE CRESTINI *et al.* (2011).

2.1.5. COMPLEXOS LIGNINA-CARBOIDRATO

Além de aumentar a coesão entre os polissacarídeos na parede secundária, a lignina pode se ligar covalentemente às hemiceluloses pela formação de complexos lignina-carboidrato (CLC). Dependendo da abundância das ligações cruzadas que formam os CLC, estas podem contribuir significativamente para a recalcitrância da lignocelulose, pois também aumentam a interação entre as macromoléculas na parede celular e, portanto, restringem o acesso químico e enzimático aos polissacarídeos (IYAMA *et al.*, 1994). As estruturas dos CLC podem ser isoladas por extração ou fracionamento de biomassa com solventes orgânicos e soluções alcalinas. Neste sentido, um estudo realizado por Lawoko *et al.* (2005) apresentou um método de isolamento de estruturas de CLC de abeto baseado na moagem do material e hidrólise enzimática parcial da celulose. A fração insolúvel obtida após a hidrólise foi parcialmente dissolvida com solução de uréia (8 mol L⁻¹) por 48 h e a fração solúvel desta nova etapa foi precipitada com hidróxido de bário (BaOH₂). A precipitação originou uma estrutura que foi caracterizada como sendo um CLC de glucomananas, contendo aproximadamente 8 % da lignina total. Já a fração insolúvel em uréia foi lavada e novamente solubilizada com solução de hidróxido de sódio 18 % (NaOH) e ácido bórico 4 % (H₃BO₃). Após isso, o pH foi ajustado a 7 para precipitar um CLC contendo cerca de 48 % da lignina de abeto, caracterizado como uma rede de glucomananas, lignina e xilanas (glucomananas > xilanas). A fração solúvel desta última etapa foi determinada como sendo um CLC de xilanas, lignina e glucomananas (xilanas > glucomananas), que reteve 40 % do conteúdo total de lignina. Desta forma, estes autores demonstraram que é improvável o isolamento de hemiceluloses sem qualquer associação com lignina presente (LAWOKO *et al.*, 2005). O isolamento de CLC de bagaço de cana (SINGH *et al.*, 2005), palha de trigo (DUROT *et al.*, 2003) e pinus (AZUMA e KOSHIJIMA, 1988) também foram investigados.

A FIGURA 6 apresenta os tipos possíveis de ligações nos CLC formados entre 4-O-metil-glucuronoarabinosilanas (em azul), as principais hemiceluloses presentes em gramíneas, e um fragmento de lignina (em preto) (IYAMA *et al.*, 1994). As espécies envolvidas na formação de ligações covalentes dos CLC entre polissacarídeos e lignina estão ilustradas em cor vermelha. Neste caso, estão representadas: a ligação éster direta (1) entre resíduos de ácido 4-O-metil-

glucurônico que podem se associar a grupos hidroxila dos compostos da lignina; a ligação éter direta (2) entre hidroxilas da posição O-2 dos resíduos de xilose e hidroxilas da lignina; resíduos de ácido ferúlico (3) e ácido *p*-cumárico (4) esterificados às hidroxilas da posição O-3 dos resíduos de arabinose sem associação com a lignina; resíduo de ácido cinâmico (5) eterificado com a lignina; a ponte ferúlica éster-éter (6) que possui uma molécula de ácido ferúlico esterificada à posição O-3 dos resíduos de arabinose e eterificada a grupamentos hidroxílicos da lignina; e a ponte diferúlica (7), composta por duas moléculas de ácido ferúlico unidas por ligação do tipo 5-5' e conectadas a resíduos de arabinose por ligação éster e à lignina por ligação éter.

2.1.6. COMPONENTES MINORITÁRIOS

Dentre os componentes minoritários da lignocelulose, pectinas são polissacarídeos que encontram-se principalmente na parede primária das células vegetais e apresentam alta solubilidade em água; por este motivo, estes componentes são facilmente removidos por lavagem aquosa. Os principais tipos de pectinas são as galacturonanas, formadas a partir de resíduos de ácido galacturônico unidas por ligações do tipo α -(1→2) e α -(1→4) que podem apresentar grupos acetila esterificados e grupos metila eterificados na cadeia (HARRIS e STONE, 2010). Nas coníferas, mais especificamente no lúmen dos traqueídeos, encontram-se as arabino-3,6-galactanas, cuja cadeia principal é formada por resíduos de anidrogactose unidas por ligação do tipo β -(1→3) e ramificadas por ligações do tipo α -(1→3) com resíduos de arabinanas (HARRIS e STONE, 2008).

A biomassa também contém compostos orgânicos minoritários de baixa massa molar, denominados extraíveis, que podem ser facilmente removidos da estrutura lignocelulósica pela solubilização em solventes orgânicos como o etanol (FENGEL e WEGENER, 1989). As principais estruturas encontradas na maioria dos materiais lignocelulósicos são terpenos, lignanas, estilbenos, hidrocarbonetos, flavonoides, ceras, álcoois e ácidos graxos e compostos fenólicos (FENGEL e WEGENER, 1989).

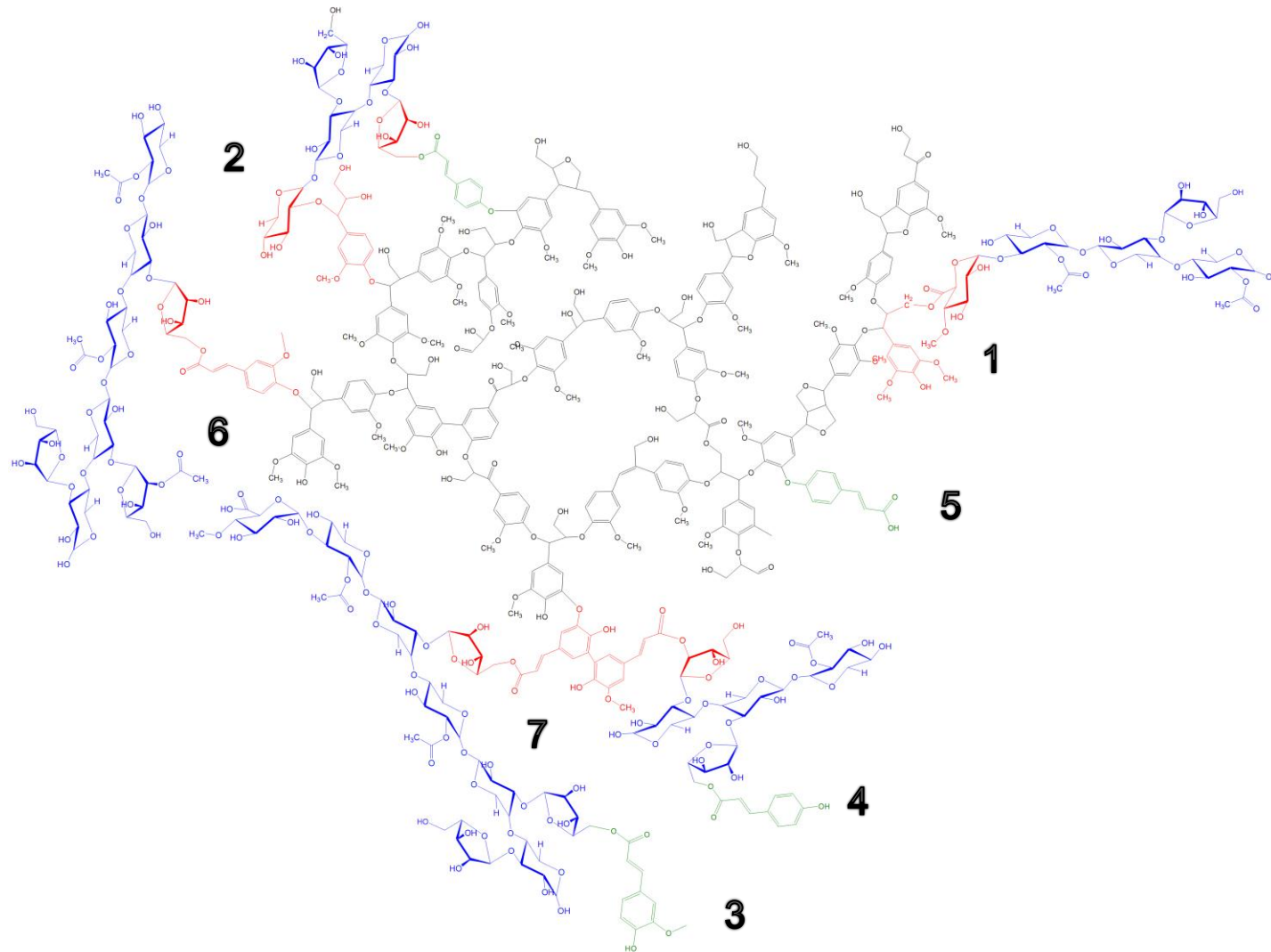


FIGURA 6 – ESTRUTURA HIPOTÉTICA DE COMPLEXO LIGNINA-CARBOIDRATO DE 4-O-METILGLUCURONOARABINOXILANAS DE GRAMÍNEAS.
 FONTE: ADAPTADO DE IYAMA *et al.* (1994).

Em madeiras, os extraíveis têm funções patológicas e fisiológicas que são associadas às substâncias produzidas nos canais resinosos e nas células parenquimáticas, respectivamente (SJÖSTRÖM, 1993). As substâncias patológicas são majoritariamente compostas por ácidos resínicos e monoterpenos que protegem a madeira de degradação biológica e, por sua vez, as substâncias fisiológicas correspondem a gorduras, açúcares e outras moléculas de reserva energética (SJÖSTRÖM, 1993).

Embora os extraíveis sejam minoritários na composição química da biomassa, a riqueza desta fração pode ser importante em biorrefinarias para obtenção de insumos químicos no processamento de grandes quantidades de materiais lignocelulósicos. Por outro lado, a presença destes componentes na parede celular pode prejudicar os procedimentos analíticos de quantificação do teor de lignina e carboidratos presentes nos materiais lignocelulósicos. Este fato ocorre porque, na determinação de carboidratos pelo por hidrólise ácida, a barreira química formada pelos extraíveis pode inibir a penetração do ácido sulfúrico na estrutura e resultar em uma hidrólise incompleta dos polissacarídeos (SLUITER *et al.*, 2008b). Por sua vez, a determinação do teor de lignina pode ser superestimada devido à condensação de componentes dos extraíveis e carboidratos não hidrolisados com a fração sólida correspondente à lignina insolúvel em ácido (SLUITER *et al.*, 2008b). Desta maneira, a remoção desta fração da biomassa é inevitável para se refinar a determinação de sua composição química.

2.2. PRÉ-TRATAMENTO DE LIGNOCELULOSE

Conforme já discutido, o aproveitamento da biomassa como matéria-prima para produção de combustíveis e insumos químicos renováveis depende do aumento da eficiência da conversão de sua estrutura, que possui acessibilidade química e enzimática limitada devido à recalcitrância resultante da interação entre os componentes macromoleculares e de fatores relacionados às propriedades da parede celular, como espessura, heterogeneidade, complexidade e grau de lignificação (HIMMEL *et al.*, 2007). Por esses motivos, uma etapa de pré-tratamento se faz necessária para aumentar a área superficial e modificar a composição química da biomassa, aumentando assim a sua suscetibilidade à hidrólise enzimática e gerando um processo de maior rendimento para a produção de etanol (KUMAR *et al.*, 2009).

As estratégias de pré-tratamento podem ser classificadas de acordo com sua atuação na matéria-prima lignocelulósica. Em geral, estes métodos podem ser físicos, físico-químicos, químicos ou biológicos (ALVIRA *et al.*, 2010). Diversos estudos podem ser encontrados na literatura sobre tecnologias de pré-tratamento, dos quais podem ser destacados os que utilizam hidrólise ácida (VÁZQUEZ *et al.*, 2006; HSU *et al.*, 2010), reagentes alcalinos (CURRELI *et al.*, 1997; ZHENG *et al.*, 2009), explosão a vapor (RAMOS, 2003; GALBE e ZACCHI, 2007), moagem (ALVO e BELKACEMI, 1997; HIDENO *et al.*, 2009), solventes orgânicos (ARAQUE *et al.*, 2008; SAAD *et al.*, 2008; MESA *et al.*, 2010), pré-tratamentos biológicos (ZHANG *et al.*, 2008; CAMASSOLA e DILLON, 2009; YU *et al.*, 2009), líquidos iônicos (LI *et al.*, 2010; NGUYEN *et al.*, 2010) e CO₂ supercrítico (KIM e HONG, 2001).

Para um método de pré-tratamento ser considerado efetivo, este deve proporcionar uma alta recuperação de carboidratos da biomassa, aumentar a digestibilidade dos polissacarídeos à etapa de hidrólise enzimática, evitar a degradação dos açúcares e da lignina (que podem formar inibidores na etapa de fermentação), proporcionar uma alta concentração de sólidos totais e de carboidratos na fração solúvel e ter um baixo custo energético e operacional (GALBE e ZACCHI, 2012). Além disso, a escolha de um processo de pré-tratamento deve ser adequada à matéria-prima que será utilizada, devido aos fatores estruturais e químicos da lignocelulose (CHANDRA *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2008).

Nos pré-tratamentos físicos, o principal método é a moagem, que tem como finalidade o aumento da área superficial e da acessibilidade do substrato à etapa de hidrólise pela diminuição do tamanho das partículas (SILVA *et al.*, 2010). A principal vantagem deste processo é que não há degradação dos carboidratos a compostos furânicos, em contrapartida a processos termoquímicos que utilizam a hidrólise ácida (ALVO e BELKACEMI, 1997). Porém, muita energia é consumida para se alcançar uma alta digestibilidade do substrato, o que torna este tipo de pré-tratamento economicamente inviável (GALBE e ZACCHI, 2007).

Dentre os pré-tratamentos químicos, a utilização de reagentes alcalinos no processamento da lignocelulose apresenta vantagens em comparação à hidrólise ácida devido à conservação dos carboidratos das hemiceluloses, maior efetividade na remoção da lignina (CARVALHEIRO *et al.*, 2008) e a possibilidade de ser realizado em temperatura ambiente (KUMAR *et al.*, 2009). O emprego de soluções de hidróxido de sódio (NaOH) diminuem a cristalinidade e o grau de polimerização

da celulose pelo aumento de sua porosidade e área superficial de contato (TAHERZADEH e KARIMI, 2008). No entanto, o pré-tratamento alcalino é apropriado para materiais que contenham pouca lignina em sua composição, como alguns tipos de resíduos agroindustriais, já que em substratos com alto grau de lignificação quase nenhum efeito é observado (GALBE e ZACCHI, 2007). Como um método alcalino alternativo, o pré-tratamento da palha de milho foi investigado empregando uma mistura de carbonato de sódio (Na_2CO_3) e sulfeto de sódio (Na_2S) oriunda do processo de polpação kraft das indústrias de papel e celulose (licor verde). Resultados de até 45 % de deslignificação do material foram obtidos, porém, a alta carga enzimática utilizada para hidrólise (20 FPU g^{-1} de substrato deslignificado) ainda sugere a necessidade de otimização desta tecnologia (GALBE e ZACCHI, 2012).

Os pré-tratamentos empregando ácidos concentrados ou diluídos têm por objetivo a solubilização da hemicelulose para aumentar a acessibilidade química da celulose. Porém, o processamento utilizando ácidos concentrados acarreta um alto custo operacional devido à necessidade de uma etapa adicional de neutralização dos efluentes, bem como a possível corrosão de equipamentos (WYMAN, 1996). No pré-tratamento com ácidos diluídos, a biomassa previamente moída é imersa em solução ácida em temperaturas de 140 a 200 °C que promovem a hidrólise das hemiceluloses em açúcares monoméricos passíveis de fermentação (GALBE e ZACCHI, 2012). Contudo, dependendo da temperatura utilizada, podem ser obtidos produtos de desidratação de carboidratos como furfural e hidroximetilfurfural (HMF) e compostos aromáticos provenientes da degradação da lignina que podem inibir a ação dos microorganismos na etapa subsequente de fermentação (SAHA *et al.*, 2005).

Ainda em pré-tratamentos químicos, há o processo utilizando solventes orgânicos, que tem como base a solubilização da lignina na fase orgânica (GALBE e ZACCHI, 2012). Estes solventes também podem ser usados em misturas aquosas na presença de catalisadores ácidos que solubilizam as hemiceluloses além da lignina (SUN e CHENG, 2002). Vários solventes orgânicos puros ou em mistura podem ser utilizados neste processo, incluindo metanol, etanol, etilenoglicol, glicerol e álcool tetraidrofurfurílico (ZHAO *et al.*, 2009). Contudo, a viabilidade econômica e ambiental deste processo está relacionada à etapa de reciclagem do solvente orgânico (GALBE e ZACCHI, 2012). Além disso, a presença destes solventes no

meio reacional pode produzir efeitos inibitórios sobre as etapas de hidrólise enzimática e de fermentação (SUN e CHENG, 2002).

Dentre os pré-tratamentos físico-químicos destaca-se a explosão a vapor, que é um dos processos mais estudados na literatura (GREGG e SADDLER, 1996; NGUYEN *et al.*, 1996; RAMOS, 2003). Por este motivo, várias plantas pilotos que empregam esta tecnologia estão espalhadas pelo mundo (RAMOS, 2003). Neste método, a biomassa é tratada com vapor em um vaso fechado com temperatura entre 160 a 240 °C (correspondente a pressão entre 6 e 34 bar) por um certo tempo e, em seguida, o sistema é subitamente descomprimido à pressão ambiente (GALBE e ZACCHI, 2007). O mecanismo de atuação deste pré-tratamento é similar aos métodos que empregam ácidos diluídos, tendo como base a solubilização das hemiceluloses em oligômeros e monômeros para facilitar o acesso das enzimas à superfície da celulose durante a etapa de hidrólise (GALBE e ZACCHI, 2007). Com o intuito de diminuir o tempo de residência da biomassa no reator, bem como a temperatura e a pressão utilizadas, esta técnica pode ser assistida por catalisadores auxiliares como dióxido de enxofre (SO₂) (ZACCHI *et al.*, 1995), dióxido de carbono (CO₂) (SUN e CHENG, 2002), H₂SO₄ (RAMOS, 2003; GALBE e ZACCHI, 2007) e ácido fosfórico (H₃PO₄) (AGUIAR *et al.*, 2013). Neste sentido, várias pesquisas vêm sendo realizadas, pois, dependendo da severidade do pré-tratamento e das propriedades do catalisador, pode haver perda de rendimento e um aumento na formação de inibidores (OLSSON *et al.*, 2005). Paralelamente, a lignina também pode sofrer hidrólise parcial seguida de reações de condensação, levando a co-produtos indesejáveis de baixa solubilidade em sistemas aquosos (SUN, 2002). Ainda, como evolução tecnológica do pré-tratamento por explosão a vapor, está sendo desenvolvida a *high density steam flash-explosion* (HDSF), termo que remete a um processo rápido (*flash*) que envolve de 3 a 5 segundos de pressurização do reator e apenas 0,0875 segundos de expansão adiabática (explosão). Porém, este procedimento foi testado em materiais de origem animal contendo queratina, um material menos recalcitrante que a lignocelulose (ZHAO *et al.*, 2012).

Os pré-tratamentos biológicos têm como princípio a colonização da biomassa com organismos, majoritariamente fungos, capazes de degradar lignina e/ou hemiceluloses com o objetivo de melhorar a sua suscetibilidade química às reações de hidrólise (ALVIRA *et al.*, 2010). Além de ser um processo relativamente barato frente a outros tipos de pré-tratamento, esta técnica é ambientalmente correta

por não requerer substâncias químicas auxiliares (SUN e CHENG, 2002). Porém, a necessidade de longos tempos de pré-tratamento, em comparação com outras técnicas, dificulta sua utilização em escala industrial (GALBE e ZACCHI, 2012).

2.3. PRÉ-TRATAMENTO UTILIZANDO LÍQUIDOS IÔNICOS

Os líquidos iônicos (LI) são sais orgânicos líquidos em temperaturas relativamente baixas (<100 °C) que apresentam propriedades diferentes dos solventes orgânicos comuns: alta estabilidade química e térmica, baixa inflamabilidade e pressão de vapor insignificante, o que implica na não formação de gases tóxicos e co-produtos indesejáveis (ZHU *et al.*, 2006). Em meio às tecnologias convencionais de pré-tratamento, a utilização de líquidos iônicos como solventes de lignocelulose está em evidência pela tendência de se valorizar trabalhos científicos que considerarem premissas de sustentabilidade e eficiência ecológica em seu desenvolvimento. Sua estrutura química é basicamente formada por um cátion orgânico e um ânion orgânico ou inorgânico. Os tipos mais comuns de LI contêm cátions derivados de alquilimidazóis, alquilpiridínios e tetra-alquilamônios contendo ânions como acetato, hexafluorofosfato, tetrafluoroborato, metanossulfonatos, haletos, entre outros (TADESSE e LUQUE, 2011).

Dentre os principais Lis, os mais estudados são os baseados em cátions alquilimidazóis contendo ânions acetato que são capazes de dissolver a celulose. Um dos mecanismos de atuação do pré-tratamento de biomassa com este LI consiste na capacidade do ânion em formar de ligações de hidrogênio com as hidroxilas dos monossacarídeos. Na celulose, o ânion do LI ao interagir preferencialmente com as hidroxilas dos resíduos de anidrogucose causa o rompimento de ligações de hidrogênio e outras forças atrativas inerentes ao agregado de celulose, aumentando assim a sua solubilidade no meio de onde pode ser regenerada como celulose amorfa (WANG *et al.*, 2012). O cátion também pode interagir com as hidroxilas dos monossacarídeos, porém, mais fracamente. Estudos de simulação molecular demonstraram que na dissolução de glucose com o LI cloreto de 1-metil-3-metilimidazol ([Mmim][Cl]), os cátions alquilimidazólicos se localizam acima e abaixo do plano do anel hemiacetalico, fato que pode ser explicado pela superfície anisotrópica e relativamente hidrofóbica da celulose, ao contrário de sua periferia que é polar por poder realizar ligações de hidrogênio (YOUNGS *et al.*, 2007). Este fato sugere que o papel do cátion na dissolução da

celulose pode estar mais associado à diminuição das interações entre as folhas formadas pelas cadeias de celulose (BRANDT *et al.*, 2013). A FIGURA 7 demonstra as ligações de hidrogênio formadas pelo ânion e cátion do LI acetato de 1-butil-3-metilimidazol, o [Bmim][OAc], com as hidroxilas dos resíduos de anidroglicose da celulose.

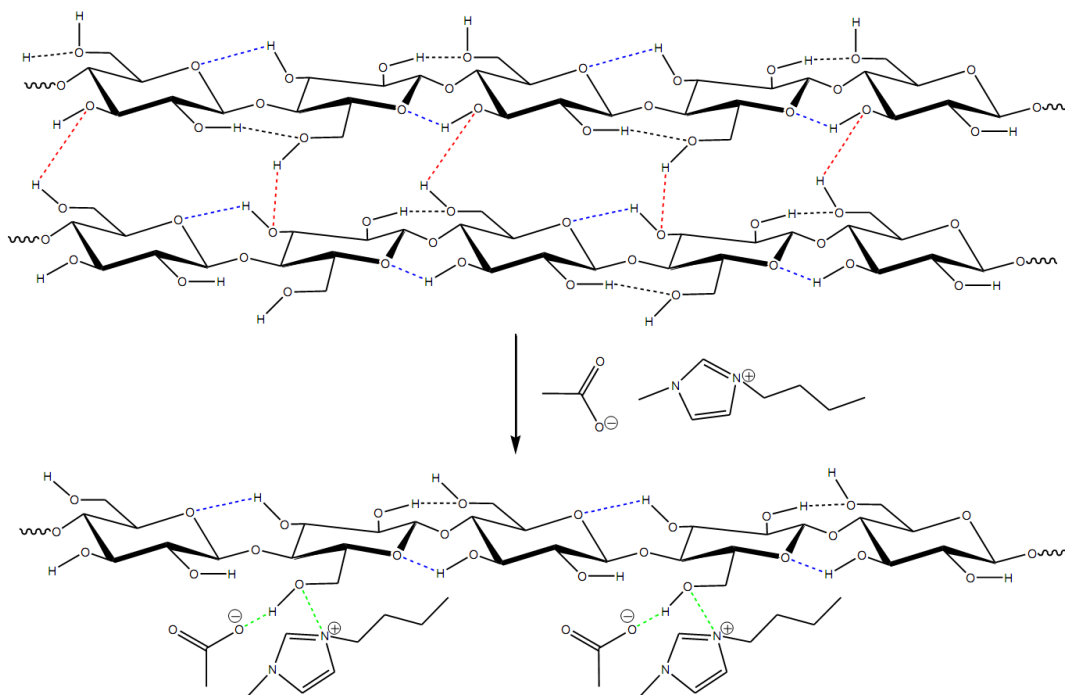


FIGURA 7 – POSSÍVEIS INTERAÇÕES DO CÁTION E ÂNION DO LI [Bmim][OAc] COM AS HIDROXILAS DOS RESÍDUOS DE ANIDROGLUCOSE PRESENTES NA CELULOSE. FONTE: SILVEIRA (2014).

Além da dissolução da celulose, os LIs baseados em cátions imidazólicos são também capazes de dissolver a lignina. Neste sentido, sugere-se que a solubilização desta macromolécula está atrelada a interações π - π formadas entre o cátion imidazólico e as frações aromáticas da lignina (SILVA *et al.*, 2010). As interações entre o cátion e a lignina também podem ser coulombianas, donde a carga positiva do anel imidazólico interage com os sítios aromáticos que possuem alta densidade eletrônica (DUPONT, 2011). Além disso, foi comprovado pela técnica de RMN bidimensional que a utilização do LI [Emim][OAc] no pré-tratamento de carvalho silvestre promoveu um decréscimo na quantidade de ligações do tipo β -O-4 (BRANDT *et al.*, 2013). Por este motivo, a maior abundância relativa de frações aromáticas unidas por ligação β -O-4 está associada à eficiência de extração de

lignina de diferentes biomassas, ou seja, coníferas são mais difíceis de serem deslignificadas com LI do que folhosas e gramíneas.

Neste contexto, a capacidade de LIs baseados em cátions alquilimidazólicos solubilizarem tanto os polissacarídeos como a lignina torna-os passíveis de dissolver ou fracionar seletivamente a biomassa. Os primeiros autores a relatarem o processo de dissolução de biomassa em LI foram Fort *et al.* (2007), utilizando-se de pó de madeiras de carvalho, eucalipto, pinho e álamo. Neste trabalho, foram empregados 5 % de biomassa seca em relação à massa de solução de LI [Bmim][Cl] e dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- d_6) a 100 °C por até 24 h e as dissoluções foram confirmadas pela técnica de RMN de ^{13}C . A maior eficiência de extração foi observada para a biomassa de pinus, que promoveu a solubilização de 44 % do material. A celulose foi então recuperada com até 60 % de rendimento após a adição de um antissolvente aquoso para induzir a precipitação deste polissacarídeo, ao passo que a fração solúvel permaneceu rica em lignina (FORT *et al.*, 2007). Sun *et al.* (2009) demonstraram uma dissolução mais eficiente de partículas de madeira com o LI [Emim][OAc]. Estes autores conseguiram dissolver até 98,5 % e 99,5 % de pinho e carvalho vermelho, utilizando-se de 0,5 g de massa seca de material em 10 g de [Emim][OAc] (5 %; g g^{-1}) a 110 °C em 16 h de reação. Além disso, foi observado que a eficiência da solubilização pode ser diretamente relacionada com a diminuição do tamanho de partícula. Ainda, neste mesmo estudo, adicionou-se um antissolvente composto por acetona e água (1/1; v v^{-1}) para reconstituição dos polissacarídeos, o que permitiu a recuperação de um material rico em carboidratos com deslignificações de 26,1 % para pinho e 34,9 % para carvalho vermelho. (LI *et al.*, 2011) demonstraram o efeito da temperatura na dissolução de bagaço de cana e madeira de pinho. Utilizando-se de concentrações de 5 % (g g^{-1}) de bagaço em relação a [Emim][OAc] na temperatura de 175 °C por 10 min, foi obtida uma fração sólida com 62,7 % da celulose e apenas 9,0 % de lignina após a adição de antissolvente, promovendo uma deslignificação de 60,3 % em relação ao material original.

A cristalinidade da celulose nas frações sólidas recuperadas após a dissolução da biomassa é menor que a do material original, efeito que pode ser observado a partir de mudanças do seu padrão de difratometria de raios-X (DRX) de pó (LEE *et al.*, 2009). Isto pode ser atribuído à mudança de celulose I para celulose II, bem como pelo efeito de maior desordem das fibrilas precipitadas. Num estudo

realizado por Cheng *et al.* (2011), observou-se a mudança progressiva de celulose I para celulose II após a dissolução de diferentes biomassas, em taxas que foram maiores para gramíneas, seguidas de folhosas e coníferas. A celulose regenerada nas frações sólidas também apresenta altos rendimentos de conversão enzimática. No pré-tratamento de palha de trigo (4 %, g g⁻¹) utilizando [Emim][PO₄] a 130 °C por 30 min, foi obtida uma conversão enzimática de 54,8 % da celulose em glucose, o que indica a alta acessibilidade química dessa fração (LI *et al.*, 2011). Por sua vez, o pré-tratamento de palha de arroz com amônia e [Emim][OAc] resultou numa recuperação de celulose regenerada de 82 % e esta apresentou um rendimento de sacarificação de 97 % (NGUYEN *et al.*, 2010).

Os pré-tratamentos baseados na dissolução de biomassa com LI apresentam-se eficientes na recuperação de materiais com maiores teores de carboidratos e alta susceptibilidade à bioconversão, porém são necessárias baixas consistências para obterem-se solubilizações eficientes, o que os tornam onerosos devido ao custo desses reagentes. Dessa maneira, para viabilizar o uso desses reagentes em biorrefinarias, além da diminuição do custo inerente à produção industrial destes, se faz necessário aumentar a relação mássica entre biomassa e LI (BRANDT *et al.*, 2013) e estudar seu reuso (STARK, 2011). Além disso, a presença LI residual no material após o pré-tratamento pode ter influência negativa sobre a hidrólise enzimática e comprometer a sua conversão em etanol celulósico. Salvador *et al.* (2010) demonstraram um decréscimo de até 50 % na atividade endoglucanásica de celulases obtidas de *Aspergillus niger* quando na presença de soluções aquosas do LI imidazólico Bmim[Cl]. Portanto, nos processos utilizando LIs torna-se imprescindível a quantificação do LI passível de recuperação e reutilização, bem como a constatação de quanto LI permaneceu retido na fração celulósica.

2.4. PRÉ-TRATAMENTO UTILIZANDO CO₂ SUPERCRÍTICO

Uma substância pode ser definida como fluido supercrítico quando submetida a temperatura e pressão superiores ao seu ponto crítico. Desta maneira, o dióxido de carbono (CO₂) se torna supercrítico quando sob temperatura acima de 31,1 °C (temperatura crítica, T_c) e pressão acima de 74 bar (pressão crítica, P_c) (WU e HAN, 2013). Neste caso, as propriedades físico-químicas do CO₂ supercrítico (scCO₂) são intermediárias àquelas das fases gasosa e líquida, o que o torna um solvente com propriedades especiais, caracterizadas pela difusividade e densidade

de um gás e a viscosidade e momento dipolar de um líquido (WU e HAN, 2013). Outro fato importante é que este solvente possui uma tensão superficial negligenciável, o que facilita a sua difusão e permeação de outras substâncias através de estruturas microporosas (WU e HAN, 2013). Ademais, o scCO₂ pode ser considerado um solvente verde devido a sua baixa toxicidade e inflamabilidade, ampla disponibilidade, baixo custo e um ponto crítico facilmente acessível (CLARK *et al.*, 2009). Por estes motivos, do ponto de vista científico e industrial, a gama de aplicações do scCO₂ é vasta, podendo ser utilizado em processos de extração e fracionamento, reações químicas, tingimento e pintura, síntese de polímeros, entre outros. Como exemplo de processo de extração, o scCO₂ remove componentes de baixa massa molar presentes na biomassa, como terpenos, lignanas, estilbenos, flavonóides e outros compostos, conservando sua estrutura. Tais compostos, se extraídos por outros métodos, podem não ser aproveitados de maneira eficiente devido a sua alta labilidade à reações hidrolíticas ou oxidativas (REVERCHON e DE MARCO, 2006).

Da mesma maneira, o uso do scCO₂ também apresenta vantagens quando utilizado no pré-tratamento de materiais lignocelulósicos, principalmente por não produzir compostos tóxicos e inibidores às etapas de hidrólise enzimática e fermentação (KUMAR *et al.*, 2009). Ainda, a utilização de cossolventes com scCO₂ em pré-tratamentos combinados pode resultar em diferentes efeitos na composição química de materiais lignocelulósicos. Por exemplo, a presença de água no meio reacional, seja esta adicionada ou inerente à umidade da biomassa, pode promover a hidrólise dos polissacarídeos das hemiceluloses. Neste sentido, a eficácia da conversão desses polissacarídeos em oligômeros e monossacarídeos é dependente do aumento da temperatura e pressão do sistema, o que favorece a solubilidade do scCO₂ em água e leva à formação de ácido carbônico que, por sua vez, diminui o pH do meio reacional e promove a quebra de ligações do tipo éster e glicosídicas presentes nas hemiceluloses (HENDRIKS e ZEEMAN, 2009). Este fenômeno é comparável com pré-tratamentos baseados na auto-hidrólise da biomassa, pois a alta labilidade química de ligações do tipo éster permite a geração *in situ* de grupos acetila e ácidos fenólicos que, por sua vez, catalisam as reações de hidrólise ácida das hemiceluloses (HENDRIKS e ZEEMAN, 2009). Ademais, na etapa de despressurização, o CO₂ pode ser facilmente separado e reciclado devido à diminuição de sua solubilidade e também pode levar consigo compostos voláteis

potencialmente inibitórios da etapa de fermentação, como os derivados de furanos produzidos da desidratação de carboidratos (MAGALHÃES DA SILVA *et al.*, 2014). Em um estudo realizado por Magalhães da Silva *et al.* (2014), o rendimento de recuperação de pentosanas, principalmente xilooligossacarídeos, foi de até 92 % na fração solúvel obtida no pré-tratamento de palha de trigo utilizando scCO₂ e água como cossolvente, na pressão de 60 bar e temperatura de 210 °C. Em outro trabalho, Morais *et al.* (2014) observaram um aumento da conversão enzimática da celulose em glucose de até 26 %, rendimento este que foi aumentado pela remoção parcial das hemiceluloses de palha de trigo utilizando-se do sistema scCO₂/H₂O.

Analogamente aos pré-tratamentos utilizando LI e solventes orgânicos, a utilização de scCO₂ com um cossolvente adequado permite a remoção da lignina com alta pureza, o que pode ser interessante do ponto de vista das biorrefinarias (PARK *et al.*, 2001). Além disso, sistemas com CO₂ em altas pressões e cossolventes orgânicos, como etanol e 1-butanol, apresentaram-se eficientes para a deslignificação de biomassa. Pasquini *et al.* (2005a) demonstraram uma deslignificação de 94,5 % do bagaço de cana utilizando 70 bar e 190 °C por 105 min de reação utilizando 1-butanol e água como cossolventes em mistura de 60 % e 40 % (v v⁻¹), respectivamente. Estes autores também relataram uma deslignificação de 93,1 % e 88,4 % de *Pinus taeda* e bagaço de cana, respectivamente, utilizando uma mistura 1:1 (v v⁻¹) de etanol e água em sob 16 bar e 190 °C (PASQUINI *et al.*, 2005b).

2.5. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE LIGNOCELULOSE

A etapa de hidrólise enzimática da celulose e das hemiceluloses visa a obtenção de açúcares passíveis de fermentação. A eficiência deste processo é influenciada por fatores inerentes aos substratos como grau de lignificação, associação entre lignina e hemiceluloses, cristalinidade e grau de polimerização da celulose e área superficial (HIMMEL *et al.*, 2007). Por este motivo, em biorrefinarias, uma etapa de pré-tratamento é exigida para se obter materiais lignocelulósicos mais susceptíveis à hidrólise. Neste caso, a utilização de biocatalisadores é preferível em relação à hidrólise ácida, principalmente por apresentar maior especificidade e exigir condições mais brandas do que as exigidas na catálise química (SILVEIRA *et al.*, 2014b).

A hidrólise enzimática da celulose ocorre em meio aquoso e heterogêneo, no qual enzimas do complexo celulolítico atuam em sinergia para converter este polissacarídeo em glucose (ARANTES e SADDLER, 2010). As principais enzimas que compõem esse complexo são as endo- β -(1 \rightarrow 4)-glucanases (EnGs), as exo- β -(1 \rightarrow 4)-glucanases (ExGs) ou celobioidrolases (CBH), e as β -(1 \rightarrow 4)-glucosidases (β G) (HIMMEL *et al.*, 2001) que são produzidas por fungos ou bactérias, como o *Trichoderma reesei* (MONTENECOURT e EVELEIGH, 1977) e a *Butyrivibrio fibrisolvens* (TEATHER e WOOD, 1982), respectivamente.

As EnGs e ExGs interagem mais facilmente com a celulose pela existência de um Módulo de Ligação a Carboidrato (do inglês, *Carbohydrate Binding Module – CBM*), que é um peptídeo auxiliar ao domínio catalítico (DC) que apresenta resíduos de tirosina e triptofano dispostos paralelamente aos resíduos de anidrogucose e, portanto, podem realizar com estes ligações de hidrogênio e de Van der Waals, tornando mais eficiente o processo de adsorção das enzimas à superfície da celulose (NOTENBOOM *et al.*, 2001).

A ação sinérgica das celulases inicia-se pela atuação das EnGs, que possuem DC em forma de fenda, sobre as regiões de menor organização estrutural da celulose, onde promovem o rompimento das ligações glicosídicas gerando terminais redutores e não-redutores (RABINOVICH *et al.*, 2002). As terminações formadas são os sítios de ação das ExGs, que possuem o DC em forma de túnel e dependem da penetração da cadeia de celulose através deste para que ocorra a ação catalítica, a qual resulta em celobiose como produto majoritário (SILVEIRA *et al.*, 2014b). Desta forma, as ExGs atuam de maneira progressiva diminuindo o grau de polimerização e solubilizando gradativamente a celulose. Por sua vez, a celobiose e outros oligômeros de baixa massa molecular, produzidos pela ação das EnGs e ExGs, são passíveis de conversão em glucose pela ação das β G. A atuação das celulases sob o substrato celulósico está apresentada na FIGURA 8.

Além disso, o complexo celulolítico pode ser auxiliado por proteínas não-hidrolíticas que aumentam a taxa de conversão da celulose, como suoleninas e monooxigenases polissacarolíticas (do inglês *Lytic Polysaccharide Monooxygenases*, LPMO). Conforme representado na FIGURA 8, as suoleninas promovem a desaglomeração das cadeias de glucanas nas regiões cristalinas da celulose, causando amorfogênese (CHEN *et al.*, 2010). Desta maneira, diminuem o tamanho das partículas e a cristalinidade do substrato, o que pode facilitar a adsorção das

celulases e aumentar a sua atividade (CHEN *et al.*, 2010). Dentre as monooxigenases polissacarolíticas existem as glucosil hidrolases da família 61 (GH61) (HARRIS *et al.*, 2010), hoje classificadas como Atividades Auxiliares da família 9 (AA9), cuja ação também está representada na FIGURA 8. A ação das GH61 nas regiões cristalinas e amorfas da celulose promovem a clivagem oxidativa da ligação glicosídica, que resulta na geração de um terminal oxidado e uma terminação não redutora. Uma proposta do mecanismo de atuação destas enzimas foi descrito por Silveira *et al.* (2014b). Estes autores sugeriram que a oxidação de um resíduo de anidrogucose resulta na abertura do anel hemiacetálico pela transformação em ácido aldônico e, por este motivo, a cadeia aberta altamente solvatada é capaz de alavancar gradualmente a cadeia de celulose, gerando novos sítios de ação para as EnG e ExG.

Além da celulose, os polissacarídeos que compõem a família das hemiceluloses também podem ser hidrolisados por hidrolases. Assim, o complexo hemicelulolítico apresenta enzimas como endoxilanases, endomananases, α -arabinofuranosidasases, feruloil esterases, acetil esterases, entre outras. As xilanases são as enzimas de maior importância no complexo hemicelulolítico, tendo em vista a presença de xilanas em praticamente todos os vegetais. Estas enzimas são classificadas como hidrolases das famílias 10 e 11 e, assim como as celulases, podem apresentar CBM em sua estrutura, que podem adsorver tanto na superfície de xilanas como na própria celulose (BIELY *et al.*, 1997). A atuação das xilanases consiste na quebra de ligação do tipo β -(1 \rightarrow 4) gerando majoritariamente xilobiose e outros oligômeros de baixa massa molar (SILVEIRA *et al.*, 2014b). Desta maneira, o uso de uma razão específica entre celulases e xilanases, pode ser importante na obtenção de maiores rendimentos de hidrólise, principalmente quando consideradas tecnologias de pré-tratamento que conservam a fração hemicelulósica (VÁRNAI *et al.*, 2011).

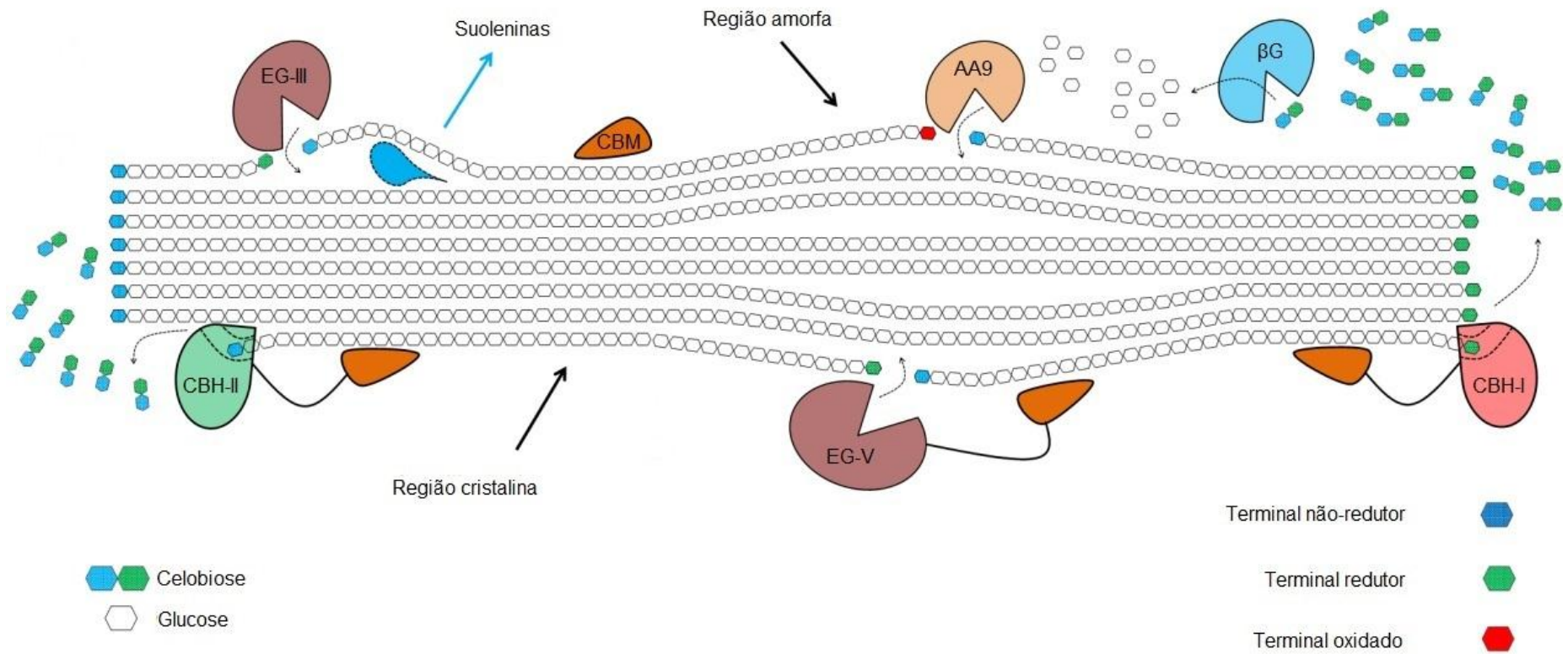


FIGURA 8 – REPRESENTAÇÃO PICTÓRICA DA AÇÃO DAS ENZIMAS E PROTEÍNAS AUXILIARES DO COMPLEXO CELULOLÍTICO SOBRE A ESTRUTURA ASSOCIATIVA DA CELULOSE.

FONTE: SILVEIRA *et al.* (2014b).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO PRINCIPAL

Estudar os efeitos do pré-tratamento empregando CO₂ supercrítico, etanol e líquido iônico sobre a composição química e a suscetibilidade à hidrólise enzimática de diferentes materiais lignocelulósicos.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A. Extrair os compostos solúveis em etanol 95 % presentes em diferentes materiais lignocelulósicos como etapa preliminar para os estudos de pré-tratamento empregando CO₂ supercrítico, etanol e líquido iônico;
- B. Caracterizar os extratos etanólicos derivados de diferentes materiais lignocelulósicos por cromatografia bidimensional abrangente em fase gasosa;
- C. Estudar o pré-tratamento de diferentes materiais lignocelulósicos com dióxido de carbono supercrítico (scCO₂) na presença de etanol e líquido iônico (LI) como co-solvente;
- D. Avaliar os efeitos causados pelo pré-tratamento sobre a composição química e morfologia dos diferentes materiais lignocelulósicos e estabelecer correlação entre estes resultados e as suas respectivas suscetibilidades à hidrólise enzimática, empregando o preparado enzimático Cellic CTec3;
- E. Investigar a influência de atividade hemicelulásica suplementar (Cellic HTec3) sobre o potencial de sacarificação enzimática dos substratos pré-tratados.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

Neste trabalho foram utilizados os seguintes materiais lignocelulósicos: palha de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) e serragens de pinus (*Pinus taeda*) e de eucalipto (*Eucalyptus urograndis*). A palha de cana-de-açúcar foi cedida pela Indústria Sucroalcooleira São Martinho (São Paulo), o capim-elefante foi provido pela Prof. Dra. Marli Camassola (Universidade de Caxias do Sul, RS) e os cavacos de madeira foram fornecidos pelo Prof. Dr. Antônio Higa (Departamento de Engenharia Florestal da UFPR).

As preparações celulásicas (Cellic CTec3) e hemicelulásicas (Cellic HTec3) utilizadas para a hidrólise enzimática dos materiais pré-tratados foram fornecidas pela Novozymes Latin America (Araucária, PR, Brasil). O líquido iônico utilizado no pré-tratamento foi o acetato de 1-butil-3-metilimidazol (Bmim[OAc]) (Sigma-Aldrich, MO, USA). O dióxido de carbono empregado no pré-tratamento apresentava 99,8 % de pureza e foi adquirido da White-Martins (Curitiba, PR, Brasil), enquanto que o etanol anidro (99 %) e hidratado (95 %) foram fornecidos pela Neon (São Paulo, SP, Brasil). Os outros reagentes utilizados no projeto como solventes, reagentes e padrões cromatográficos e espectrométricos apresentaram grau de pureza compatível ao exigido pelos procedimentos experimentais.

4.2. EXTRAÍVEIS

4.2.1. EXTRAÇÃO DE BIOMASSA

Nesta etapa, uma massa conhecida de biomassa *in natura* é submetida a extrações exaustivas em aparelho Soxhlet com etanol 95 % e, quando necessário, água para remoção de componentes de baixa massa molar presentes na parede celular (SLUITER *et al.*, 2008b). As extrações com água são necessárias apenas para biomassas de gramíneas como a palha de cana e o capim-elefante, devido à presença de compostos hidrossolúveis como carboidratos de baixa massa molar (sacarose). Por outro lado, extrações apenas com etanol foram feitas para biomassas que contêm baixo teores de extraíveis em água como, por exemplo, madeiras moles (coníferas) e madeiras duras (folhosas). As extrações foram feitas em triplicata por cerca de 7 h e os materiais extraídos com etanol 95 % foram

caracterizados e reservados para o pré-tratamento, sendo que o etanol residual foi eliminado por evaporação a 35 °C. O extrato etanólico foi evaporado e pesado, o que permitiu determinar o teor mássico de extraíveis em relação à massa seca dos materiais lignocelulósicos de origem.

4.2.2. CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRAÍVEIS POR CROMATOGRAFIA DE FASE GASOSA BIDIMENSIONAL ABRANGENTE E ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CGXCG/TOF-MS)

Os extraíveis em etanol obtidos no procedimento do item 4.2.1 foram caracterizados através da técnica de cromatografia de fase gasosa bidimensional abrangente acoplada a um espectrômetro de massas com detecção por tempo de voo (TOF-MS). Estas análises foram realizadas na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) em parceria com a Prof. Dra. Elina Caramão. O equipamento utilizado foi o Pegasus 4D LECO que consiste em um cromatógrafo a gás com forno secundário Agilent 6890N (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), um amostrador automático Combi PAL (CTC Analytics, AG, Zwingen, Suíça) e um modulador térmico de dois estágios com quatro jatos de nitrogênio (LECO, St Joseph, MI, USA). O cromatógrafo a gás teve seu forno principal equipado com uma coluna DB-5 (5 % fenil e 95 % polidimetilsiloxano; 60 m x 0,18 mm de DI; 0,18 µm) correspondente à primeira dimensão (¹D), enquanto que o forno secundário continha uma coluna DB-17 (50 % fenil e 50 % polidimetilsiloxano; 2,05 m x 0,18 mm de DI; 0,25 µm) para a segunda dimensão (²D). O preparo das amostras consistiu na diluição de aproximadamente 0,08 g de extrato em 1,5 mL de metanol. O volume de injeção foi de 1 µL no modo *split* com razão de 1:30 e temperatura do injetor de 280 °C. A programação de temperatura do forno principal foi de 40 °C durante os primeiros 0,2 min, seguido de aquecimento até 300 °C a uma taxa de 4 °C min⁻¹, onde permaneceu por 15 min. A temperatura do segundo forno foi mantida em 10 °C acima da temperatura do forno principal. A modulação entre as colunas foi realizada em um período de 8 s, com a temperatura do modulador em 35 °C. Na detecção por TOF-MS, a energia de ionização foi de 70 eV, a voltagem do detector foi de -1,46 kV e a temperatura da linha de transferência e da fonte de íons foram de 290 e 250 °C, respectivamente. A faixa de massas de íons adquiridos foi de 45 a 450 Daltons, com uma frequência de aquisição de dados

de 100 Hz. A aquisição e processamento dos dados foi feita através do software ChromaTOF v3.32. Também foram calculados, de acordo com a metodologia de van den Dool e Kratz (1963), os índices de retenção (IR) dos compostos encontrados. Para isso, injetou-se uma mistura padrão de *n*-alcanos de cadeia de C8 a C30 como referências externas nas mesmas condições cromatográficas das amostras de extraíveis, cuja análise permitiu a obtenção dos IR dos analitos de interesse por meio da EQUAÇÃO 1,

$$IR = 100n + 100\left(\frac{t_{Ri} - t_{Rn}}{t_{R(n+1)} - t_{Rn}}\right) \quad \text{EQUAÇÃO 1}$$

onde *n* representa o número de carbonos do padrão de alcano com tempo de retenção imediatamente menor que o do analito, t_{Ri} é o tempo de retenção do analito de interesse, t_{Rn} o tempo de retenção do padrão de alcano com tempo de retenção imediatamente menor que o do analito e $t_{R(n+1)}$ é o tempo de retenção do padrão de alcano com tempo de retenção imediatamente maior que o do analito.

4.3. DETERMINAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE CINZAS

A determinação de compostos inorgânicos a partir da biomassa extraída com etanol foi feita de acordo com Sluiter *et al.* (2008a), onde uma massa de substrato (~1,0g) foi colocada em um cadinho de porcelana previamente calcinado, o qual foi submetido a uma rampa de aquecimento de cerca de 1 h da temperatura ambiente até 575 °C, onde permaneceu por 20 h no total. Neste procedimento, as análises foram feitas em triplicata e a quantidade de matéria inorgânica foi determinada por gravimetria em relação à massa seca do material de origem.

4.4. PRÉ-TRATAMENTO DE SUBSTRATOS EM SISTEMA SUPERCRÍTICO

Nesta seção encontra-se descrito o procedimento empregado para o pré-tratamento com líquidos iônicos e etanol em CO₂ supercrítico (scCO₂/LI-EtOH). Esta proposta de pré-tratamento, apresentada no diagrama da FIGURA 9, consiste de um esquema de biorrefinaria baseado, primariamente, na deslignificação parcial de materiais lignocelulósicos e no aumento da suscetibilidade destes à hidrólise enzimática, além da potencial aplicação de diferentes frações para produção de

insumos para a indústria química, como os compostos de baixa massa molar e a lignina extraídos antes e após o pré-tratamento, respectivamente. Nesta seção ainda estão descritos os materiais e métodos necessários para a caracterização química e estrutural dos materiais gerados no pré-tratamento utilizando $\text{scCO}_2/\text{EtOH-LI}$.

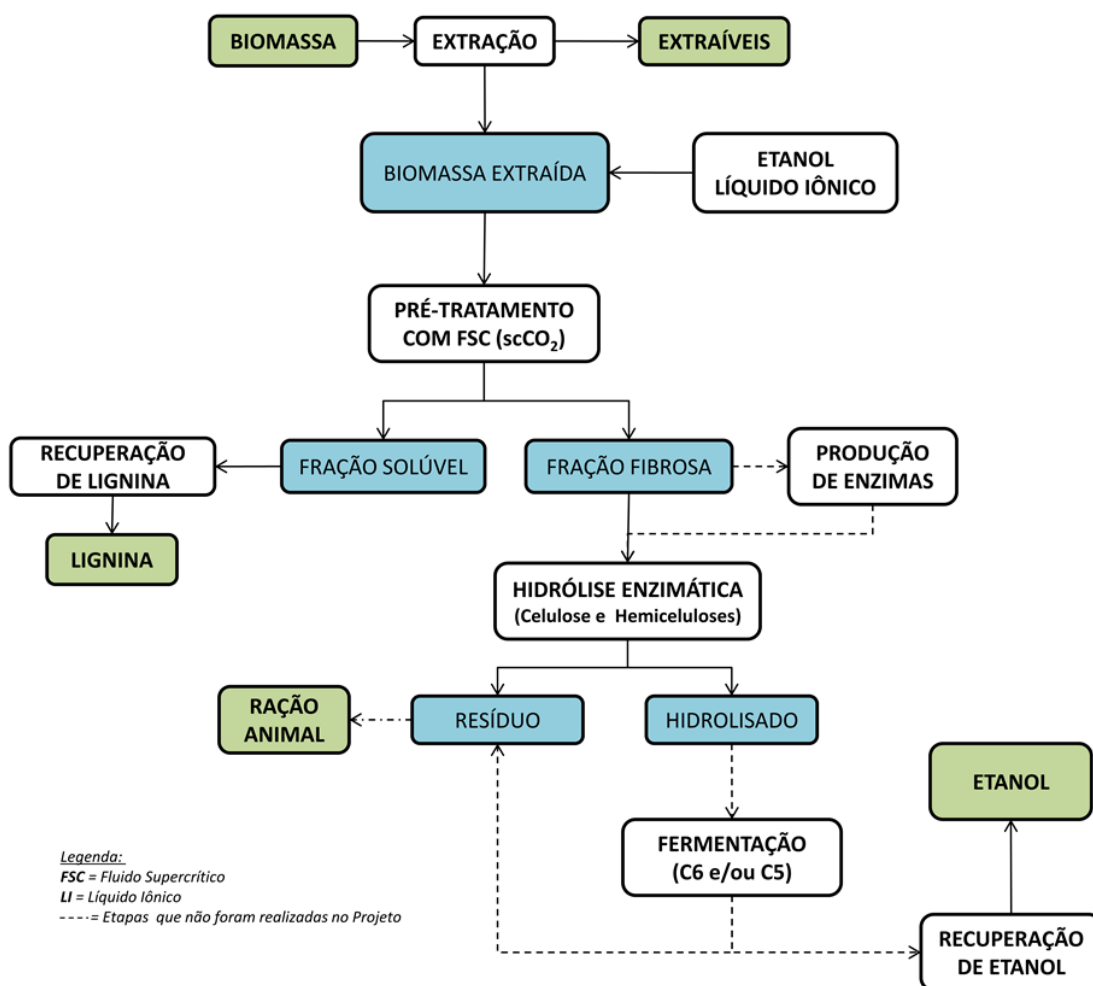


FIGURA 9 – DIAGRAMA DA PRODUÇÃO DE BIOETANOL BASEADO NA UTILIZAÇÃO DE ETANOL, LÍQUIDO IÔNICO E CO_2 SUPERCRÍTICO NO PRÉ-TRATAMENTO DE BIOMASSA.

Os ensaios de pré-tratamento foram realizados em reator Parr de 50 mL de volume interno contendo aproximadamente 2,1 g de biomassa, 2,0 mL (2,1 g) do líquido iônico $\text{Bmim}[\text{OAc}]$ e 20 mL de etanol. O reator foi então pressurizado com 40-60 mL de CO_2 com auxílio de uma bomba de alta pressão do tipo seringa (ISCO, NE, USA). Após a injeção, o sistema foi condicionado à temperatura (110-180°C) e pressão (250 bar) desejadas, dando-se início ao pré-tratamento que teve duração de 2 h. Por fim, o reator foi resfriado, despressurizado e o substrato lavado com 50 mL

de etanol. A suspensão foi filtrada em funil de Büchner para recuperação do extrato etanólico e o material retido foi seco em estufa a 50 °C até massa constante. Já a fração etanólica teve seu volume medido e foi então armazenada para análises futuras. Já o material pré-tratado foi armazenado para ser submetido às análises de composição química, microscopia eletrônica e hidrólise enzimática seguindo os procedimentos descritos abaixo.

4.5. ANÁLISE DE ÂNION ACETATO RESIDUAL NOS MATERIAIS PRÉ-TRATADOS

A análise de ânions acetato permitiu a quantificação do líquido iônico Bmim[OAc] residual nos substratos produzidos pelo pré-tratamento. Esse método consiste na premissa de que o LI Bmim[OAc] contém uma quantidade equimolar de ânion acetato e do cátion 1-butil-3-metilimidazol; portanto, a massa de LI residual pode ser determinada indiretamente pela quantificação deste ânion. O procedimento foi conduzido através da lavagem de 0,150 g de substrato pré-tratado com 3 mL de água deionizada em um tubo de ensaio, cujo sistema permaneceu sob agitação durante 12 h. Posteriormente, 1 mL do sobrenadante foi coletado, tamponado com solução $\text{Na}_2\text{PO}_4/\text{NaHPO}_4$ pH 7,0 e avolumado para um total de 5 mL com água deionizada. As amostras preparadas foram então analisadas em um sistema de cromatografia de íons Metrohm modelo 882 Compact IC plus, equipado com amostrador automático modelo 863 Compact, coluna Metrosep A supp5 (150 x 4,0 mm; 5,0 μm), pré-coluna Metrosep RP e detecção por célula de condutividade. As corridas cromatográficas foram realizadas a 32 °C em sistema de eluição isocrático empregando uma solução de carbonato e bicarbonato de sódio ($\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$) 0,7 mmol L^{-1} a uma vazão de 1,0 mL min^{-1} . A quantidade de ânion acetato em solução foi determinada por calibração externa. Todas as análises foram realizadas em triplicata e os substratos lavados com água delas derivados foram secos em estufa de 40 °C e depois analisados em relação a sua composição química.

4.6. ANÁLISE QUÍMICA DOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

A composição química dos materiais extraídos com etanol e pré-tratados pelo procedimento $\text{scCO}_2/\text{LI-EtOH}$ foi realizada segundo Sluiter *et al.* (2011), que consiste na determinação das ligninas solúvel e insolúvel em ácido, seguida da

análise de carboidratos por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE). O método consiste na hidrólise de 0,100 g de material com 1 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 72 % por 1 h a 30 °C. Então, a solução é diluída com 28 mL de água e condicionada em autoclave a 121 °C durante 1 h. O sistema é então filtrado com auxílio de cadinhos de Gooch de porosidade média, sendo o hidrolisado avolumado para 100 mL e reservado para análises cromatográficas e espectrométricas. A massa retida nos cadinhos é seca até massa constante a 105 °C e o teor de lignina insolúvel em ácido é determinado por gravimetria em relação à massa seca do material analisado. O filtrado avolumado do procedimento descrito acima é então destinado às medidas de lignina solúvel em ácido e de quantificação de carboidratos e dos produtos de desidratação deles derivados. A lignina solúvel em ácido é determinada por espectrofotometria no UV e quantificada pela Lei de Beer, empregando os coeficientes de absorvidade e comprimento de onda específico sugeridos pelo método de análise. Já os carboidratos presentes nos hidrolisados ácidos são quantificados por CLAE empregando um sistema de cromatografia de íons Metrohm modelo 850 Professional IC com detecção amperométrica, equipado com sistema de bombeamento modelo 818 IC, amostrador automático modelo 863 Compact e coluna Dionex Carbo Pac 10 (250 x 4,6 mm; 7,0 μm). As análises foram realizadas a 32 °C empregando eluição gradiente baseada em solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 mmol L^{-1} com 50 min de análise, sendo que os últimos 25 min são necessários para o condicionamento da coluna à análise subsequente. A seguinte ordem de eluição é esperada para esta coluna: arabinose, galactose, glucose, xilose, manose e celobiose. Em cada caso, foi considerado um fator de correção devido à inserção de uma molécula de água durante o processo de hidrólise ácida, sendo estes fatores de 0,95 para a celobiose, de 0,90 para a glucose e galactose, de 0,88 para xilose e arabinose. Os grupos acetila e os produtos de desidratação de carboidratos – hidroximetilfurfural (HMF) e furfural– também foram quantificados por CLAE em cromatógrafo Shimadzu LC10AD equipado com coluna Aminex HPX-87H. A detecção para grupos acetila foi realizada por índice de refração na forma de ácido acético e, para HMF e furfural, o detector empregado foi de espectrofotometria no ultravioleta no comprimento de onda de 254 nm. As análises foram realizadas a 65°C e usando H_2SO_4 5 mmol L^{-1} como fase móvel. A quantificação dos analitos foi realizada por calibração externa em faixas de concentração adequadas para todos os componentes.

4.7. DETERMINAÇÃO DO BALANÇO DE MASSA NOS ENSAIOS DE PRÉ-TRATAMENTO

Os balanços de massa foram realizados para a determinação da recuperação dos componentes na fração sólida dos materiais após o pré-tratamento com $\text{scCO}_2/\text{LI-EtOH}$ nas duas temperaturas experimentais, 110 e 180 °C. Para isso foi determinado o rendimento mássico dos pré-tratamentos por gravimetria, usando a diferença entre a massa de material extraído com etanol 95 % (MEE) com que o reator foi inicialmente alimentado e a massa de substrato produzida após a extração do LI residual, cuja presença foi quantificada segundo o item 3.5. Na sequência, através dos rendimentos mássicos (R_M) e das composições químicas dos MEE e dos materiais pré-tratados (vide item 3.6), foram determinadas as recuperações mássicas relativas a cada um dos principais componentes das biomassas envolvidas neste estudo.

4.8. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

A suscetibilidade dos diferentes materiais pré-tratados com $\text{scCO}_2/\text{LI-EtOH}$ à hidrólise enzimática foi determinada através do potencial de sacarificação do substrato após 12 h de reação, utilizando 5 % (m m^{-1} , base seca) de sólidos totais e 0,01 g de Cellic CTec3 (massa líquida) por grama de substrato seco a 50 °C em tampão acetato 50 mmol L^{-1} pH 4,8. Ainda foram realizados experimentos complementares nas mesmas condições, porém, com a adição de uma quantidade suplementar de 10 % de Cellic HTec3 em relação à massa de Cellic CTec3. A quantificação dos monossacarídeos nos hidrolisados foi feita empregando-se o sistema de cromatografia de íons descrito no item 4.6. O potencial de sacarificação de cada substrato foi obtido pela relação entre a quantidade de carboidratos recuperados na hidrólise e a quantidade inicial destes presente nos materiais pré-tratados.

4.8.1. DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE CELULÁSICA TOTAL

A atividade enzimática do preparado enzimático Cellic CTec3 contra papel filtro Whatman N°1 (PFW) foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Silveira *et al.* (2014a), baseada na quantificação de açúcares redutores totais (AR_{Tot}) liberados ao longo da hidrólise. Neste método, a quantificação de AR_{Tot} é

realizada através do método colorimétrico que emprega o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) como agente oxidante conforme Miller (1959). Os valores de AR_{Tot} foram determinados através de uma curva analítica de 0,0 a 2,0 mg de glucose.

Inicialmente, os tubos de ensaio contendo PFW e 1,0 mL de tampão acetato de sódio 50 mmol g^{-1} (pH 4,8) foram incubados por 10 min para equilíbrio térmico e a reação iniciou-se pela adição de 1,0 mL de solução enzimática (nas mesmas condições de concentração e pH utilizada nos ensaios de hidrólise) e foi conduzida por 10 min, pois neste intervalo de tempo o comportamento de liberação de AR_{Tot} mantém-se linear (SILVEIRA *et al.*, 2014a).

Para a determinação de atividade capaz de liberar açúcar redutor a partir do substrato empregado (ARS, do inglês *Activity Able to Release Reducing Sugars*), foi utilizada a EQUAÇÃO 2,

$$ARS_{Tot} (UI) = \frac{Glc(mg)}{0,18 \frac{mg}{\mu mol} \times V_{enz} (mL) \times t (min)} \quad \text{EQUAÇÃO 2}$$

onde Glc representa a quantidade de AR_{Tot} liberada em mg de equivalentes de glucose, V_{enz} representa o volume de enzima e t é o tempo de reação. Vale ressaltar que a medida de atividade celulásica total, realizada desta forma, fornece valores equivalentes ao método desenvolvido por Ghose (1987), conforme demonstrado anteriormente por Silveira *et al.* (2014a).

4.8.2. DETERMINAÇÃO DE DESEMPENHO ENZIMÁTICO NA HIDRÓLISE DOS SUBSTRATOS PRÉ-TRATADOS POR scCO₂/EtOH-LI

Visando a comparação do desempenho da hidrólise enzimática (DHE) na sacarificação dos substratos antes (amostras MEE) e depois do pré-tratamento por scCO₂/EtOH-LI, os dados de conversão de glucanas foram relacionados com a quantidade de atividade enzimática empregada (ARS_{Tot}) por grama de glucana em cada ensaio, de acordo com a EQUAÇÃO 3,

$$DHE(\% UI^{-1} g) = \frac{Conversão(\%)}{ARS_{Tot} (UI) g^{-1}} \quad \text{EQUAÇÃO 3}$$

4.9. DIFRATOMETRIA DE RAIOS-X

A difratometria de raios-X (DRX) foi realizada para analisar as propriedades cristalográficas da fração celulósica dos MEE e dos materiais gerados no pré-tratamento. A análise foi realizada utilizando-se um difratômetro modelo XRD-6000 (Shimadzu, Japão) localizado no Laboratório de Óptica de Raios-X e Instrumentação do Departamento de Física da UFPR. O equipamento continha um tubo gerador de radiação correspondente à linha $K\alpha$ ($\lambda = 0,1542$ nm) de átomos de cobre operando em 40 kV e 30 mA e as intensidades foram medidas no intervalo $5^\circ \leq 2\theta \leq 60^\circ$ na taxa de 2° de 2θ min^{-1} , com aquisições a cada variação angular de $0,02^\circ$.

A análise dos parâmetros cristalográficos foi feita pela deconvolução dos picos da reflexão 200 da celulose utilizando-se o software Origin 7.0. Isto permitiu cálculos mais precisos de cristalinidade e cálculos de distância de ligações de hidrogênio e de largura dos cristais da reflexão 200, típica da celulose cristalina. O índice de cristalinidade (CrI) das amostras foi determinado pelo método empírico proposto por Segal *et al.* (1959), através da EQUAÇÃO 4,

$$CrI = \frac{I_{200} - I_{am}}{I_{200}} \times 100 \quad \text{EQUAÇÃO 4}$$

onde I_{200} corresponde à intensidade da região cristalina em $22,5^\circ$ de 2θ e I_{am} à região amorfa localizada em $18,5^\circ$ de 2θ . Já a distância entre as ligações de hidrogênio (d) para a reflexão 200 da celulose foi estimada utilizando a Lei de Bragg (BRAGG, 1913) de acordo com a EQUAÇÃO 5,

$$n\lambda = 2d \times \text{sen}\theta \quad \text{EQUAÇÃO 5}$$

sendo n um inteiro, λ o comprimento de onda da radiação Cu- $K\alpha$ e θ o ângulo de Bragg correspondente à maior intensidade do pico da reflexão 200. Por sua vez, a largura dos cristalitos de celulose (L) foi estimada pela EQUAÇÃO 6 proposta por Patterson (1939):

$$L = \frac{K \times \lambda}{\beta \times \cos \theta}$$

EQUAÇÃO 6

onde K é uma constante para celulose I de materiais lignocelulósicos com o valor de 0,94, λ o comprimento de onda da radiação Cu-K α , β é a largura à meia altura do pico da reflexão 200 e θ o ângulo de Bragg correspondente à maior intensidade do pico da reflexão 200.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRAÍVEIS

Os materiais lignocelulósicos selecionados para este estudo foram inicialmente extraídos com etanol 95 % para remover compostos de baixa massa molar que pudessem eventualmente interferir na interpretação dos resultados dos processos de pré-tratamento e hidrólise enzimática, bem como para simular um processo de biorrefinarias em que os extraíveis seriam destinados à outras aplicações na indústria química, dependendo obviamente de sua composição.

Os materiais *in natura* preparados para o pré-tratamento apresentaram diferentes rendimentos mássicos em relação às extrações com etanol 95 %. A porcentagem de extraíveis em relação à massa seca de material foi, naturalmente, maior para as gramíneas (12,11 % para capim-elefante e 4,88 % para a palha de cana-de-açúcar) em virtude da grande quantidade de pigmentos e outras substâncias presentes no material foliar. Já para as madeiras, os extraíveis em etanol 95 % representaram apenas 2,80 % para o pinus e 1,55 % para o eucalipto.

5.1.1. CROMATOGRAFIA DE FASE GASOSA BIDIMENSIONAL (GCxGC/TOF-MS)

Com o intuito de verificar quais compostos são encontrados nos extratos etanólicos, a técnica de cromatografia bidimensional abrangente com espectrometria de massas por tempo de voo (GCXGC/TOF-MS) foi utilizada e os principais resultados obtidos encontram-se apresentados nos ANEXOS 1, 2, 3 e 4 deste trabalho, na forma de gráficos de cores e de dispersão e tabelas de compostos majoritários encontrados nos extratos de palha, capim-elefante, pinus e eucalipto, respectivamente.

Os gráficos de dispersão foram construídos com base nos tempos de retenção da primeira (1t_R) e segunda dimensão (2t_R) de compostos que apresentam áreas significativas no cromatograma ($>0,01$ %). Estes foram primariamente classificados pela função química que apresentam de acordo com os íons moleculares apresentados nos espectros de massa obtidos experimentalmente. Porém, na elucidação desses compostos, deve ser ressaltado que as classes químicas podem ser alteradas de acordo com outras opções de moléculas que

apresentem espectros de massa mais similares com os experimentais e, devido à complexidade dos dados obtidos, tal interpretação ainda não foi totalmente concluída. Por outro lado, os compostos majoritários presentes nos extratos foram devidamente identificados utilizando-se, além da similaridade (S) entre espectros de massa experimentais e teóricos, o cálculo de índice de retenção (IR). Os IR dos analitos foram determinados com base em uma série homóloga de hidrocarbonetos (C_8-C_{30}) que foram eluídos nas mesmas condições analíticas dos extratos de acordo com a metodologia de van den Dool e Kratz (1963), que leva em consideração a programação de temperatura linear em cromatografia de fase gasosa. Desta maneira, a aproximação entre os IR experimentais (IR_{CALC}) e teóricos (IR_{LIT}) dos diferentes compostos consiste em uma ferramenta complementar de identificação, que corrobora a comparação entre espectros.

A FIGURA 10 apresenta o diagrama 3D obtido na análise cromatográfica do extrato etanólico da palha. O gráfico de dispersão para este extrato, presente no ANEXO 1, apresenta 211 compostos que foram classificados de acordo com sua função química e representam 91 % da área total do cromatograma. Dentre estes, as classes predominantes são fenóis (42 compostos), nitrogenados (35), ácidos carboxílicos (32), cetonas (23) e hidrocarbonetos (15).

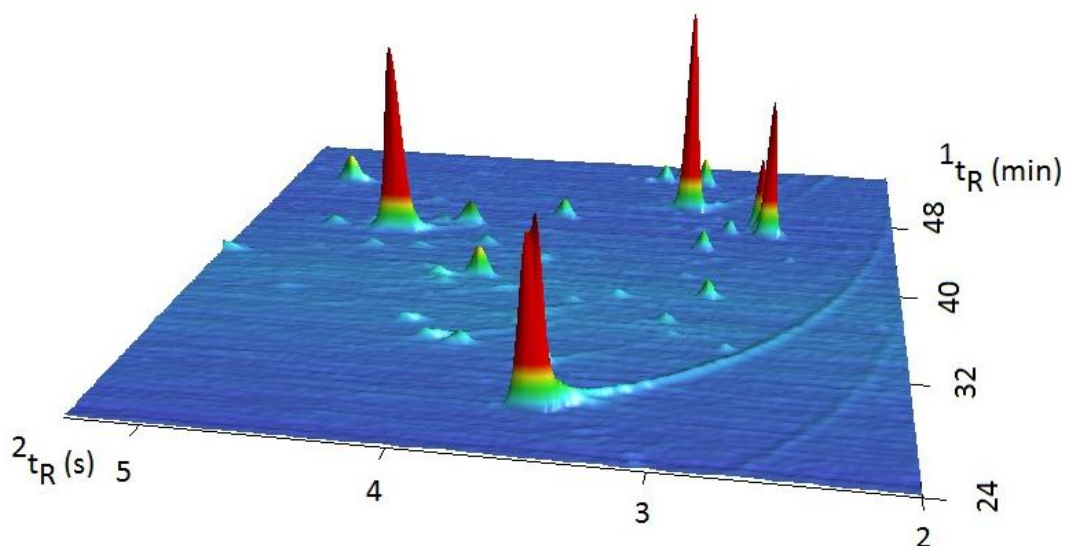


FIGURA 10 – DIAGRAMA 3D DERIVADO DA ANÁLISE DO EXTRATO ETANÓLICO DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR POR GCXGC/TOF-MS.

O composto majoritário é o 4-vinilfenol, que possui uma área de 29,32 %. Este composto apresentou um IR_{CALC} de 1221 para um IR_{LIT} de 1226, conforme El-Sayed *et al.* (2005). Porém, não existem evidências para a ocorrência natural do 4-vinilfenol em plantas, o que permitiu inferir que este é produto de descarboxilação do ácido *p*-cumárico, que está presente em ampla quantidade nas paredes celulares de gramíneas como a cana-de-açúcar (DESCHAMPS e RAMOS, 2002; BERNINI *et al.*, 2007). Com o intuito de investigar a ausência do ácido *p*-cumárico na composição química das amostras analisadas por GCXGC/TOF-MS, injetou-se um padrão deste composto nas mesmas condições cromatográficas a que foram submetidos os demais extratos. O cromatograma bidimensional apresentado na FIGURA 11 demonstra que quase a totalidade do ácido *p*-cumárico sofreu reação de descarboxilação para o 4-vinilfenol. Este fato foi atribuído à temperatura utilizada no injetor, de 280 °C, que promove a descarboxilação do ácido *p*-cumárico e provavelmente de outros ácidos cinâmicos passíveis de serem encontrados nos extratos, como os ácidos ferúlico e vanílico, originando assim o 2-metoxi-4-vinilfenol e o vinilsiringol, respectivamente.

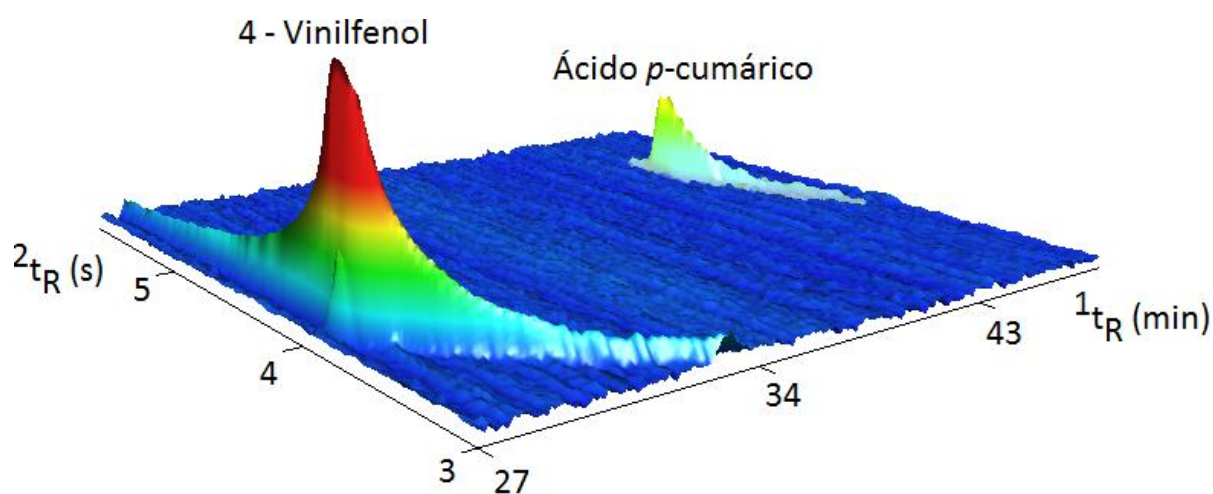


FIGURA 11 – DIAGRAMA 3D DERIVADO DA ANÁLISE DO PADRÃO DE ÁCIDO *p*-CUMÁRICO POR GCXGC/TOF-MS.

Além disso, outros compostos representativos encontrados nesse extrato são associados a produtos de degradação térmica de palha de cana-de-açúcar através da pirólise como o 4-hidroxi-benzaldeído (3,05 %), 4-hidroxi-3-metoxi-benzaldeído

(vanilina) (0,61 %), 2,4-dimetoxi-acetofenona (0,77 %) e 1,6-anidro- α -D-glucopiranosose (levoglucosan) (0,80 %) (CUNHA *et al.*, 2013). No entanto, a temperatura do injetor não pode ser diminuída porque deve garantir-se que toda a amostra de extraíveis seja volatilizada antes de entrar na coluna para evitar problemas de entupimento no cromatógrafo. Outros compostos representativos foram os ácidos carboxílicos, representados principalmente pelos ácidos palmítico (C16:0) (7,22 %), esteárico (C18:0) (0,81 %) e oleico (C18:1) (0,83 %). Também foi verificada a presença de fitol (1,41 %), que é um álcool diterpenóide acíclico derivado do metabolismo da clorofila em plantas.

O gráfico de dispersão construído para o extrato etanólico de capim-elefante, localizado no ANEXO 2, apresenta 167 compostos que representam 69,3 % da área total do cromatograma, onde figuram ácidos carboxílicos (40 compostos), cetonas (27), nitrogenados (22) e fenóis (15). Já dentre os componentes mais abundantes foram identificados o glicerol, ácidos graxos e seus respectivos ésteres. A área do glicerol foi quantificada como sendo 18,59 %, cujo alto valor pode ser atribuído ao fato deste composto ser característico de material foliar de gramíneas (GERBER *et al.*, 1988). Embora as bibliotecas consultadas não apresentem o IR_{LIT} do glicerol, este composto pode ser confirmado através da espectrometria de massas, cuja similaridade apresentada foi maior que 90 %.

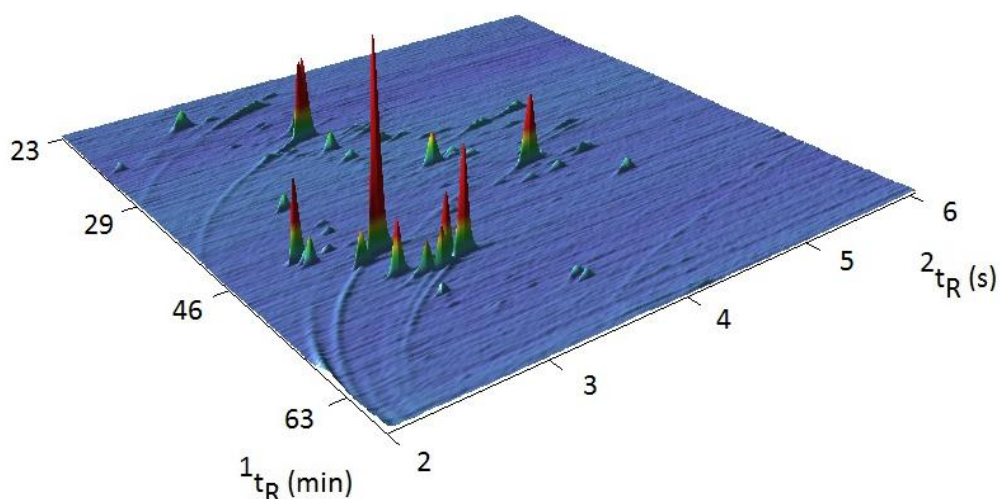


FIGURA 12 – DIAGRAMA 3D DERIVADO DA ANÁLISE DO EXTRATO ETANÓLICO DO CAPIM-ELEFANTE POR GCXGC/TOF-MS.

Assim como para o extrato da palha, esta amostra também demonstrou compostos quimicamente modificados como o próprio 4-vinilfenol (10,52 %) e o 5-hidroximetil-furfural (1,93 %). Dentre os ácidos graxos presentes nos compostos majoritários, encontrou-se ácido palmítico (C16:0) (5,25 %) e seu éster etílico (1,31 %), ácido linolênico (C18:2) (3,60 %) e seu éster etílico (0,85 %), ácido linolelaídico (C18:2) (1,88 %) e ácido oleico (C18:1) (0,83 %). Assim como para o extrato de palha de cana, também foi identificada a presença de fitol (1,70 %). A FIGURA 12 apresenta o diagrama 3D obtido na análise cromatográfica do extrato etanólico do capim-elefante.

A FIGURA 13 apresenta o diagrama 3D obtido na análise cromatográfica do extrato etanólico da serragem de pinus. O gráfico de dispersão, apresentado no ANEXO 3, possui 274 compostos classificados que representam 98,5 % da área total do cromatograma. Este extrato apresentou uma grande diversidade de terpenóides (112 compostos), ácidos carboxílicos (34) e ésteres (31). Os terpenos são produtos de condensação de dois ou mais moléculas de isopreno (2-metilbutadieno), resultando em dímeros e oligômeros que possuem uma fórmula molecular básica de $(C_{10}H_{16})_n$ (SJÖSTRÖM, 1993). Por sua vez, os terpenóides contêm terpenos com funções químicas diversas como, por exemplo, álcool, éster e cetona. Dentre estes, os majoritários encontrados no extrato de pinus foram triterpenóides como o ácido deidroabiético (9,55 %), o 7,15-Isopimaradien-18-oato de etila (3,33 %) e o abietato de metila (2,94 %). Também foi encontrada uma variedade de monoterpenos cujos componentes mais abundantes foram o α -terpineol (3,18 %), a (-)-verbenona (1,47 %), o (-)-pinocarveol (1,24 %) e o borneol (1,06 %). Outros compostos presentes em abundância nos extratos foram os flavonóides diidrocrisina (4,07 %) e naringenina (2,38 %) e a lignana (-)-nortrachelogenina (3,05 %). Estes três últimos compostos não possuem IR_{LIT}, porém, seus espectros de massa possuem mais de 80 % de similaridade com os espectros obtidos experimentalmente.

O gráfico de dispersão do extrato etanólico da serragem de eucalipto, presente no ANEXO 4, apresenta 283 compostos (94,06 % da área do cromatograma), dos quais 57 são hidrocarbonetos, 39 são cetonas, 34 são ésteres e 28 são ácidos carboxílicos.

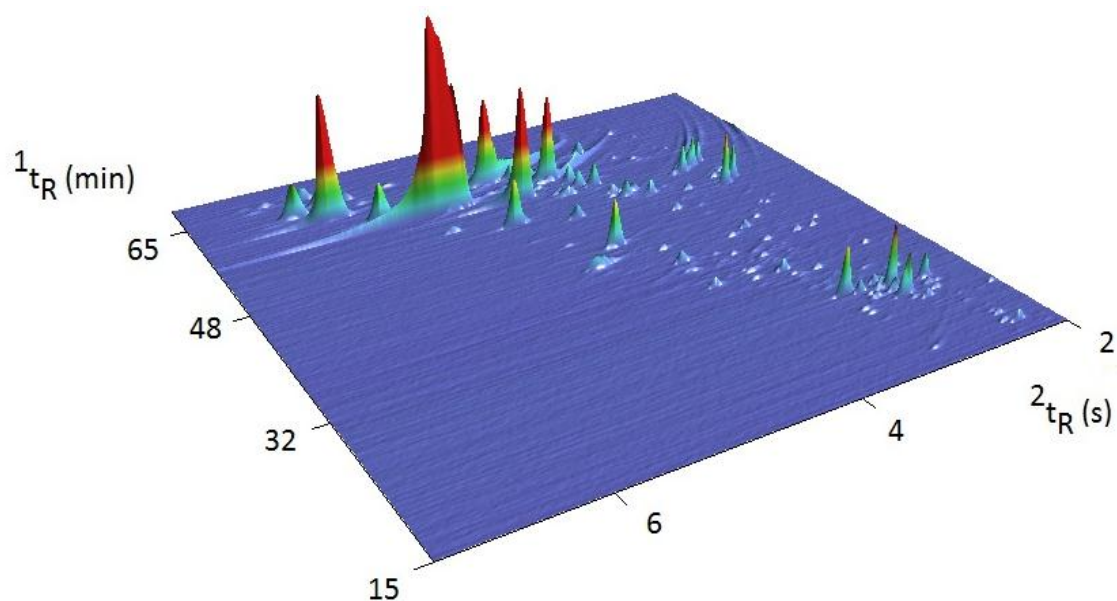


FIGURA 13 – DIAGRAMA 3D DERIVADO DA ANÁLISE DO EXTRATO ETANÓLICO DA SERRAGEM DE *Pinus taeda* POR GCXGC/TOF-MS.

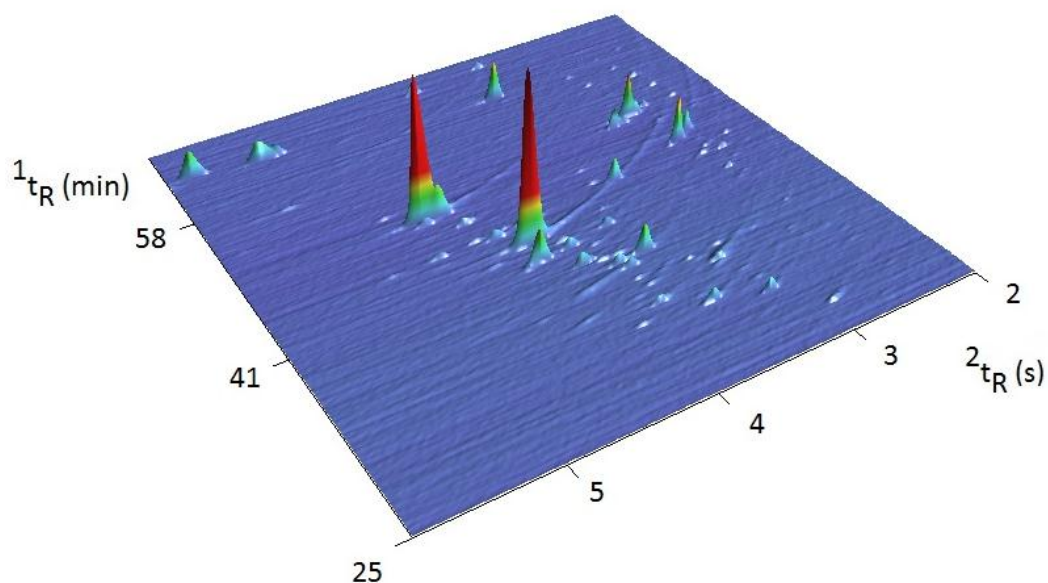


FIGURA 14 – DIAGRAMA 3D DERIVADO DA ANÁLISE DO EXTRATO ETANÓLICO DA SERRAGEM DE *Eucalyptus urograndis* POR GCXGC/TOF-MS.

Dentre os componentes majoritários identificaram-se compostos fenólicos, ácidos, ésteres e hidrocarbonetos como componentes majoritários, porém, o composto mais abundante foi o glicerol (5,63 %). A FIGURA 14 apresenta o diagrama 3D da análise cromatográfica deste extrato. Dentre os componentes até

então elucidados, figuram hidrocarbonetos de cadeias com mais de 20 átomos de carbono, como o n-metiltricosano (0,56 %), o tetracosano (0,57 %), o (*E*)-2-tricoseno (0,87 %), o (*Z*)-2-heneicoseno (0,51 %) e o (*Z*)-2-heptacoseno (0,78 %).

5.2. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS MATERIAIS *IN NATURA*

A quantificação dos extraíveis em etanol 95 % permitiu a obtenção da composição química dos materiais *in natura*, cujos dados estão representados na TABELA 1. Os produtos de desidratação de hexoses e pentoses, ausentes no material de origem e oriundos do procedimento de hidrólise ácida, não foram convertidos a equivalentes de pentoses e hexoses por não se ter certeza da origem dos mesmos. No caso do furfural, é possível inferir que este é majoritariamente decorrente da desidratação de pentoses de maior labilidade química que estão presentes nas hemiceluloses, tais como a arabinose. Já o hidroximetilfurfural (HMF) é proveniente da glucose presente na celulose e nas hemiceluloses ou de outras hexoses como galactose e manose, também presentes nas hemiceluloses. No entanto, é previsível que este componente seja mais facilmente obtido das hexoses presentes nas hemiceluloses, em comparação à maior recalcitrância e organização molecular da celulose.

Os resultados de caracterização química demonstraram as diferenças existentes entre os principais componentes das diferentes biomassas utilizadas neste trabalho. No entanto, deve-se reconhecer que os métodos de análise química utilizados neste estudo não conseguem abranger todas as espécies químicas eventualmente presentes nos materiais lignocelulósicos, razão pela qual os totais obtidos em cada análise não foram necessariamente próximos a 100 %. Por outro lado, a TABELA 1 é fruto de uma série de procedimentos analíticos independentes e cada um deles carrega consigo um erro experimental que, cumulativamente, justifica a variância observada entre os totais obtidos para os materiais envolvidos neste trabalho.

A palha da cana-de-açúcar apresentou um teor de carboidratos de 52,6 %, sendo que 31,62 % foram quantificados como glucanas, 15,83 % como xilanas e 5,17 % como arabinanas, enquanto que a lignina total foi quantificada em 25,47 %. Santos *et al.* (2012) demonstraram que a composição química da palha pode variar de 40 a 44 % de glucanas, 30 a 32 % de hemiceluloses e de 22 a 25 % de lignina

total. Já Szczerbowski *et al.* (2014) relataram uma composição química para a palha de 32,76 % de glucanas, 20,47 % de xilanas, 2,57 % de arabinanas e 21,28 % de lignina total. A diferença da composição química da palha deste trabalho com as citadas na literatura pode ser explicada pela heterogeneidade do material, bem como pelo critério de amostragem utilizado em cada trabalho e por desvios nos rendimentos mássicos oriundos da análise química. Por serem oriundas de uma gramínea, as hemiceluloses da palha são basicamente constituídas por arabinoxilanas com uma relação de três resíduos de xilose para cada um de arabinose. Por outro lado, a quantificação de ácidos urônicos nestas estruturas polissacarídicas não foi possível por limitações no método cromatográfico de análise. Finalmente, foi também observado um alto teor de cinzas (4,70 %), provavelmente devido à alta concentração de sílica no material foliar.

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS *IN NATURA*.

Componentes	Percentual (%)			
	Palha	CE*	Pinus	Eucalipto
Anidrogucose	31,62±1,17	28,56±1,93	41,20±0,91	39,99±0,51
Anidroxilose	15,83±0,29	14,46±0,54	8,62±0,62	12,82±0,31
Anidroarabinose	5,17±0,05	5,53±0,07	5,93±0,07	ALD
Anidrogalactose	ALD	ALD	2,04±0,01	ALD
Anidromanose	ALD	ALD	9,52±0,44	2,65±0,14
Grupo acetila	1,45±0,13	1,17±0,01	ALD	2,84±0,02
Hexoses desidratadas**	1,38±0,09	1,09±0,04	1,00±0,01	1,51±0,01
Pentoses desidratadas ***	3,10±0,07	2,55±0,19	0,52±0,08	2,24±0,02
Lignina insolúvel em ácido	24,88±0,30	24,29±0,47	31,19±0,15	30,20±0,02
Lignina solúvel em ácido	0,59±0,03	0,39±0,02	0,22±0,02	0,44±0,01
Extraíveis em etanol 95 %	4,88±0,07	12,11±0,11	2,80±0,06	1,55±0,01
Cinzas	4,70±0,02	8,97±0,04	0,25±0,01	0,34±0,03
<i>Total</i>	93,6	99,1	103,3	94,6

* CE = Capim-elefante; ** Quantificado como hidroximetilfurfural (HMF); *** Quantificado como furfural; ALD = abaixo do limite de detecção.

Para o capim elefante foi constatado um teor de 48,5 % de carboidratos, distribuído entre glucanas (28,56 %) e xilanas (14,46 %), mais 24,68 % de lignina total e altos teores de extrativos e cinzas (12,11 e 8,97 %, respectivamente). Yasuda *et al.* (2013), utilizando-se da mesma espécie, relataram a presença de 36,1% de glucanas, 21,5 % de xilanas, 18,42 % de lignina, 13,0 % de extrativos e 12,7 % de cinzas. As diferenças dos resultados de carboidratos podem ser atribuídas à diferenças na amostragem, bem como na idade do material lignocelulósico, tendo em vista o maior teor de lignina apresentado no capim elefante deste trabalho. Assim como a palha, as hemiceluloses do capim-elefante são constituídas basicamente por arabinoxilanas, porém, com ~2,6 unidades de xilose para cada unidade de arabinose. Por fim, a grande concentração de compostos inorgânicos, assim como no caso da palha, pode ser explicada pela alta presença de sílica em materiais foliares.

A serragem de pinus apresentou o maior teor de polissacarídeos entre as biomassas utilizadas nesse trabalho (67,3 %), com as glucanas representando 61,2 % deste valor. A lignina total foi determinada como 31,41 %, enquanto que os extraíveis em etanol 95 % (2,80 %) e compostos inorgânicos (0,25 %) representaram pequenas frações desta biomassa, em oposição às gramíneas apresentadas anteriormente. Li *et al.* (2012) determinaram a composição química de material lignocelulósico da espécie *Pinus radiata*, obtendo os seguintes teores: 37,35 % de glucanas, 12,2 % de xilanas, 2,4 % de galactanas, 5,1 % de mananas e 29,9 % de lignina. As hemiceluloses do pinus têm em sua composição majoritariamente galactoglucomananas e, dessa forma, não se pode atribuir a quantidade de glucose exclusivamente à fração celulósica dessa biomassa.

A serragem de eucalipto foi caracterizada como tendo um teor de glucanas de 39,99 %. Os demais componentes majoritários foram a lignina (totalizando 30,64 %), xilanas (12,82 %) e mananas (2,65 %). Deve ser ressaltado que o grupo acetil representa 2,84 % da composição química do eucalipto, uma concentração muito maior que a observada nas outras biomassas. No estudo de Li *et al.* (2012), a serragem de madeira da espécie *E. globulus* apresentou 41,7 % de glucanas, 14,3 % de xilanas, 2,6 % de mananas e 30,2 % de lignina total. Já Yu *et al.* (2010), utilizando biomassa oriunda de *E. grandis*, obtiveram teores de 44,9 % de glucanas, 11,4 % de xilanas e 26,6 % de lignina. As hemiceluloses do eucalipto contêm

glucomananas e, assim como para o pinus, o teor de glucose não pode ser diretamente associado à fração celulósica desse material.

5.3. PRÉ-TRATAMENTO DOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS COM scCO₂/EtOH-LI

As composições químicas dos MEE (TABELA 3) foram obtidas a partir dos dados da TABELA 1 aplicando-se um fator de correção para cada um dos componentes quantificados, que foi calculado com base na quantidade de extraíveis em etanol 95 % de cada material. Tal correção foi necessária porque o pré-tratamento com scCO₂/EtOH-LI foi realizados sobre os MEEs e não sobre os materiais *in natura*. Neste processo foram fixadas as variáveis pressão (250 bar), tempo de pré-tratamento (2 h) e quantidade de LI em relação à massa seca de material (1:1, g g⁻¹), sendo que a temperatura de operação do reator foi variada em duas condições: 110 e 180 °C. Tais condições foram baseadas em estudos de pré-otimização realizados anteriormente para o bagaço de cana (SILVEIRA, 2014), onde buscou-se a obtenção de substratos de acessibilidade à hidrólise enzimática em alto rendimento. Os resultados do pré-tratamento para os materiais lignocelulósicos nas duas condições experimentais estão apresentados na TABELA 2, na qual todos os valores representam as médias das triplicatas realizadas.

Dentre os dados apresentados na TABELA 2 encontram-se a massa seca de MEE com que o reator foi inicialmente alimentado (m_{seca}) e a massa obtida após o pré-tratamento e lavagem com etanol (m_{PT}). Visando determinar a quantidade de Bmim[OAc] residual na biomassa, os substratos pré-tratados foram submetidos a lavagens aquosas para determinação da presença de acetato no sobrenadante (vide item 3.5) e a quantificação deste componente foi relacionada com a quantidade de LI inicialmente empregada no pré-tratamento. Também foi calculada a quantidade (em gramas) de LI que permaneceu adsorvida por grama de substrato produzido. Os valores apresentados demonstraram que, para a condição de 110 °C, de 12,08 a 9,53 % da quantidade inicial de LI permaneceu adsorvida nos substratos, o que representa 0,1185 a 0,0914 g g⁻¹ em relação à massa de substrato produzido. Já para a temperatura de 180 °C, estes valores variaram de 9,50 a 3,16 % (ou 0,1145 a 0,0387 g g⁻¹ de substrato produzido), quantidades menores que as anteriores provavelmente devido à maior solubilidade do LI em etanol nestas condições.

TABELA 2 – BALANÇO MÁSSICO DO PRÉ-TRATAMENTO DOS DIFERENTES MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS UTILIZANDO $\text{scCO}_2/\text{EtOH-LI}$.

Material	T (°C)	m_{seca} (g)	m_{PT} (g)	LI_{res} (%)	$m_{\text{Lires}}/m_{\text{PT}}$ (g g^{-1})	m_f (g)	V_{extrato} (mL)	R_M (%)
Palha	110	$2,10 \pm 0,01$	$2,14 \pm 0,04$	$12,10 \pm 0,01$	$0,118 \pm 0,002$	$1,88 \pm 0,04$	$68,0 \pm 0,8$	$91,2 \pm 2,01$
CE		$2,08 \pm 0,01$	$2,19 \pm 0,04$	$9,53 \pm 0,15$	$0,091 \pm 0,003$	$1,98 \pm 0,04$	$63,0 \pm 1,4$	$95,2 \pm 1,52$
Pinus		$2,08 \pm 0,02$	$2,21 \pm 0,01$	$9,84 \pm 0,23$	$0,093 \pm 0,004$	$1,99 \pm 0,01$	$68,3 \pm 0,9$	$95,6 \pm 0,64$
Eucalipto		$2,08 \pm 0,03$	$2,19 \pm 0,01$	$9,91 \pm 0,58$	$0,095 \pm 0,001$	$1,98 \pm 0,01$	$67,3 \pm 0,9$	$94,7 \pm 0,54$
Palha	180	$2,07 \pm 0,01$	$1,84 \pm 0,01$	$8,89 \pm 0,30$	$0,101 \pm 0,001$	$1,68 \pm 0,01$	$65,3 \pm 0,5$	$81,2 \pm 1,12$
CE		$2,08 \pm 0,03$	$1,74 \pm 0,05$	$9,50 \pm 0,03$	$0,114 \pm 0,003$	$1,58 \pm 0,04$	$56,7 \pm 1,2$	$75,7 \pm 1,57$
Pinus		$2,09 \pm 0,01$	$1,72 \pm 0,02$	$4,08 \pm 0,10$	$0,047 \pm 0,001$	$1,75 \pm 0,04$	$63,0 \pm 1,4$	$83,4 \pm 2,05$
Eucalipto		$2,10 \pm 0,01$	$1,82 \pm 0,04$	$3,16 \pm 0,30$	$0,034 \pm 0,001$	$1,66 \pm 0,02$	$57,7 \pm 1,2$	$78,9 \pm 0,88$

T = temperatura; m_{seca} = massa seca de material extraído com etanol 95 %; m_{PT} = massa do substrato pré-tratado após secagem em estufa de 50 °C; LI_{res} = quantidade relativa de líquido iônico presente no substrato; $m_{\text{Lires}}/m_{\text{PT}}$ = relação entre a massa de líquido iônico residual e a do substrato obtido no pré-tratamento; m_f = massa final de substrato sem a presença de líquido iônico; V_{extrato} = volume do extrato etanólico obtido no pré-tratamento; R_M = rendimento mássico do pré-tratamento obtido da relação entre m_f e m_{seca} .

Deve ser ressaltado que a presença de grupos acetila oriundos dos MEE nos extratos oriundos do pré-tratamento é muito pequena se comparada à quantidade de acetato proveniente dos 2,10 g de LI que foram adicionados ao meio de reação, cujo valor seria de aproximadamente 0,64 g. Por exemplo, o MEE de eucalipto apresentou a maior quantidade removida de grupos acetila no pré-tratamento a 180 °C, que foi de 0,0205 g, e isto representa apenas 3 % da quantidade total de grupos acetila oriundos do LI. A presença de LI residual pode comprometer a análise química de lignocelulose e influenciar negativamente os experimentos de hidrólise enzimática; portanto, os materiais que foram submetidos a estas metodologias foram submetidos a uma etapa prévia de lavagem aquosa. Tendo como base as quantidades de LI retidas nos substratos, pode-se obter a massa real dos substratos derivados do pré-tratamento (m_f) e, por fim, o rendimento mássico do processo (R_m) expresso em porcentagem.

A recuperação mássica do pré-tratamento demonstra que o aumento da temperatura levou a uma maior degradação dos componentes do substrato. Para os experimentos em 110 °C, o maior rendimento mássico foi o do pinus, de 95,6 %, enquanto o menor foi o da palha, com 91,2 %. Já nos experimentos de 180 °C, o maior valor de rendimento também foi do pinus, de 83,4 %, enquanto que o menor foi o do capim-elefante, de 75,7 %.

5.4. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS SUBSTRATOS PRÉ-TRATADOS POR scCO₂/EtOH-LI

Os materiais pré-tratados que foram submetidos à lavagem aquosa para retirada do LI remanescente foram analisados para avaliar o efeito do pré-tratamento sobre a composição química da biomassa. A TABELA 3 apresenta os resultados para os componentes majoritários presentes nos substratos produzidos, em comparação com os obtidos para os materiais de origem. Os menores rendimentos na determinação da composição química para os materiais pré-tratados na temperatura de 180 °C demonstram a presença de componentes que não foram quantificados nos substratos pré-tratados, principalmente cinzas. Contudo, os principais componentes foram devidamente quantificados e estes, juntamente aos seus respectivos rendimentos mássicos (R_M) de pré-tratamento, foram utilizados para calcular os balanços mássicos que estão apresentados na TABELA 4.

TABELA 3 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA PERCENTUAL (%) DOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS EXTRAÍDOS COM ETANOL 95 % E PRÉ-TRATADOS POR scCO₂/EtOH-LI.

Material		AnGlc	AnXyl	AnAra	AnMan	AnGal	Grupos acetila	LIA	LSA
Palha	MEE	33,24±1,17	16,65±0,43	5,43±0,05	ALD	ALD	1,52±0,16	26,15±0,30	0,62±0,03
	110 °C	35,12±0,84	15,00±0,44	6,36±0,26	ALD	ALD	1,42±0,08	22,66±0,76	0,46±0,01
	180 °C	33,94±0,24	14,77±0,64	3,92±0,10	ALD	ALD	1,12±0,10	18,87±0,33	0,47±0,10
CE	MEE	32,50±1,93	16,45±0,54	6,29±0,07	ALD	ALD	1,34±0,01	27,64±0,47	0,45±0,02
	110 °C	33,89±1,03	16,23±0,41	6,08±0,01	ALD	ALD	0,88±0,17	25,24±1,08	0,52±0,03
	180 °C	33,24±1,07	13,54±0,42	3,68±0,14	ALD	ALD	0,66±0,08	19,72±0,24	0,40±0,01
Pinus	MEE	42,38±1,43	8,87±0,92	6,10±0,37	9,79±0,74	2,10±0,01	ALD	32,09±0,15	0,44±0,02
	110 °C	41,33±0,52	9,11±0,19	5,54±0,55	9,13±0,59	2,02±0,03	ALD	31,29±0,11	0,44±0,01
	180 °C	35,02±0,41	6,60±0,14	2,80±0,04	6,51±0,16	1,42±0,07	ALD	28,34±1,33	0,24±0,01
Eucalipto	MEE	40,62±0,51	13,02±0,31	ALD	2,70±0,14	ALD	2,89±0,02	30,68±0,02	0,23±0,01
	110 °C	41,97±0,12	11,49±0,15	ALD	2,64±0,11	ALD	2,74±0,17	29,01±0,23	0,49±0,02
	180 °C	44,83±0,97	10,53±0,14	ALD	1,74±0,05	ALD	2,24±0,09	25,89±0,53	0,44±0,01

CE = capim-elefante; MEE = material extraído com etanol 95 %; nd = componente não detectado; AnGlc = anidroglicose; AnXyl = anidroxilose; AnAra = anidroarabinose; AnMan = anidromanose; AnGal = anidrogalactose; Grupos acetila = componente das hemiceluloses, medido como ácido acético nos hidrolisados ácidos da biomassa; LIA = lignina insolúvel em ácido; LSA = lignina solúvel em ácido.

TABELA 4 – RECUPERAÇÃO MÁSSICA RELATIVA DOS COMPONENTES MAJORITÁRIOS DOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS APÓS O PRÉ-TRATAMENTO COM $scCO_2/EtOH-LI$.

Material		AnGlc (%)	AnXyl (%)	AnAra (%)	AnMan (%)	AnGal (%)	Grupos acetila (%)	LT (%)	R _M (%)
Palha	110 °C	95,0	81,0	105,3	-	-	83,9	77,6	89,9
	180 °C	83,0	72,1	58,6	-	-	59,9	58,7	81,2
CE	110 °C	99,2	93,9	91,9	-	-	62,6	87,3	95,2
	180 °C	77,3	62,1	44,7	-	-	37,3	54,1	75,7
Pinus	110 °C	93,2	98,2	86,9	89,2	93,4	-	93,4	95,6
	180 °C	68,9	62,1	38,3	55,5	56,4	-	73,4	83,4
Eucalipto	110 °C	97,8	87,1	-	92,7	-	89,8	90,4	94,7
	180 °C	87,1	63,8	-	50,9	-	61,2	67,2	78,9

AnGlc = anidroglicose; AnXyl= anidroxilose; AnAra = anidroarabinose; AnMan = anidromanose; AnGal = anidroglicose; LT = lignina total, obtido da soma de lignina insolúvel em ácido e lignina solúvel em ácido; Grupos acetila = componente das hemiceluloses, medido como ácido acético nos hidrolisados ácidos da biomassa; RM= rendimento mássico obtido no pré-tratamento.

Para a palha de cana, o pré-tratamento na temperatura de 110 °C teve como principais efeitos a deslignificação de 22,4 % do material e a conservação de 95,0 % da glucose. A xilose teve uma recuperação mássica de 81,0 %, enquanto que, para os componentes minoritários arabinose e ácido acético, as recuperações foram de 105,3 e 83,9 %, respectivamente. Para as demais biomassas, efeitos similares foram observados na mesma condição de pré-tratamento, porém, com menores taxas de deslignificação: 12,7 % para o capim-elefante, 6,6 % para o pinus e 9,6 % para o eucalipto. A recuperação de glucose foi de 99,2 % para o capim-elefante, enquanto que, para o pinus e o eucalipto, esta recuperação deste componente foi de 93,2 e 97,8 %, respectivamente. A menor recuperação de glucanas para o material oriundo de pinus fato pode ser explicado pela alta presença de glucose nas hemiceluloses e estas terem sido parcialmente removidas no pré-tratamento devido a maior acessibilidade química desta fração em relação à celulose. Para os demais carboidratos, os rendimentos foram similares e estão aparentemente associados à deslignificação do material. Por exemplo, o pinus apresentou a menor deslignificação e o substrato produzido foi o que apresentou maior recuperação mássica dos carboidratos das hemiceluloses. Desta maneira, pode se inferir que a remoção de lignina implica diretamente na remoção de polissacarídeos sob a forma de complexos lignina-carboidrato (CLC), devido à alta associação destes componentes na parede celular pela formação de diversos tipos de ligações covalentes (IIYAMA *et al.*, 1994).

Na temperatura de 180 °C, o efeito primário de deslignificação é ainda mais visível para todos os materiais produzidos. Para a palha de cana, a remoção de lignina foi de 41,3 %, porém, em contrapartida, houve perda de 17,0 % de glucanas e 27,9 % de xilanas, o que pode ser indicativo de que a alta remoção de lignina deste material levou a uma extração ainda maior das hemiceluloses, afetando a celulose possivelmente pelo aumento de sua acessibilidade química. As deslignificações para os outros materiais foram bastante aumentadas com o aumento da temperatura do pré-tratamento: 45,9 % para o capim-elefante, 26,6 % para o pinus e 32,8 % para o eucalipto. Assim, a eficiência da deslignificação pode ser associada ao tipo de material utilizado no pré-tratamento, sendo que gramíneas teriam sido mais suscetíveis do que folhosas, que foram seguidas pelo baixo desempenho das coníferas. Os materiais obtidos de pinus foram os que menos foram afetados pelo pré-tratamento, provavelmente por apresentarem células de

paredes espessas (traqueídeos) e ausência de vasos que dificultam o acesso e a difusão de agentes químicos em sua estrutura. Em contrapartida, os materiais obtidos da palha de cana e do capim-elefante (gramíneas) apresentaram altos valores de deslignificação, pois suas células vegetais são majoritariamente parênquimas de parede celular tênue e, desta maneira, provavelmente mais acessíveis à reatividade do processo. Por sua vez, as recuperações de glucanas foram também diminuídas devido ao aumento da temperatura, possivelmente também pela maior exposição da fração celulósica pelo efeito direto da deslignificação, apresentando uma diminuição de 22,7 % para o capim-elefante, 31,1 % para pinus e apenas 12,9 % para o eucalipto. Para os demais monossacarídeos e grupos acetila presentes nas hemiceluloses, houve grande diminuição em seus respectivos percentuais de recuperação.

Para melhor compreensão dos dados relacionados à deslignificação dos materiais e, por consequência, da remoção de polissacarídeos durante o pré-tratamento, os teores de carboidratos e de grupos acetila, expressos em porcentagem na TABELA 3, foram convertidos para quantidade em mol presente em 100 g de MEE ou de substrato pré-tratado e os resultados estão apresentados na TABELA 5. Para tanto, as massas molares utilizadas foram de $180,16 \text{ g mol}^{-1}$ para a anidroglicose e seus epímeros, anidromanose e anidrogactose, $150,13 \text{ g mol}^{-1}$ para anidroxilose e anidroarabinose e $59,05 \text{ g mol}^{-1}$ para grupo acetila.

Baseado nos dados da TABELA 5, as razões molares entre anidroglicose, anidroxilose, anidroarabinose e grupos acetila (AnGlc:AnXyl:AnAra:GA) foram calculados para os materiais produzidos a partir de capim-elefante. Neste caso, o MEE apresentou uma razão molar de 1,00:0,61:0,23:0,13, enquanto que para o material oriundo do seu pré-tratamento a $110 \text{ }^{\circ}\text{C}$, essa relação foi de 1,00:0,57:0,22:0,08, o que revelou pouca mudança na quantidade relativa de xilose e arabinose frente à quantidade de anidroglicose. Já para o material pré-tratado a $180 \text{ }^{\circ}\text{C}$, em que o conteúdo de lignina foi drasticamente diminuído, a razão molar foi de 1,00:0,49:0,13:0,06 e a quantidade relativa de resíduos de xilose e arabinose também foi diminuída de maneira acentuada, porém, a queda dos valores ocorreu de maneira proporcional. Portanto, como o processo não apresentou seletividade na remoção de um tipo de carboidrato em específico, conclui-se que a deslignificação implica diretamente na remoção de hemiceluloses por extração de complexos lignina-carboidrato (CLC). Por outro lado, os grupos acetila sofreram alterações

relativamente maiores em sua proporção, possivelmente devido à labilidade da ligação éster com que estão ligados aos resíduos de xilose. Para os materiais oriundos da palha, que também se trata de gramínea e possui hemiceluloses semelhantes, foram observadas as mesmas tendências para os resíduos de xilose e arabinose, que também implicam no fato da diminuição dos teores desses componentes estarem vinculadas à remoção de CLC durante a deslignificação do material de origem.

TABELA 5 – TEOR MOLAR DE CARBOIDRATOS E GRUPOS ACETILA POR 100 g DOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS SUBMETIDOS AO PRÉ-TRATAMENTO.

Material		AnGlc	AnXyl	AnAra	AnMan	AnGal	Grupos acetila
Palha	MEE	0,185	0,111	0,036	-	-	0,026
	110 °C	0,195	0,100	0,042	-	-	0,024
	180 °C	0,189	0,098	0,026	-	-	0,019
CE	MEE	0,181	0,110	0,042	-	-	0,023
	110 °C	0,188	0,108	0,041	-	-	0,015
	180 °C	0,185	0,090	0,025	-	-	0,011
Pinus	MEE	0,235	0,059	0,041	0,054	0,012	-
	110 °C	0,230	0,061	0,037	0,051	0,011	-
	180 °C	0,195	0,044	0,019	0,036	0,008	-
Eucalipto	MEE	0,226	0,087	-	0,015	-	0,049
	110 °C	0,233	0,077	-	0,015	-	0,046
	180 °C	0,249	0,070	-	0,010	-	0,038

CE = capim-elefante; MEE = material extraído com etanol 95 %; AnGlc = anidroglicose; AnXyl = anidroxilose; AnAra = anidroarabinose; AnMan = anidromanose; AnGal = anidroglicose; Grupos acetila = componente das hemiceluloses, medido como ácido acético nos hidrolisados ácidos.

Para os materiais oriundos de biomassas de madeira, o pré-tratamento demonstrou o mesmo mecanismo de ação. No caso de materiais oriundos de eucalipto, a razão molar calculada para anidroglicose, anidroxilose, anidromanose e grupo acetil (AnGlc:AnXyl:AnMan:GA) foi de 1,00:0,38:0,07:0,22 para o MEE, enquanto que, para os materiais pré-tratados a 110 e 180 °C, essa razão foi de 1,00:0,33:0,06:0,20 e 1,00:0,28:0,04:0,15, respectivamente. Neste caso, embora as xilanas tenham sido mais afetadas na temperatura de 110 °C, a alteração entre as

proporções molares dos carboidratos permaneceram pouco alteradas. Como observado anteriormente para as gramíneas, as razões molares dos materiais oriundos de pinus seguiram as mesmas tendências observadas para o eucalipto, porém, neste caso, CLC envolvendo galactoglucomanas foram removidos durante a deslignificação.

5.5. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

A hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósicos foi realizada com o intuito de determinar o potencial de sacarificação dos diferentes substratos na presença do preparado enzimático Cellic CTec3. Neste caso, a quantidade de CTec3 utilizada em todos os experimentos foi de $2,26 \text{ ARS}_{\text{Tot}} \text{ g}^{-1}$ de substrato total, considerando-se a consistência de 5 % de sólidos totais. Além disso, os ensaios de hidrólise enzimática também foram realizados na presença de uma quantidade suplementar do preparado enzimático Cellic HTec3 (10 % em relação à Cellic CTec3), para verificar a influência de sua atividade hemicelulásica sobre a conversão dos polissacarídeos presentes nos substratos produzidos. Para uma melhor compreensão do efeito das diferentes condições de pré-tratamento sobre a hidrólise enzimática dos polissacarídeos presentes nos materiais lignocelulósicos em estudo, também foram realizados experimentos controle nas mesmas condições reacionais para os preparados intitulados MEE.

A TABELA 6 apresenta os valores de conversão enzimática dos substratos em relação aos principais monossacarídeos produzidos, glucose, xilose e arabinose. A partir dos valores obtidos conclui-se que o pré-tratamento gerou materiais mais suscetíveis à hidrólise enzimática, principalmente quando expostos à temperatura de 180 °C. Por outro lado, os substratos obtidos a partir das gramíneas palha de cana e capim-elefante foram os mais facilmente convertidos a açúcares livres, seguidos do eucalipto e do pinus.

A presença da Cellic HTec3 promoveu aumentos consideráveis na conversão dos substratos celulósicos a monossacarídeos, principalmente para os pré-tratados na temperatura de 180 °C. No caso da palha de cana pré-tratada a 180 °C, aumentos no rendimento de hidrólise de 18,36 % para glucose, 12,53 % para xilose e 4,59 % para arabinose foram observados quando na presença de Cellic HTec3 em relação ao experimento utilizando somente Cellic CTec3.

TABELA 6 – CONVERSÕES ENZIMÁTICAS OBTIDAS PARA OS DIFERENTES MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS EMPREGANDO Cellic CTec3 NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE Cellic HTec3.

Material		Cellic CTec3			Cellic CTec3 + 10 % Cellic HTec3		
		Glc	Xyl	Ara	Glc	Xyl	Ara
Palha	MEE	10,41 ± 2,61	3,54 ± 1,18	1,17 ± 0,02	9,07 ± 3,24	3,65 ± 1,18	1,10 ± 0,23
	110 °C	13,88 ± 1,29	5,83 ± 0,55	1,56 ± 0,09	15,06 ± 1,05	6,78 ± 0,37	1,70 ± 0,08
	180 °C	35,20 ± 0,67	60,85 ± 0,45	15,49 ± 0,25	41,65 ± 1,10	68,48 ± 4,85	16,20 ± 0,63
CE	MEE	17,21 ± 2,81	5,20 ± 0,91	1,49 ± 0,28	22,58 ± 0,44	7,46 ± 0,20	2,37 ± 0,51
	110 °C	25,67 ± 0,96	15,87 ± 1,34	7,19 ± 0,36	29,45 ± 3,17	17,32 ± 3,31	7,65 ± 1,25
	180 °C	35,62 ± 1,14	53,83 ± 2,39	15,94 ± 0,50	43,38 ± 0,04	67,33 ± 0,15	19,80 ± 0,37
Pinus	MEE	2,85 ± 0,23	2,37 ± 0,68	ALD	3,35 ± 0,27	2,72 ± 0,20	ALD
	110 °C	4,39 ± 0,23	3,21 ± 0,27	ALD	5,12 ± 1,29	3,95 ± 0,99	ALD
	180 °C	6,41 ± 2,29	9,58 ± 3,36	ALD	7,53 ± 0,21	11,33 ± 0,47	ALD
Eucalipto	MEE	2,23 ± 0,14	1,24 ± 0,06	ALD	2,21 ± 0,37	1,23 ± 0,23	ALD
	110 °C	2,84 ± 0,06	2,75 ± 0,07	ALD	2,92 ± 0,04	2,87 ± 0,06	ALD
	180 °C	13,06 ± 2,96	45,30 ± 2,85	ALD	15,97 ± 2,96	49,61 ± 6,49	ALD

CE = capim-elefante; MEE = Material extraído com etanol; Glc = glucose; Xyl = xilose; Ara = arabinose.

Por sua vez, os substratos obtidos de serragem de pinus a 180 °C também apresentaram aumentos de rendimento de hidrólise na presença de HTec3 e estes foram da ordem de 17,48 % para glucose e 18,27 % para xilose. Por fim, estes mesmos efeitos para os substratos derivados de eucalipto foram de 22,24 % para glucose e 9,50 % para xilose. Estes dados permitem inferir que a presença da atividade hemicelulásica é importante para a hidrólise enzimática dos substratos produzidos pelo pré-tratamento com scCO₂/EtOH-LI, pois este conserva a maioria dos carboidratos presentes na celulose e nas hemiceluloses.

A presença de Cellic HTec3 nos experimentos de hidrólise também levaram a um maior rendimento de glucanas, provavelmente oriundos em sua maioria da fração celulósica, o que indica que a atuação das hemicelulases nos substratos ocorreu em sinergia com as celulasas. Além disto, ainda deve ser ressaltado que, em todos os hidrolisados produzidos, os carboidratos galactose e manose ficaram abaixo do limite de detecção do método de quantificação e, desta maneira, não puderam ser considerados. Por outro lado, a arabinose também ficou abaixo do limite de detecção nos hidrolisados de pinus e eucalipto e, portanto, não foi considerada nos cálculos de rendimento.

O desempenho da preparação Cellic CTec3 nos ensaios de hidrólise também foi expresso por grama de celulose presente no substrato e por unidade de atividade celulásica total utilizada no ensaio [DHE, % (UI g⁻¹)⁻¹] (FIGURA 15). Esta medida foi particularmente importante porque os substratos pré-tratados apresentavam diferenças no teor de glucanas (celulose) em suas respectivas composições químicas.

Com base nestes dados, pode-se confirmar que o pré-tratamento aumentou a conversão dos materiais lignocelulósicos em glucose e de que as gramíneas foram realmente mais suscetíveis à bioconversão. Os valores de DHE para as biomassas de palha de cana e de capim elefante extraídas com etanol (amostras MEE) foram de 1,91 e 3,55 % (UI g⁻¹)⁻¹, respectivamente. No entanto, apesar da grande diferença nos valores de DHE para estas frações, ambos os substratos pré-tratados a 180 °C apresentaram valores similares da ordem de 7,43 e 7,20 % (UI g⁻¹)⁻¹. No caso dos materiais derivados das serragens de pinus e de eucalipto, o desempenho do preparado enzimático foi também superior após o pré-tratamento, apresentando valores de 1,37 e 3,56 % (UI g⁻¹)⁻¹ para os substratos pré-tratados a 180 °C, respectivamente. Portanto, o aumento esperado não se deu na mesma ordem de

grandeza anteriormente observada para gramíneas. De qualquer forma, estes dados demonstram que os pré-tratamentos $\text{scCO}_2/\text{EtOH-LI}$ a 110 e 180 °C apresentaram grande influência sobre o desempenho de hidrólise enzimática, apresentando aumentos nos rendimentos de hidrólise de glucanas na ordem de 1,3 e 3,4 vezes para a palha de cana, 1,5 e 2,1 vezes para o capim elefante, 1,5 e 2,2 vezes para o pinus e 1,3 e 5,9 vezes para o eucalipto, respectivamente. Além disso, o pré-tratamento $\text{scCO}_2/\text{EtOH-LI}$ aumentou os rendimentos de hidrólise de xilanas em valores ainda maiores do que os obtidos para a hidrólise de glucanas. Neste sentido, o aumento dos DHEs relativos à xilana foram de 1,6 e 17,2 vezes para a palha, 3,1 e 10,4 vezes para o capim elefante, 1,4 e 4,0 vezes para o pinus e 2,2 e 36,5 vezes para o eucalipto, sempre em relação aos substratos pré-tratados a 110 e 180 °C, respectivamente.

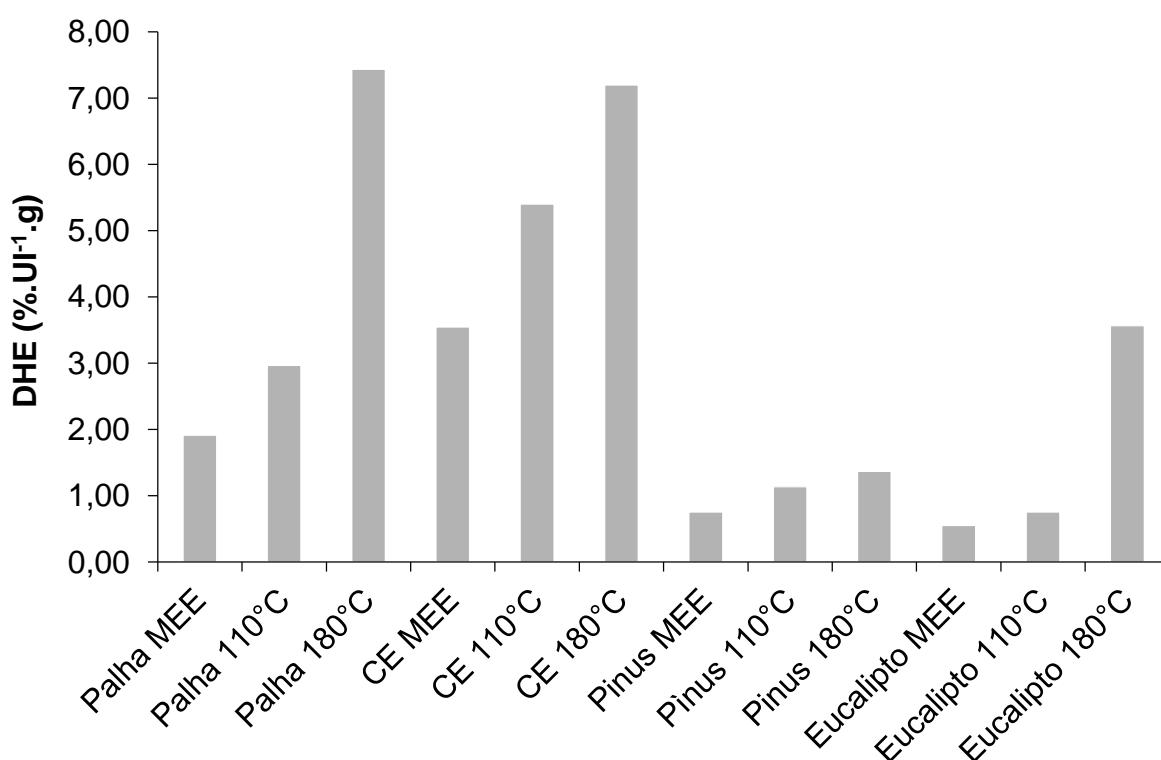


FIGURA 15 – DESEMPENHO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA FRENTE AOS DIFERENTES TEORES DE GLUCANAS PRESENTES NOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS.

Há muito pouco dado disponível na literatura sobre a hidrólise enzimática de substratos celulósicos com Cellic CTec3. Por este motivo, uma comparação foi

realizada com substratos produzidos em nossos laboratórios por explosão a vapor de cavacos de eucalipto a 180 °C por 10 min cujo DHE em reação de hidrólise a 4 % de sólidos totais foi de 4,91 % (UI g⁻¹)⁻¹ utilizando uma carga enzimática total pelo menos 3,3 vezes maior do que a utilizada neste trabalho. Assim, embora o DHE para a serragem de eucalipto pré-tratada a 180 °C por scCO₂/EtOH-LI [3,56 % (UI g⁻¹)⁻¹] tenha sido inferior ao DHE do substrato explodido a vapor, os valores calculados para os materiais derivados de palha de cana e capim elefante foram muito maiores, o que permite concluir que estes substratos apresentam acessibilidade provavelmente superior a alguns dos melhores substratos pré-tratados a vapor produzidos em nossos laboratórios. Além disso, diferentemente da explosão a vapor, que é baseada na remoção das hemiceluloses por hidrólise ácida, o pré-tratamento por scCO₂/EtOH-LI preservou 63,8 % de xilanas e 45 % destas foram convertidas em xilose após a hidrólise enzimática com Cellic CTec3. Tais resultados poderão representar ganhos interessantes em processos simultâneos de sacarificação e cofermentação de pentoses e hexoses.

5.6. DIFRATOMETRIA DE RAIOS-X (DRX)

No arranjo macromolecular da celulose, os grupos hidroxila dos resíduos de anidroglicose formam uma rede de ligações de hidrogênio entre si e com o par de elétrons não ligante do oxigênio do anel, originando estruturas cristalinas ordenadas e de grande estabilidade (POPESCU *et al.*, 2010). Por outro lado, as hemiceluloses, particularmente as mais ramificadas e substituintes em sua cadeia principal, se organizam em estruturas mais randomizadas, enquanto que a lignina tem um comportamento tipicamente amorfo (JOHN e THOMAS, 2008). Assim, a técnica de DRX é capaz de revelar nuances desta estrutura cristalina, embora de maneira muito mais difusa do que a observada para materiais inorgânicos de alta cristalinidade.

Na análise dos difratogramas de amostras lignocelulósicas, o pico de maior intensidade é atribuído à reflexão 200 da celulose cristalina e ocorre em torno de 22,5° de 2θ quando a fonte de radiação é a linha Kα de átomos de cobre. Este pico é um sinal importante para definir o grau de cristalinidade do material e também pode ser utilizado para calcular a distância existente entre as lamelas ou folhas paralelas nas regiões cristalinas da celulose I, que basicamente correspondem à rede de

ligações de hidrogênio mencionada acima. Além deste pico, para amostras de materiais puramente celulósicos, é possível identificar uma composição de picos em valores inferiores de 2θ , sendo um devido à celulose I_β (16,7 e 14,9° de 2θ) e outro à celulose I_α (16,8 e 14,3° de 2θ) (WADA *et al.*, 2003). Baseado nestes sinais, é possível caracterizar a presença de celulose I, também designada como celulose nativa, cujo perfil difratométrico é muito diferente da celulose II ou celulose mercerizada (KUMAR *et al.*, 2010). Por fim, a celulose I ainda apresenta um pico de menor intensidade em aproximadamente 34,5° de 2θ , que é referente a um quarto do comprimento de uma unidade de celobiose oriunda da ordenação ao longo do direcionamento das fibras (PENTTILÄ *et al.*, 2010).

As FIGURAS 16 e 17 apresentam os perfis de DRX dos materiais lignocelulósicos utilizados neste estudo, antes (amostras MEE) e após o pré-tratamento pré-tratados pelo processo $scCO_2$ /EtOH-LI em diferentes temperaturas. De um modo geral, todos os difratogramas são característicos da celulose I de vegetais superiores, demonstrando que o pré-tratamento não causou uma alteração significativa na organização estrutural das cadeias de celulose presentes no substrato. No entanto, sabe-se que a dissolução de celulose em [Emim][OAc] resulta na transição parcial da celulose I para a celulose II, obtida após regeneração desta pela adição de água à solução (CHENG *et al.*, 2011). Como o pré-tratamento por $scCO_2$ /EtOH-LI não promoveu tal modificação nas condições empregadas neste estudo, conclui-se que o seu modo de ação difere daqueles processos em que LIs como o [Emim][OAc] são utilizados como agentes de dissolução de polissacarídeos em geral. De fato, a presença de etanol no processo $scCO_2$ /EtOH-LI e o uso de baixas concentrações de [Bmim][OAc] impedem mudanças mais significativas sobre a estrutura cristalina da celulose. Primeiro, o excesso de etanol não permite que a celulose seja solubilizada como observado em meio aquoso. Por outro lado, a quantidade de LI presente no pré-tratamento é muito inferior à necessária para solubilizar a celulose, que acaba por permanecer em seu estado de agregação original. Assim, o etanol e o LI atuam como cossolventes cuja penetração na estrutura da parede celular é facilitada pela injeção de CO_2 supercrítico e a função do LI, como demonstrado anteriormente por Silveira (2014), é a de desestabilizar a rede de ligações de hidrogênio que mantém o agregado coeso, facilitando assim a remoção de CLC solúveis em solventes polares não aquosos (etanol).

A presença de outros polímeros menos cristalinos que a celulose na composição dos substratos celulósicos analisados não permitiu a observação da composição de picos que caracteriza a presença de celuloses I_α e I_β , cujos picos se apresentaram apenas como um sinal combinado nesta região (FIGURAS 16 e 17). Por outro lado, o sinal de maior intensidade, por volta de $22,5^\circ$ de 2θ , foi bem pronunciado em todas as amostras e, com base nos seus dados, foram calculados os valores de CrI, distância interfibrilar (d) e largura do cristal (L) para os substratos em análise, cujos resultados estão apresentados na TABELA 7. Assim, pode-se concluir que os valores de (d) não sofreram modificações estatisticamente significativas pelo pré-tratamento por $scCO_2/EtOH-LI$, uma vez que os valores de variância percentual entre os dados é da ordem de $3,46 \times 10^{-5}$, $3,97 \times 10^{-4}$, $2,53 \times 10^{-4}$ e $1,21 \times 10^{-4}$ % para os materiais derivados da palha, capim elefante, pinus e eucalipto, respectivamente. Por outro lado, os valores inerentes à largura aparente dos cristais de celulose (L) apresentaram aumentos significativos devido ao pré-tratamento.

TABELA 7 - PARÂMETROS CRISTALOGRAFICOS CALCULADOS A PARTIR DOS DIFRATOGRAMAS DE DIFRATOMETRIA DE RAIOS-X.

Material		(200)		
		d (nm)	L (nm)	CrI* (%)
Palha	MEE	0,407	2,89	41,2
	110°C	0,406	3,02	43,3
	180°C	0,406	3,13	47,8
CE	MEE	0,407	2,84	44,0
	110°C	0,407	2,84	45,6
	180°C	0,405	2,98	54,4
Pinus	MEE	0,397	3,02	52,2
	110°C	0,398	3,17	55,0
	180°C	0,399	3,55	61,9
Eucalipto	MEE	0,401	2,93	56,2
	110°C	0,400	2,94	58,3
	180°C	0,400	3,44	68,8

CrI = Índice de cristalinidade calculado por Segal *et al.* (1959).

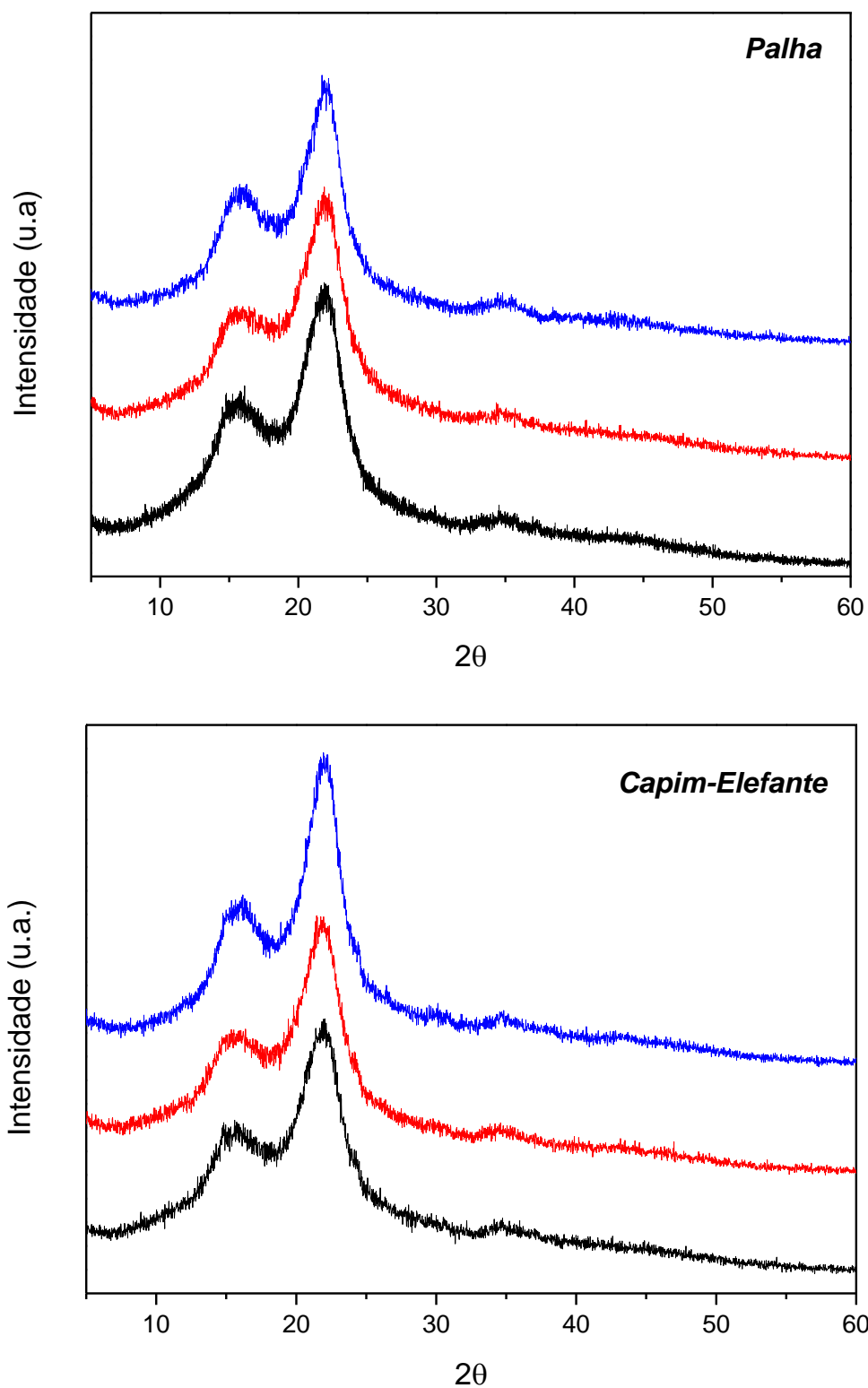


FIGURA 16 – DIFRATOGRAMAS DE RAIOS-X DOS MATERIAIS DERIVADOS DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR E CAPIM ELEFANTE: MEE (PRETO), PRÉ-TRATADOS EM 110 °C (VERMELHO) E EM 180 °C (AZUL).

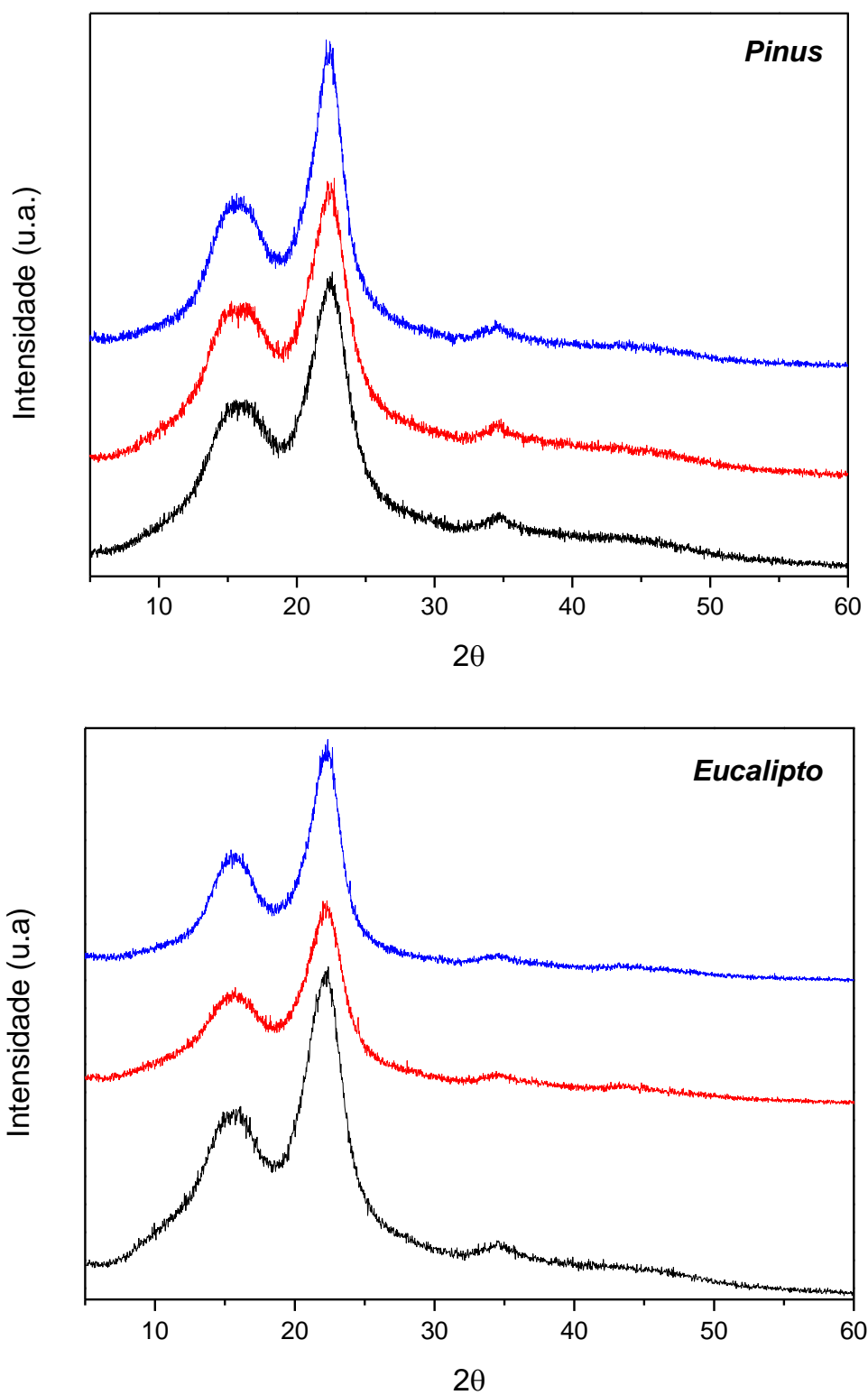


FIGURA 17 – DIFRATOGRAMAS DOS MATERIAIS DERIVADOS DE SERRAGEM DE PINUS E DE EUCALIPTO: MEE (PRETO), PRÉ-TRATADOS EM 110 °C (VERMELHO) E EM 180 °C (AZUL).

De acordo com os valores da TABELA 7, os aumentos nos valores de L para os materiais pré-tratados a 180 °C foram de 8,26, 17,07, 11,78 e 4,97 % para a palha, capim-elefante, pinus e eucalipto, respectivamente. Conforme Kim *et al.* (2010), o aumento de L está associado ao aumento de CrI devido à diminuição da quantidade de regiões amorfas na superfície dos cristais de celulose. Neste caso, as modificações causadas pelo pré-tratamento nos valores de CrI dos respectivos substratos são notáveis, apresentando um aumento particularmente quando realizado na temperatura de 180 °C (TABELA 7).

Considerando que não ocorreram modificações significativas nos valores de distância interfibrilar na estrutura supramolecular da celulose, as diferenças nos valores de CrI não podem ser atribuídas apenas à diminuição da proporção de celulose amorfa na superfície dos cristais (variação dos valores de L), mas também à remoção de componentes amorfos da estrutura dos substratos (hemiceluloses e lignina).

A FIGURA 18 apresenta as correlações entre os valores CrI com os teores de lignina dos substratos, bem como com os valores de conversão obtidos na ausência e na presença de Cellic HTec3. Para as biomassas oriundas de madeiras (serragem de pinus e eucalipto), o pré-tratamento por scCO₂/EtOH-LI não resultou em grandes taxas de deslignificação, porém, as pequenas mudanças no teor de lignina total de tais substratos resultaram em grandes mudanças nos valores de CrI (FIGURA 18A), sendo a serragem de eucalipto que apresentou maior inclinação na relação CrI x lignina total (-0,3914). Um comportamento semelhante também foi obtido para a relação CrI x rendimento de hidrólise para os substratos oriundos de serragem de madeira. Por outro lado, as mudanças nos valores de CrI dos substratos derivados de gramíneas foram menores do que as observados para as biomassas de madeira. Porém, o pré-tratamento por scCO₂/EtOH-LI resultou em maiores taxas de deslignificação, sendo a palha de cana aquela que apresentou o maior valor da inclinação em módulo (-1,0557) na relação CrI x lignina total. Como resultado das maiores taxas de deslignificação em gramíneas, tais substratos foram os que apresentaram maiores valores de inclinação para a relação CrI x rendimento de hidrólise, seja na ausência (FIGURA 18B) ou na presença (FIGURA 18C) de Cellic HTec3. Estes resultados são indicativos de que a remoção de lignina e de hemiceluloses dos materiais, que implicam em maiores valores de CrI, estão

associados à maior acessibilidade química dos substratos na etapa de hidrólise enzimática.

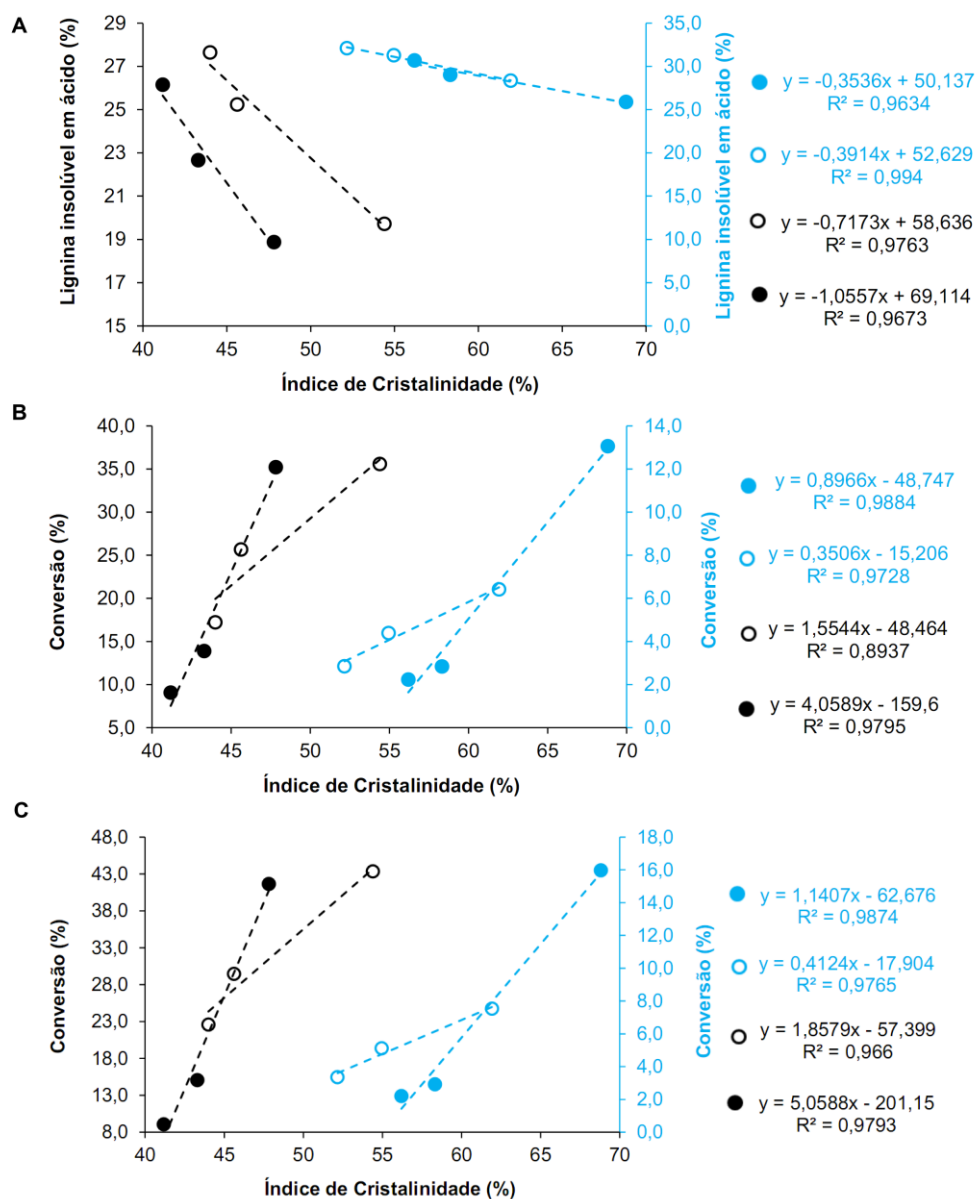


FIGURA 18 – CORRELAÇÃO ENTRE ÍNDICE DE CRISTALINIDADE DOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS E SEUS (A) TEORES DE LIGNINA, (B) CONVERSÃO ENZIMÁTICA COM Cellic CTec3, E (C) CONVERSÃO ENZIMÁTICA COM Cellic CTec3 + 10% DE Cellic HTec3 (●, PALHA DE CANA; ○, CAPIM-ELEFANTE; ◊, SERRAGEM DE PINUS; ●, SERRAGEM DE EUCALIPTO).

6. CONCLUSÃO

A extração com etanol 95 % dos diferentes materiais lignocelulósicos foi realizada anteriormente ao pré-tratamento com o intuito de remover os extraíveis que podem ter influência negativa sob os métodos analíticos na determinação de carboidratos e lignina. A caracterização dos compostos presentes nesses extratos por GCxGC/TOF-MS revelou uma ampla variedade de estruturas para as diferentes amostras, classificadas como ácidos graxos, ésteres, terpenóides, hidrocarbonetos, entre outros.

Os materiais extraídos com etanol 95 % (MEE) foram caracterizados e depois pré-tratados com $scCO_2/LI-EtOH$. Os materiais gerados no pré-tratamento apresentaram diferenças significativas no conteúdo de lignina e carboidratos em relação aos MEE, principalmente quando utilizada a temperatura de 180 °C. As relações molares entre os carboidratos presentes nas hemiceluloses foram mudadas proporcionalmente de acordo com o efeito da temperatura, o que foi relacionado à deslignificação do material. Desta maneira, concluiu-se que o principal efeito do pré-tratamento se deu pela remoção de complexos lignina-carboidrato (CLC). Ainda, o grau de deslignificação dos diferentes materiais foi associado com a dificuldade relativa ao seu processamento de acordo com as respectivas biomassas de origem, que possuem diferentes composições químicas e estruturais. Neste caso, palha e capim-elefante, que são gramíneas, foram mais facilmente processadas e os materiais gerados apresentaram um menor teor relativo de lignina em relação às serragens de eucalipto e pinus.

Na etapa de hidrólise enzimática, materiais com menor teor de lignina e hemiceluloses apresentaram grandes aumentos nos rendimentos de hidrólise, que foram superiores nos materiais gerados a 180 °C. Dentre estes, os substratos derivados de palha de cana e capim-elefante apresentaram maior acessibilidade do que aqueles derivados de eucalipto e pinus. A utilização de atividade hemicelulásica suplementar aumentou substancialmente os rendimentos de glucanas, pois os substratos gerados apresentaram uma grande quantidade de hemiceluloses remanescentes em sua composição.

A análise por difratometria de raios-X revelou que não houve mudança significativa na cristalinidade da fração celulósica dos materiais pré-tratados, ao contrário dos pré-tratamentos baseados na dissolução de lignocelulose com líquidos

iônicos. Por outro lado, o índice de cristalinidade (CrI) dos diferentes materiais aumentou após o pré-tratamento, cujo aumento apresentou correlação direta com a remoção de CLCs e a acessibilidade dos substratos pré-tratados à hidrólise. Assim, a extração de CLCs foi o fator primário para o aumento de acessibilidade por levar a uma maior exposição da fração celulósica dos materiais, o que resulta em maiores rendimentos de hidrólise.

O pré-tratamento utilizando $scCO_2$ /LI-EtOH apresenta vantagens no sentido de produzir um material de alta acessibilidade que contém alto teor de polissacarídeos e que apresenta baixo teor de umidade após o pré-tratamento. Este último fato é interessante do ponto de vista de biorrefinarias, pois facilita o manuseio para reações sensíveis à presença de água e melhora os controles nos experimentos de hidrólise enzimática. Além disso, a lignina recuperada sob a forma de complexos lignina-carboidrato é solúvel em etanol e pode ser utilizada para outras aplicações dentro das biorrefinarias. O LI é passível de ser reciclado do extrato etanólico oriundo do pré-tratamento, no entanto, seria necessário desenvolver métodos de separação que permitam a sua recuperação em eficiência.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEN, A.; RUTH, M.; IBSEN, K.; JECHURA, J.; NEEVES, K.; SHEEHAN, J.; WALLACE, B. Lignocellulosic Biomass to Ethanol Process Design and Economics Utilizing Co-Current Dilute Acid Prehydrolysis and Enzymatic Hydrolysis for Corn Stover. Technical Report NREL/TP-510-32438. **National Renewable Energy Laboratory**, 2002.
- AGUIAR, R. S.; SILVEIRA, M. H.; PITARELO, A. P.; CORAZZA, M. L.; RAMOS, L. P. Kinetics of enzyme-catalyzed hydrolysis of steam-exploded sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 147, n. p. 416-423, 2013.
- ALVIRA, P.; TOMAS-PEJO, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4851-4861, 2010.
- ALVO, P.; BELKACEMI, K. Enzymatic saccharification of milled timothy (*Phleum pratense* L.) and alfalfa (*Mendicago sativa* L.). **Bioresource Technology**, v. 61, n. 3, p. 185-198, 1997.
- ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n. 4, p. 1-11, 2010.
- ARAQUE, E.; PARRA, C.; FREER, J.; CONTRERAS, D.; RODRÍGUEZ, J.; MENDONÇA, R.; BAEZA, J. Evaluation of organosolv pretreatment for the conversion of *Pinus radiata* D. Don to ethanol. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, n. 2, p. 214-219, 2008.
- AZUMA, J.-I.; KOSHIJIMA, T. Lignin-carbohydrate complexes from various sources. **Methods in Enzymology**, v. 161, p. 12-18, 1988.
- BACIC, A.; HARRIS, P. J.; STONE, B. A. Structure and function of plant cell walls. In: J. Preiss. **The Biochemistry of Plants: Carbohydrates**. San diego: Academic Press, 1988. p. 297-371.
- BEG, Q. K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G. S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, n. 3-4, p. 326-338, 2001.
- BERNINI, R.; MINCIONE, E.; BARONTINI, M.; PROVENZANO, G.; SETTI, L. Obtaining 4-vinylphenols by decarboxylation of natural 4-hydroxycinnamic acids under microwave irradiation. **Tetrahedron**, v. 63, n. 39, p. 9663-9667, 2007.
- BIELY, P.; VRSANSKA, M.; TENKANEN, M.; KLUEPFEL, D. Endo-beta-1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. **Journal of Biotechnology**, v. 57, n. 1-3, p. 151-166, 1997.

- BOERJAN, J. R.; BAUCHER, M. Lignin Biosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, p. 519-546, 2003.
- BON, E. P. S.; GIRÍO, F.; PEREIRA, N. J. Enzimas na produção de etanol. In: E. P. S. Bon, M. A. Ferrara, M. L. Corvo, A. B. Vermelho, C. L. A. Paiva, R. B. d. Alencastro e R. R. R. Coelho. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro: Editora Interciência Ltda., 2008. p. 241-271.
- BRAGG, W. L. The Diffraction of Short Electromagnetic Waves by a Crystal. **Proceedings of the Cambridge Philosophical Society**, v. 17, p. 43-57, 1913.
- BRANDT, A.; GRÄSVIK, J.; HALLETT, J. P.; WELTON, T. Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. **Green Chemistry**, v. 15, n. 3, p. 550-583, 2013.
- BRUNOW, G.; LUNDQUIST, K. Functional Groups and Bonding Patterns in Lignin (Including the Lignin-Carbohydrate Complexes. In: C. Heitner, D. R. Dimmel e J. A. Schmidt. **Lignin and Lignans Advances in Chemistry**. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group, 2010. p. 267–299.
- CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P. Biological pretreatment of sugar cane bagasse for the production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum*. **Industrial Crops and Products**, v. 29, n. 2-3, p. 642-647, 2009.
- CANILHA, L.; KUMAR CHANDEL, A.; DOS SANTOS MILESSI, T. S.; FERNANDES ANTUNES, F. A.; DA COSTA FREITAS, W. L.; DAS GRACAS ALMEIDA FELIPE, M.; DA SILVA, S. S. Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: an overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, n. p. 989572, 2012.
- CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; GÍRIO, F. M. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 67, n. 11, p. 849-864, 2008.
- CARVALHO, L. A. ***Pennisetum purpureum***. Coronel Pacheco: Embrapa – Gado de Leite, 1985.
- CHANDEL, A. K.; TASSIA LOPES JUNQUEIRA; MORAIS, E. R.; GOUVEIA, V. L. R.; CAVALETT, O.; RIVERA, E. C.; GERALDO, V. C.; BONOMI, A.; SILVA, S. S. d. Techno-Economic Analysis of Second-Generation Ethanol in Brazil: Competitive, Complementary Aspects with First-Generation Ethanol. In: S. S. Silva e A. K. Chandel. **Biofuels in Brazil**. Switzerland: Springer International Publishing, 2014. p. 1-29.

- CHANDRA, R. P.; BURA, R.; MABEE, W. E.; BERLIN, A.; PAN, X.; SADDLER, J. N. Substrate pretreatment: the key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics? In: L. Olsson. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**. Springer: 2007. p. 67-93.
- CHEN, X. A.; ISHIDA, N.; TODAKA, N.; NAKAMURA, R.; MARUYAMA, J. I.; TAKAHASHI, H.; KITAMOTO, K. Promotion of efficient saccharification of crystalline cellulose by *Aspergillus fumigatus* swo1 **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 8, p. 2556-561, 2010.
- CHENG, G.; VARANASI, P.; LI, C. L.; LIU, H. B.; MENICHENKO, Y. B.; SIMMONS, B. A.; KENT, M. S.; SINGH, S. Transition of Cellulose Crystalline Structure and Surface Morphology of Biomass as a Function of Ionic Liquid Pretreatment and Its Relation to Enzymatic Hydrolysis. **Biomacromolecules**, v. 12, p. 933-941, 2011.
- CHUM, H. L.; DOUGLAS, L. J.; FEINBERG, D. A.; SCHROEDER, H. A. **Evaluation of Pretreatment for Enzymatic Hydrolysis of Cellulose**. 1. ed. Golden: S.E.R. Institute, 1985.
- CLARK, J. H.; DESWARTE, F. E. I.; FARMER, T. J. The integration of green chemistry into future biorefineries. **Biofuels, Bioproducts & Biorefining**, v. 3, n. 1, p. 72-90, 2009.
- CRESTINI, C.; MELONE, F.; SETTE, M.; SALADINO, R. Milled wood lignin: a linear oligomer. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 11, p. 3928-3935, 2011.
- CUNHA, M. E.; SCHNEIDER, J. K.; BRASIL, M. C.; CARDOSO, C. A.; MONTEIRO, L. R.; MENDES, F. L.; PINHO, A.; JACQUES, R. A.; MACHADO, M. E.; FREITAS, L. S.; CARAMÃO, E. B. Analysis of fractions and bio-oil of sugar cane straw by one-dimensional and two-dimensional gas chromatography with quadrupole mass spectrometry (GCxGC/qMS). **Microchemical Journal**, v. 110, p. 113-119, 2013.
- CURRELI, N.; FADDA, M. B.; RESCIGNO, A.; RINALDI, A. C.; SODDU, G.; SOLLAI, F.; VACCARGIU, S.; SANJUST, E.; RINALDI, A. Mild alkaline/oxidative pretreatment of wheat straw. **Process Biochemistry**, v. 32, n. 8, p. 665-670, 1997.
- DANIEL, G. Wood and fibre morphology. In: M. Ek, G. Gellerstedt e G. Henriksson. **Wood chemistry and biotechnology**. Berlin: Walter de Gruyter, 2009. p. 46-71.
- DAVIN, L. B.; PATTEN, A. M.; JOURDES, M.; LEWIS, N. G. Lignins: A Twenty-First Century Challenge. In: M. E. Himmel. **Biomass Recalcitrance: Deconstructing the Plant Cell Wall for Bioenergy**. Oxford: Blackwell Publishing, 2008. p. 213-305.

- DESCHAMPS, F. C.; RAMOS, L. P. Método para a Determinação de Ácidos Fenólicos na Parede Celular de Forragens. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 4, p. 1634-1639, 2002.
- DINAND, E.; VIGNON, M.; CHANZY, H.; HEUX, L. Mercerization of primary wall cellulose and its implication for the conversion of cellulose I → cellulose II. **Cellulose**, v. 9, p. 7-18, 2002.
- DONALDSON, L. A. Lignification and lignin topochemistry – an ultrastructural view. **Phytochemistry**, v. 57, p. 859–873, 2001.
- DUPONT, J. From Molten Salts to Ionic Liquids: A “Nano” Journey. **Accounts of Chemical Research**, v. 44, n. p. 1223-1231, 2011.
- DUROT, N.; GAUDARD, F.; KUREK, B. The unmasking of lignin structures in wheat straw by alkali. **Phytochemistry**, v. 63, p. 617–623, 2003.
- EL-SAYED, A. M.; HEPPELTHWAITE, V. J.; MANNING, L. M.; GIBB, A. R.; SUCKLING, D. M. Volatile constituents of fermented sugar baits and their attraction to lepidopteran species. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v. 56, p. 953-958, 2005.
- FAO. **The state of food and agriculture. Biofuels: prospects, risks and oportunities**. Rome: Food and Agricultural Organisation of the United Nations, 2008.
- FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions**. 1. ed. New York: Walter De Gruyter Incorporated, 1989.
- FERRAZ, A.; COSTA, T. H. F.; SIQUEIRA, G.; MILAGRES, A. M. F. Mapping of Cell Wall Components in Lignified Biomass as a Tool to Understand Recalcitrance. In: S. S. Silva e A. K. Chandel. **Biofuels in Brazil**. Switzerland: Springer International Publishing, 2014. p. 173-202.
- FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L. M. F.; FERRARA, M. A.; NEPOMUCENO, A. L.; MOLINARI, H. B. C.; BON, E. P. S. Biomass Residues in Brazil: Availability and Potential Uses. **Waste and Biomass Valorization**, v. 1, n. 1, p. 65-76, 2010.
- FORT, D. A.; REMSING, R. C.; SWATLOSKI, R. P.; MOYNA, P.; MOYNA, G.; ROGERS, R. D. Can ionic liquids dissolve wood? Processing and analysis of lignocellulosic materials with 1-n-butyl-3-methylimidazolium chloride. **Green Chemistry**, v. 9, n. 1, p. 63-69, 2007.
- FOUST, T. D.; IBSEN, K. N.; DAYTON, D. C.; HESS, J. R.; KENNEY, K. E. The Biorefinery. In: M. E. Himmel. **Biomass Recalcitrance: Deconstructing the Plant Cell Wall for Bioenergy**. Oxford: Blackwell Publishing, 2008. p. 7-37.

- GALBE, M.; ZACCHI, G. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. In: L. Olsson. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**. Springer: 2007. p. 41-65.
- GALBE, M.; ZACCHI, G. Pretreatment: The key to efficient utilization of lignocellulosic materials. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, n. 1, p. 70-78, 2012.
- GERBER, D. W.; BYERRUM, R. U.; GEE, R. W.; TOLBERT, N. E. Glycerol concentrations in crop plants. **Plants Science**, v. 56, n. 1, p. 31-38, 1988.
- GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure & Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.
- GREGG, D.; SADDLER, J. Factors affecting cellulose hydrolysis and the potential of enzyme recycle to enhance the efficiency of an integrated wood to ethanol process. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 51, n. 1, p. 375-383, 1996.
- HANSEN, C. M.; BJØRKMANN, A. The Ultrastructure of Wood from a Solubility Parameter Point of View **Holzforschung**, v. 52, n. 4, p. 335-344, 1998.
- HARRIS, P. J.; STONE, B. A. Chemistry and Molecular Organization of Plant Cell Walls. In: M. E. Himmel. **Biomass Recalcitrance: Deconstructing the Plant Cell Wall for Bioenergy**. Oxford: Blackwell Publishing, 2008. p. 61-93.
- HARRIS, P. V.; WELNER, D.; MCFARLAND, K. C.; RE, E.; NAVARRO POULSEN, J. C.; BROWN, K.; SALBO, R.; DING, H.; VLASENKO, E.; MERINO, S.; XU, F.; CHERRY, J.; LARSEN, S.; LO LEGGIO, L. Stimulation of lignocellulosic biomass hydrolysis by proteins of glycoside hydrolase family 61: structure and function of a large, enigmatic family. **Biochemistry**, v. 49, n. 15, p. 3305-3316, 2010.
- HENDRIKS, A. T.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 10-18, 2009.
- HIDENO, A.; INOUE, H.; TSUKAHARA, K.; FUJIMOTO, S.; MINOWA, T.; INOUE, S.; ENDO, T.; SAWAYAMA, S. Wet disk milling pretreatment without sulfuric acid for enzymatic hydrolysis of rice straw. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 10, p. 2706-2711, 2009.
- HIMMEL, M. E.; DING, S. Y.; JOHNSON, D. K.; ADNEY, W. S.; NIMLOS, M. R.; BRADY, J. W.; FOUST, T. D. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. **Science**, v. 315, n. 5813, p. 804-807, 2007.
- HIMMEL, M. E.; VIZANT, T. B.; ADNEY, W. S.; DECKER, S. R.; BAKER, J. O.; KINTER, M. T.; SHERMAN, N. E.; FOX, J. W. Fingerprint *Thichoderma reesei* hydrolases in a 115 commercial cellulase preparation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 91-93, p. 99-109, 2001.

- HOWARD, R. L.; ABOTSI, E.; JANSEN VAN RENSBURG, E. L.; HOWARD, S. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 12, p. 602-619, 2003.
- HSU, T. C.; GUO, G. L.; CHEN, W. H.; HWANG, W. S. Effect of dilute acid pretreatment of rice straw on structural properties and enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4907-4913, 2010.
- IYAMA, K.; LAM, T. B.-T.; STONE, B. A. Covalent Cross-Links in the Cell Wall. **Plant Physiology**, v. 104, p. 315-320, 1994.
- JACOBS-YOUNG, C. J.; A.VENDITT, R.; JOYCE, T. W. Effect of enzymatic pretreatment on the diffusion of sodium hydroxide in wood. **TAPPI Journal**, v. 81, n. 1, p. 260-266, 1998.
- JOHN, M. J.; THOMAS, S. Biofibres and biocomposites. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, p. 343-364, 2008.
- KILPELÄINEN, I.; XIE, H.; KING, A.; GRANSTROM, M.; HEIKKINEN, S.; ARGYROPOULOS, D. S. Dissolution of Wood in Ionic Liquids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 9142–9148, 2007.
- KIM, K. H.; HONG, J. Supercritical CO₂ pretreatment of lignocellulose enhances cellulose hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 77, n. 2, p. 139-144, 2001.
- KIM, U.-J.; EOM, S. H.; WADA, M. Thermal decomposition of native cellulose: influence on crystallite size. **Polymers Degradation and Stability**, v. 95, p. 778-781, 2010.
- KOLPAK, F. J.; BLACKWELL, J. Determination of the structure of cellulose II. **Macromolecules**, v. 9, n. 2, p. 273-278, 1976.
- KRASSIG, H. A. **Cellulose: Structure, accessibility and reactivity**. 1. ed. South Africa: Gordon and Breach Science Publishers, 1993.
- KUMAR, P.; BARRETT, D. M.; DELWICHE, M. J.; STROEVE, P. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 48, n. 8, p. 3713-3729, 2009.
- KUMAR, S.; GUPTA, R.; LEE, Y. Y.; GUPTA, R. B. Cellulose pretreatment in subcritical water: effect of temperature on molecular structure and enzymatic reactivity. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 4, p. 1337-1347, 2010.
- LAWOKO, M.; HENRIKSSON, G.; GELLERSTEDT, G. Structural Differences between the Lignin-Carbohydrate Complexes Present in Wood and in Chemical Pulps. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 3467-3473, 2005.

- LEE, S. H.; DOHERTY, T. V.; LINHARDT, R. J.; DORDICK, J. S. Ionic liquid-mediated selective extraction of lignin from wood leading to enhanced enzymatic cellulose hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 5, p. 1368-1376, 2009.
- LI, C.; SUN, L.; SIMMONS, B. A.; SINGH, S. Comparing the Recalcitrance of Eucalyptus, Pine, and Switchgrass Using Ionic Liquid and Dilute Acid Pretreatments. **BioEnergy Research**, v. 6, n. 1, p. 14-23, 2012.
- LI, Q.; JIANG, X.; HE, Y.; LI, L.; XIAN, M.; YANG, J. Evaluation of the biocompatible ionic liquid 1-methyl-3-methylimidazolium dimethylphosphite pretreatment of corn cob for improved saccharification. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 1, p. 117-126, 2010.
- LI, W.; SUN, N.; STONER, B.; JIANG, X.; LU, X.; ROGERS, R. D. Rapid dissolution of lignocellulosic biomass in ionic liquids using temperatures above the glass transition of lignin. **Green Chemistry**, v. 13, n. 8, p. 2038-2047, 2011.
- MAGALHÃES DA SILVA, S. P.; MORAIS, A. R. C.; BOGEL-ŁUKASIK, R. The CO₂-assisted autohydrolysis of wheat straw. **Green Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 238-246, 2014.
- MCDUGALL, G. J.; MORRISON, I. M.; STEWART, D.; WEYERS, J. D. B.; HILLMAN, J. R. Plant fibres: Botany, chemistry and processing for industrial use. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 62, p. 1-20, 1993.
- MESA, L.; GONZÁLEZ, E.; RUIZ, E.; ROMERO, I.; CARA, C.; FELISSIA, F.; CASTRO, E. Preliminary evaluation of organosolv pre-treatment of sugar cane bagasse for glucose production: Application of 23 experimental design. **Applied Energy**, v. 87, n. 1, p. 109-114, 2010.
- MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- MONTENECOURT, B. S.; EVELEIGH, D. E. Preparation of Mutants of *Trichoderma reesei* with Enhanced Cellulase Production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 34, n. 6, p. 777-782, 1977.
- MORAIS, A. R. C.; MATA, A. C.; BOGEL-LUKASIK, R. Integrated conversion of agroindustrial residue with high pressure CO₂ within the biorefinery concept. **Green Chemistry**, v. 16, n. 9, p. 4312-4322, 2014.
- NGUYEN, Q. A.; DICKOW, J. H.; DUFF, B. W.; FARMER, J. D.; GLASSNER, D. A.; IBSEN, K. N.; RUTH, M. F.; SCHELL, D. J.; THOMPSON, I. B.; TUCKER, M. P. NREL/DOE Ethanol pilot-plant: current status and capabilities. **Bioresource Technology**, v. 58, n. 2, p. 189-196, 1996.

- NGUYEN, T. A.; KIM, K. R.; HAN, S. J.; CHO, H. Y.; KIM, J. W.; PARK, S. M.; PARK, J. C.; SIM, S. J. Pretreatment of rice straw with ammonia and ionic liquid for lignocellulose conversion to fermentable sugars. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 19, p. 7432-7438, 2010.
- NISHIYAMA, Y.; LANGAN, P.; CHANZY, H. Crystal Structure and Hydrogen-Bonding System in Cellulose I β from Synchrotron X-ray and Neutron Fiber Diffraction. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, p. 9074-9082, 2002.
- NORTHCOTE, D. R. Chemistry of the plant cell wall. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 23, p. 113-132, 1972.
- NOTENBOOM, V.; BORASTON, A. B.; CHIU, P.; FREELOVE, A. C. J.; KILBURN, D. G.; ROSE, D. R. Recognition of cello-oligosaccharides by a family 17 carbohydrate-binding module: An X-ray crystallographic, thermodynamic and mutagenic study. **Journal of Molecular Biology**, v. 314, n. 4, p. 797-780, 2001.
- NREL. **What Is a Biorefinery?** Disponível em: <http://www.nrel.gov/biomass/biorefinery.html>. Acesso em: 19/08/2014.
- OLSSON, L. J.; JÖRGENSEN, H. K.; KROGH, K. B. R.; ROCA, C. Bioethanol production from lignocellulosic material. . In: S. Dimitriu. **Polyssaccharides Structural Diversity and Functional Versatility**. New York: Marcel Dekker, 2005. p. 957-993.
- PARK, C. Y.; RYU, Y. W.; KIM, C. Kinetics and rate of enzymatic hydrolysis of cellulose in supercritical carbon dioxide. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 18, n. 4, p. 475-478, 2001.
- PARK, S.; BAKER, J. O.; HIMMEL, M. E.; PARILLA, P. A.; JOHNSON, D. K. Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. **Biotechnology for Biofuels**. v. 10, n. 3, p. 1-10.
- PASQUINI, D.; PIMENTA, M. T. B.; FERREIRA, L. H.; CURVELO, A. A. D. Extraction of lignin from sugar cane bagasse and *Pinus taeda* wood chips using ethanol-water mixtures and carbon dioxide at high pressures. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 36, n. 1, p. 31-39, 2005a.
- PASQUINI, D.; PIMENTA, M. T. B.; FERREIRA, L. H.; CURVELO, A. A. S. Sugar cane bagasse pulping using supercritical CO₂ associated with co-solvent 1-butanol/water. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 34, n. 2, p. 125-131, 2005b.
- PATTERSON, A. The Scherrer Formula for X-Ray Particle Size Determination. **Physical Reviews**, v. 56, n. 10, p. 978-982, 1939.
- PENTTILÄ, P. A.; VÁRNAI, A.; LEPPÄNEN, K.; PEURA, M.; KALLONEN, A.; JÄÄSKELÄINEN, P.; LUCENIUS, J.; RUOKOLAINEN, J.; SIIKA-AHO, M.;

- VIKARI, L.; SERIMAA, R. Changes in Submicrometer Structure of Enzymatically Hydrolyzed Microcrystalline Cellulose. **Biomacromolecules**, v. 11, p. 1111–1117, 2010.
- PETROU, E. C.; PAPPIS, C. P. Biofuels: A Survey on Pros and Cons. **Energy & Fuels**, v. 23, n. 2, p. 1055-1066, 2009.
- POPESCU, C.-M.; POPESCU, M.-C.; VASILE, C. Structural changes in biodegradable lime wood. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 362-372, 2010.
- QIAN, X. The effect of cooperativity on hydrogen bonding interactions in native cellulose I β from *ab initio* molecular dynamics simulations. **Molecular Simulation**, v. 34, n. 2, p. 183-191, 2008.
- RABINOVICH, M. L.; MELNICK, M. S.; V, B. A. The structure and mechanism of action of cellulolytic enzymes. **Biochemistry (Moscow)**, v. 67, n. 8, p. 850-871, 2002.
- RAGAUSKAS, A. J.; BECKHAM, G. T.; BIDDY, M. J.; CHANDRA, R.; CHEN, F.; DAVIS, M. F.; DAVISON, B. H.; DIXON, R. A.; GILNA, P.; KELLER, M.; LANGAN, P.; NASKAR, A. K.; SADDLER, J. N.; TSCHAPLINSKI, T. J.; TUSKAN, G. A.; WYMAN, C. E. Lignin valorization: improving lignin processing in the biorefinery. **Science**, v. 344, n. 6185, p. 1246843, 2014.
- RAMOS, L. P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, v. 26, n. 6, p. 863-871, 2003.
- REVERCHON, E.; DE MARCO, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 38, n. 2, p. 146-166, 2006.
- SAAD, M. B. W.; OLIVEIRA, L. R. M.; CÂNDIDO, R. G.; QUINTANA, G.; ROCHA, G. J. M.; GONÇALVES, A. R. Preliminary studies on fungal treatment of sugarcane straw for organosolv pulping. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, n. 2, p. 220-225, 2008.
- SAHA, B. C.; ITEN, L. B.; COTTA, M. A.; WU, Y. V. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 12, p. 3693-3700, 2005.
- SALVADOR, Â. C.; SANTOS, M. C.; SARAIVA, J. A. Effect of the ionic liquid [bmim]Cl and high pressure on the activity of cellulase. **Green Chemistry**, v. 12, n. 4, p. 632-635, 2010.
- SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha da cana-de-açúcar para a produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.

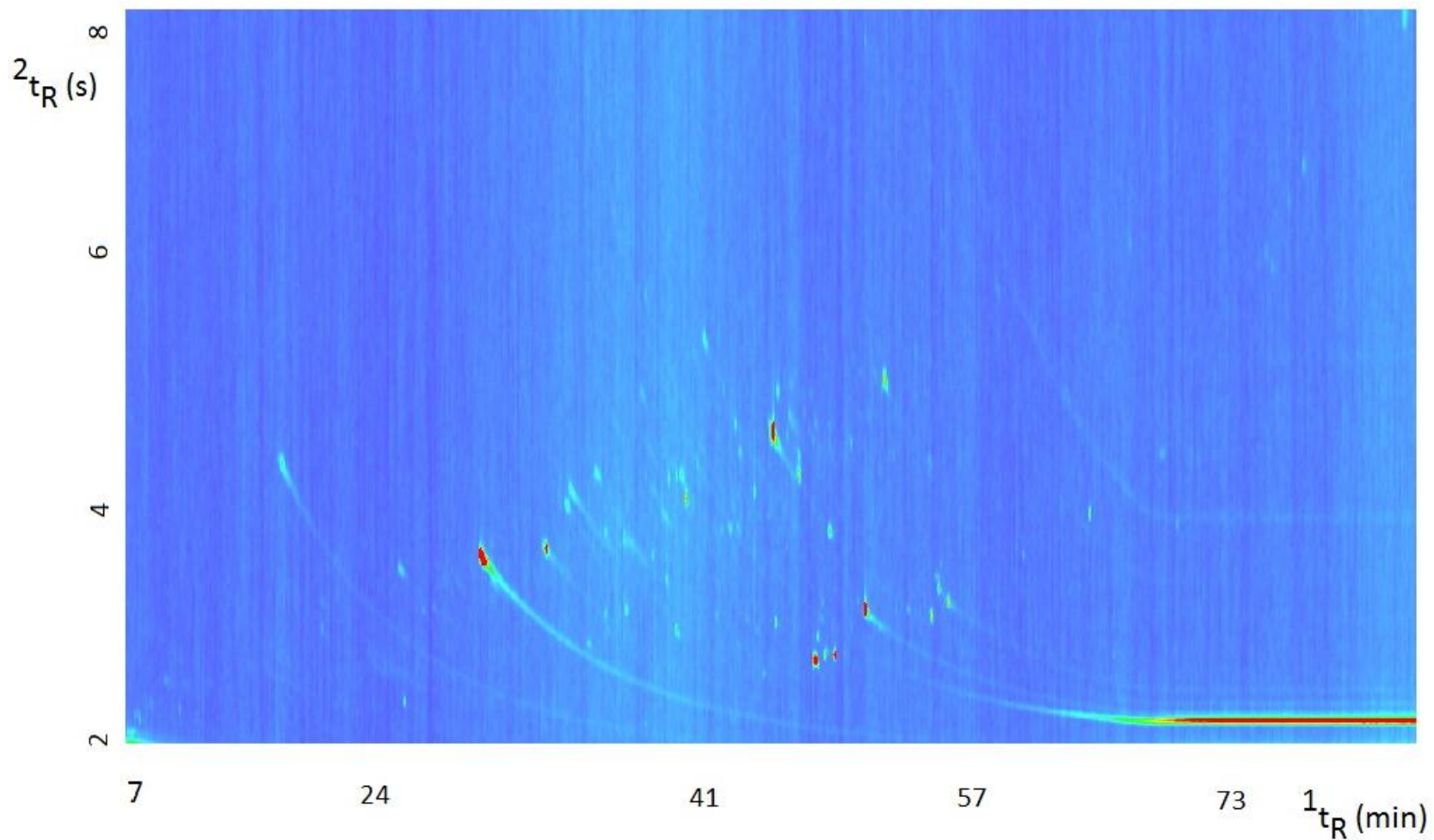
- SCHUCHARDT, U.; RIBEIRO, M. L.; GONÇALVES, A. R. A indústria petroquímica no próximo século: como substituir o petróleo como matéria-prima? **Química Nova**, v. 24, n. 2, p. 247-251, 2000.
- SEGAL, L.; CREELY, J. J.; MARTIN JR, A. E.; CONRAD, C. M. An Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometer. **Textile Research Journal**, v. 29, n. 10, p. 786-794, 1959.
- SHATALOV, A. A.; EVTUGUIN, D. V.; NETO, C. P. (2-O-D-Galactopyranosyl-4-O-methyl-D-glucurono)-D-xylan from *Eucalyptus globulus* Labill. **Carbohydrate Research**, v. 320, p. 93-99, 1999.
- SILVA, A. S. A.; INOUE, H.; ENDO, T.; YANO, S.; BON, E. P. S. Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 19, p. 7402-7409, 2010.
- SILVEIRA, M. H.; AGUIAR, R. S.; SIIKA-AHO, M.; RAMOS, L. P. Assessment of the enzymatic hydrolysis profile of cellulosic substrates based on reducing sugar release. **Bioresource Technology**, v. 151, n. p. 392-396, 2014a.
- SILVEIRA, M. H. L. **Pré-tratamento de bagaço de cana com CO₂ supercrítico na presença de etanol e líquido iônico: pré-otimização das variáveis do processo e avaliação da acessibilidade dos substratos produzidos**. 127 f. Tese (Doutorado em Química) - Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.
- SILVEIRA, M. H. L.; SIIKA-AHO, M.; KRUUS, K.; GARRIGA, L. M.; RAMOS, L. P. The essential role of plant cell wall degrading enzymes in the success of biorefineries: Current status and future challenges. In: S. S. Silva e A. K. Chandel. **Biofuels in Brazil**. Switzerland: Springer International Publishing, 2014b. p. 151-172.
- SINGH, R.; SINGH, S.; TRIMUHKE, K. D.; PANDARE, K. V.; BASTAWADE, K. B.; GOKHALE, D. V.; VARMA, A. J. Lignin-carbohydrate complexes from sugarcane bagasse: Preparation, purification, and characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 62, p. 57-66, 2005.
- SJÖSTRÖM, E. **Wood Chemistry: Fundamentals and Applications**. 1. ed. Houston: Gulf Professional Publishing, 1993.
- SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. **Determination of ash in biomass**. Technical Report NREL/TP-510-42622: National Renewable Energy Laboratory, 2008a.
- SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D. **Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass**. Technical Report NREL/TP-510-42618: National Renewable Energy Laboratory, 2011.

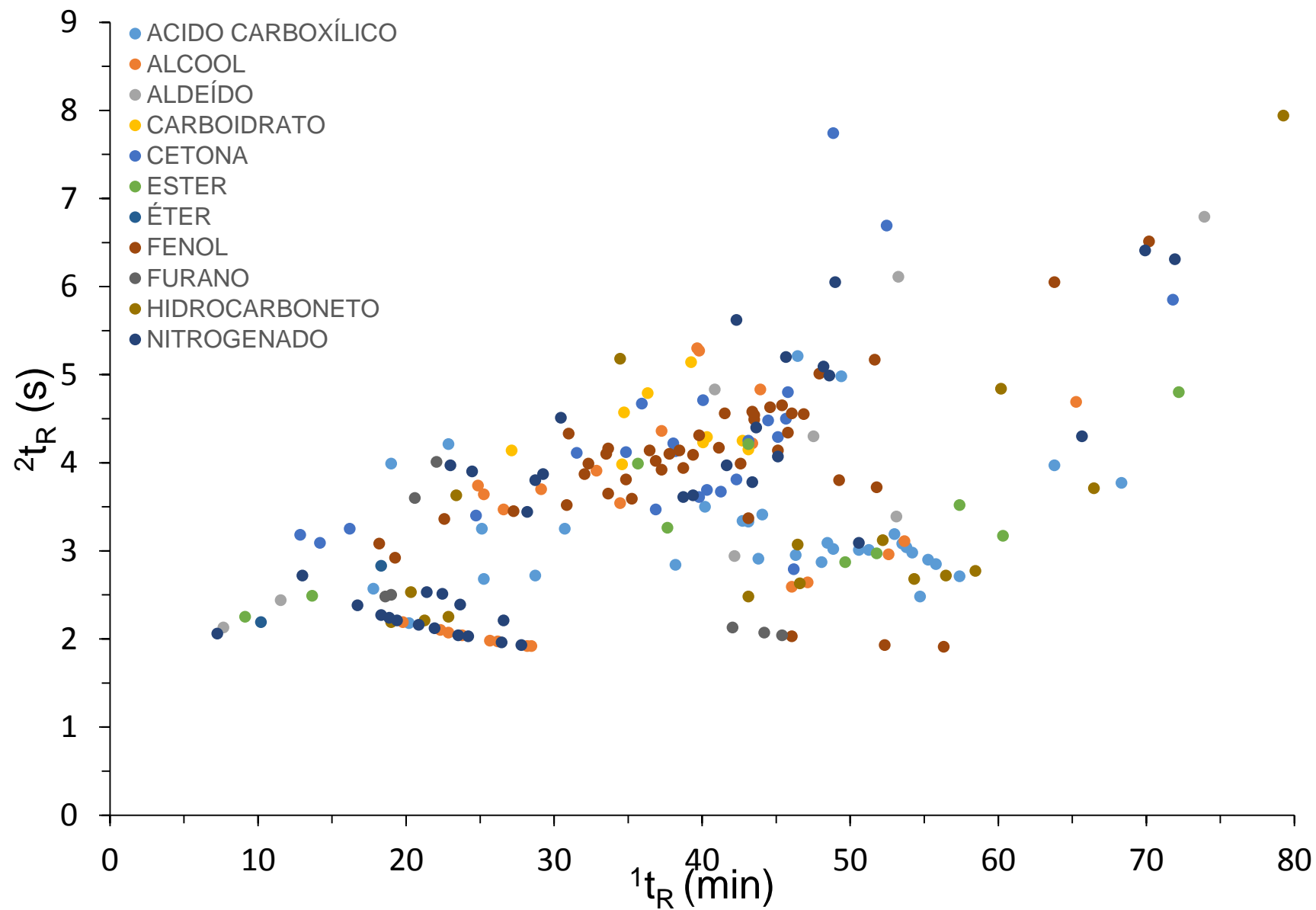
- SLUITER, A.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. **Determination of extractives in biomass**. Technical Report NREL/TP-510-42619: National Renewable Energy Laboratory, 2008b.
- STARK, A. Ionic liquids in the biorefinery: a critical assessment of their potential. **Energy & Environmental Science**, v. 4, n. 1, p. 19-32, 2011.
- STOCKER, M. Biofuels and biomass-to-liquid fuels in the biorefinery: catalytic conversion of lignocellulosic biomass using porous materials. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 47, n. 48, p. 9200-9211, 2008.
- SUN, N.; RAHMAN, M.; QIN, Y.; MAXIM, M. L.; RODRÍGUEZ, H.; ROGERS, R. D. Complete dissolution and partial delignification of wood in the ionic liquid 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate. **Green Chemistry**, v. 11, n. 5, p. 646-655, 2009.
- SUN, Y. **Enzymatic hydrolysis of rye straw Bermudgrass for ethanol production**. 128 f. PhD Thesis - Biological and Agricultural Engineering, North Carolina State University, Raleigh, 2002.
- SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, n. 1, p. 1-11, 2002.
- SWATLOSKI, R. P.; SPEAR, S. K.; HOLBREY, J. D.; ROGERS, R. D. Dissolution of Cellulose with Ionic Liquids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, p. 4974-4975, 2002.
- SZCZERBOWSKI, D.; PITARELO, A. P.; FILHO, A. Z.; RAMOS, L. P. Sugarcane biomass for biorefineries: Comparative composition of carbohydrate and non-carbohydrate components of bagasse and straw. **Carbohydrate Polymers**, v. 114, p. 95-101, 2014.
- TADESSE, H.; LUQUE, R. Advances on biomass pretreatment using ionic liquids: An overview. **Energy & Environmental Science**, v. 4, p. 3913-3929, 2011.
- TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, n. 9, p. 1621-1651, 2008.
- TEATHER, R. M.; WOOD, P. J. Use of Congo Red-Polysaccharide Interactions in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria from the Bovine Rument. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 777-780, 1982.
- VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including liner temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 11, p. 463-471, 1963.

- VÁRNAS, A.; HUIKKO, L.; PERE, J.; SIIKA-AHO, M.; VIIKARI, L. Synergistic action of xylanase and mannanase improves the total hydrolysis of softwood. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 19, p. 9096-9104, 2011.
- VÁZQUEZ, M.; S., G.; GONZÁLES-GRABIALES, J. J.; GARROTE, G.; RAMÍREZ, J. A. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. **Journal of Food Engineering**, v. 74, n. 1, p. 78-88, 2006.
- WADA, M.; KONDO, T.; ITOH, T. Thermally Induced Crystal Transformation from Cellulose I α to I β . **Polymer Journal**, v. 35, p. 155-159, 2003.
- WANG, H.; GURAU, G.; ROGERS, R. D. Ionic liquid processing of cellulose. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 4, p. 1519-1537, 2012.
- WHISTLER, R. L.; CHEN, C.-C. Hemicelluloses. In: M. Lewin e I. S. Goldstein. **Wood Structure and Composition**. New York: Dekker, 1991. p. 287–319.
- WU, T.; HAN, B. Supercritical Carbon Dioxide (CO₂) as Green Solvent. In: P. T. Anastas e J. B. Zimmerman. **Innovations in Green Chemistry and Green Engineering**. New York: Springer, 2013. p. 297-326.
- WYMAN, C. E. **Handbook on Bioethanol: Production and Utilization**. 1. ed. Washington: Taylor Francis, 1996.
- WYMAN, C. E. What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol. **Trends in Biotechnology**, v. 25, n. 4, p. 153-157, 2007.
- YASUDA, M.; TAKEO, K.; NAGAI, H.; UTO, T.; YUI, T.; MATSUMOTO, T.; ISHII, Y.; OHTA, K. Enhancement of Ethanol Production from Napiergrass (*Pennisetum purpureum*) by a Low-Moisture Anhydrous Ammonia Pretreatment. **Journal of Sustainable Bioenergy Systems**, v. 3, n. 3, p. 179-185, 2013.
- YOUNGS, T. G. A.; HARDACRE, C.; HOLBREY, J. D. Glucose Solvation by the Ionic Liquid 1,3-Dimethylimidazolium Chloride: A Simulation Study. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 111, p. 13765-13774, 2007.
- YU, Q.; ZHUANG, X.; YUAN, Z.; WANG, Q.; WEI, Q.; WANG, W.; ZHANG, Y.; JINGLIANG, X.; HUIJUAN, X. Two-step liquid hot water pretreatment of *Eucalyptus grandis* to enhance sugar recovery and enzymatic digestibility of cellulose. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4895-4899, 2010.
- YU, Z.; YU, J.; ZHANG, J.; HE, J.; LIU, Z. Combinations of mild physical or chemical pretreatment with biological pretreatment for enzymatic hydrolysis of rive hull. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 2, p. 903-908, 2009.
- ZACCHI, G.; EKLUND, R.; GALBE, M. The influence of SO₂ and H₂SO₄ impregnation of willow prior to steam pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 52, n. p. 225-229, 1995.

- ZHANG, L.; LI, D.; WANG, L.; WANG, T.; ZHANG, L.; CHEN, D. X.; MAO, Z. Effect of steam explosion on biodegradation of lignin in wheat straw **Bioresource Technology**, v. 99, n. 17, p. 8512-8515, 2008.
- ZHAO, W.; YANG, R.; ZHANG, Y.; WU, L. Sustainable and practical utilization of feather keratin by an innovative physicochemical pretreatment: high density steam flash-explosion. **Green Chemistry**, v. 14, n. 12, p. 3352-3360, 2012.
- ZHAO, X.; CHENG, K.; LIU, D. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. **Applied Microbial Biotechnology**, v. 82, p. 815-827, 2009.
- ZHENG, M.; LI, L.; LI, X.; YANG, X.; HE, Y. Enhancing anaerobic biogasification of corn stover through wet state NaOH pretreatment. **Bioresource Techn**, v. 100, n. 21, p. 5140-5145, 2009.
- ZHU, J. Y.; ZHU, W.; OBRYAN, P.; DIEN, B. S.; TIAN, S.; GLEISNER, R.; PAN, X. J. Ethanol production from SPORL-pretreated lodgepole pine: preliminary evaluation of mass balance and process energy efficiency. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 5, p. 1355-1365, 2010.
- ZHU, S.; WU, Y.; CHEN, Q.; YU, Z.; WANG, C.; JIN, W.; DING, Y.; WU, G. Dissolution of cellulose with ionic liquids and its application: a mini-review. . **Green Chemistry**, v. 8, n. 4, p. 325-327, 2006.

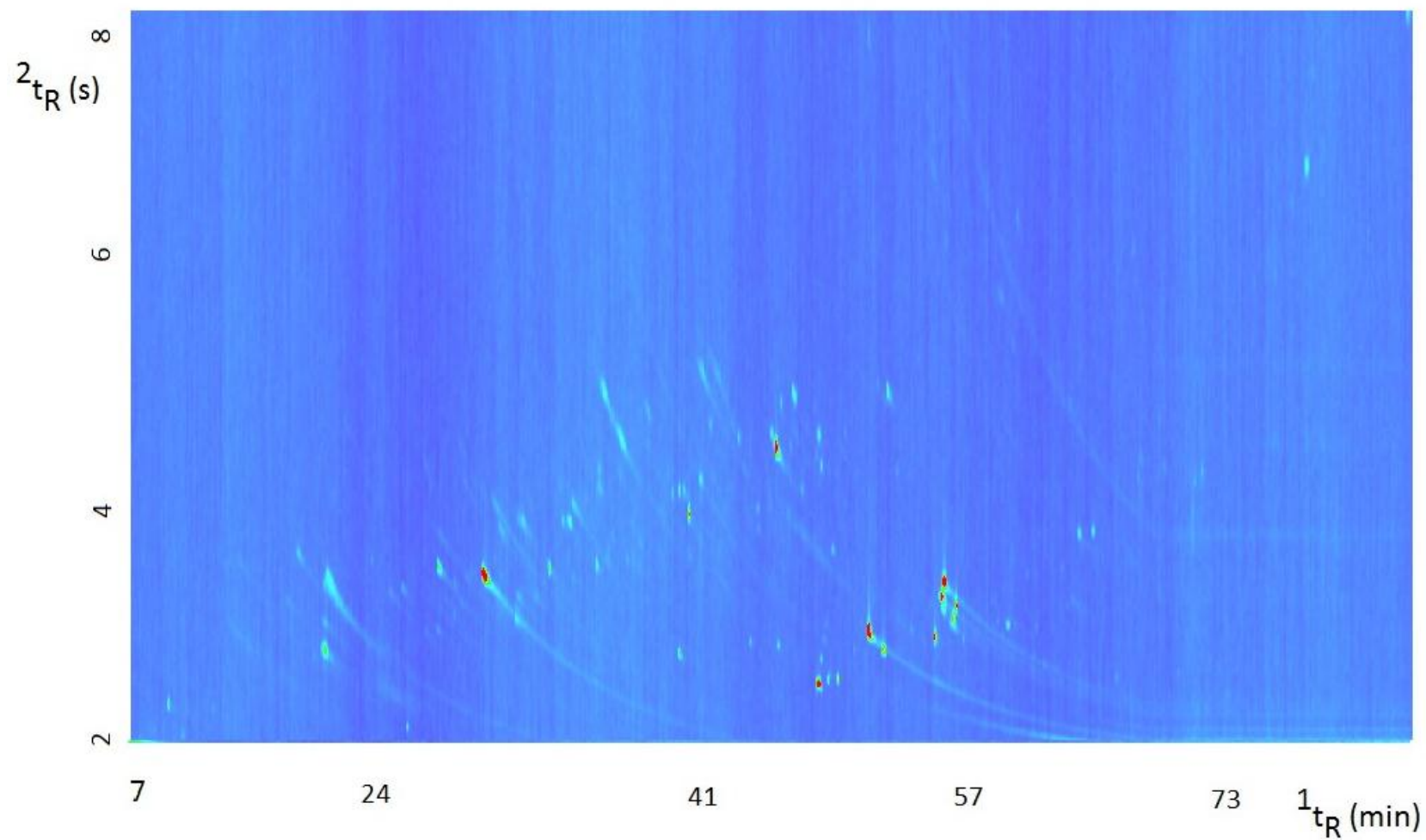
ANEXO 1 – RESULTADOS DE CGXCG/TOF-MS PARA O EXTRATO ETANÓLICO DE PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR.

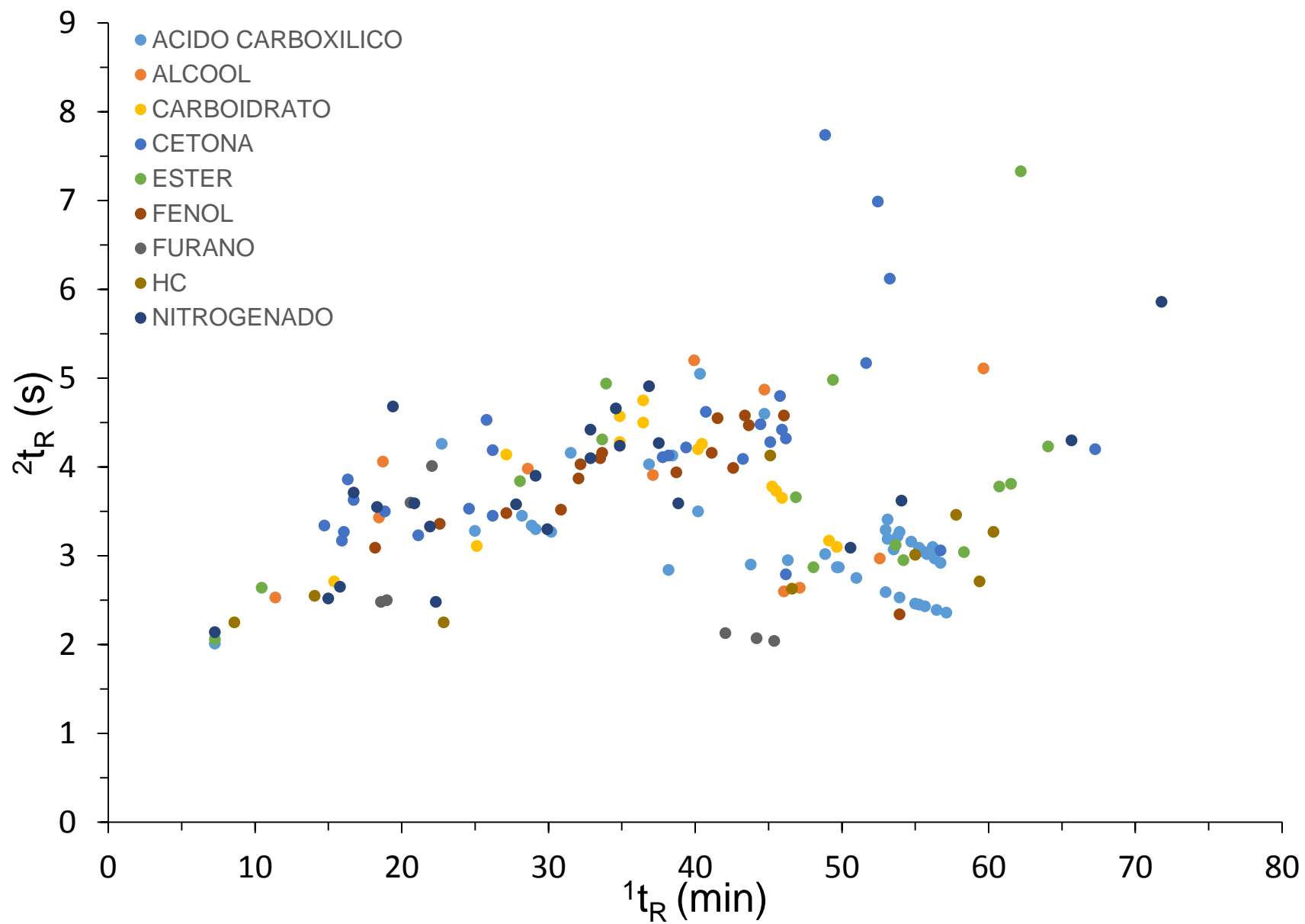




COMPOSTO	IR _{Lit}	¹ t _R (min)	² t _R (s)	IR _{Exp}	Classe	Área (%)	Fórmula	S
2-Methoxy-ethanamine		16,7	2,4	946	Nitrogenado	1,03	C ₃ H ₉ NO	932
2-Methyl-5-isopropyl furan	933	16,9	3,6	950	Furano	0,66	C ₈ H ₁₂ O	916
Phenol	985	18,2	3,1	984	Fenol	0,53	C ₆ H ₆ O	912
1-Nonen-3-ol	1066	21,4	2,5	1064	Alcool	3,35	C ₉ H ₁₈ O	909
3,3,5-trimethyl-cyclohexanol	1073	22,5	2,5	1091	Alcool	1,89	C ₉ H ₁₈ O	918
2-methoxyphenol	1090	22,6	3,4	1095	Fenol	1,05	C ₇ H ₈ O ₂	927
Undecane	1099	22,9	2,3	1101	HC	0,73	C ₁₁ H ₂₄	909
2-Methyl-6-methylene-7-octen-2-ol-	1118	23,7	2,4	1122	Fenol	0,72	C ₁₀ H ₁₈ O	887
4-Vinylphenol	1224	27,3	3,5	1221	Fenol	29,32	C ₁₀ H ₁₀ O ₂	878
2-Methoxy-4-vinylphenol	1307	30,9	3,5	1326	Fenol	2,78	C ₉ H ₁₀ O ₂	937
2,6-Dimethoxyphenol,	1365	32,1	3,9	1362	Fenol	0,54	C ₈ H ₁₀ O ₃	913
4-Hydroxy-benzaldehyde,	1316	32,3	4,0	1370	Aldeído	3,05	C ₇ H ₆ O ₂	936
Vanillin	1410	33,7	4,2	1411	Fenol	0,61	C ₈ H ₈ O ₃	911
Levoglucozan	1491	36,3	4,8	1498	Carboidrato	0,80	C ₆ H ₁₀ O ₅	862
3-Methylbut-3-enyl-propyl succinate	1539	37,7	3,3	1541	Éster	0,51	C ₁₂ H ₂₀ O ₄	861
1-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-propanone	1541	37,8	4,1	1546	Cetona	0,61	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	804
Dodecanoic acid	1559	38,2	2,8	1558	Ácido	0,72	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	857
2',4'-Dimethoxyacetophenone	1586	38,7	3,9	1576	Cetona	0,77	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	728
4-(3-Hydroxy-1-propenyl)-2-methoxy-phenol	1745	43,5	4,5	1750	Fenol.	0,58	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	726
Tetradecanoic acid	1762	43,8	2,9	1760	Ácido	0,59	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	860
p-Hydroxycinnamic acid	1635	44,6	4,6	1793	Fenol	0,64	C ₉ H ₈ O ₃	872
2,6,10,14-Tetramethyl-2-hexadecene	1849	46,1	2,6	1849	HC	2,69	C ₂₀ H ₄₂	842
Trimethylheptadecane	1895	47,1	2,6	1891	HC	1,02	C ₂₀ H ₄₂	869
n-Hexadecanoic acid	1961	48,9	3,0	1960	Ácido	7,22	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	895
Phytol	2119	52,6	3,0	2121	Álcool	1,41	C ₂₀ H ₄₀ O	895
9-Octadecenoic acid (Oleic Acid)	2147	53,0	3,2	2140	Ácido	0,81	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	873
Octadecanoic acid (stearic acid)	2162	53,5	3,1	2165	Ácido	0,83	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	896
> C30		79,3	7,9		Éster	0,64	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	781

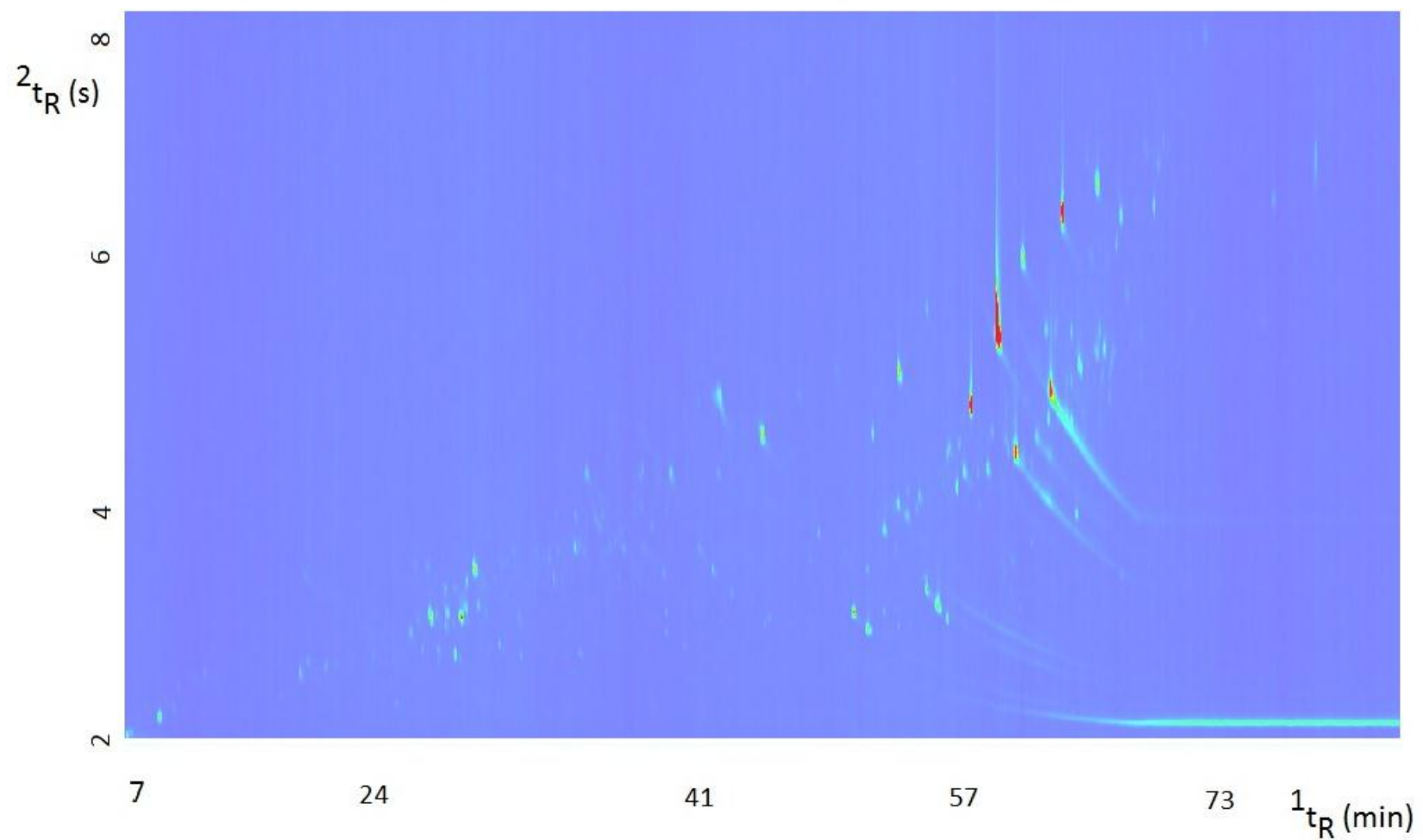
IR_{LIT}= ÍNDICE DE RETENÇÃO ENCONTRADO NA LITERATURA; ¹t_R= TEMPO DE RETENÇÃO DA PRIMEIRA DIMENSÃO; ²t_R= TEMPO DE RETENÇÃO DA SEGUNDA DIMENSÃO; IR_{CALC}=ÍNDICE DE RETENÇÃO OBTIDO EXPERIMENTALMENTE; S= FATOR DE SIMILARIDADE ENTRE ESPECTRO DE MASSAS EXPERIMENTAIS E TEÓRICOS.

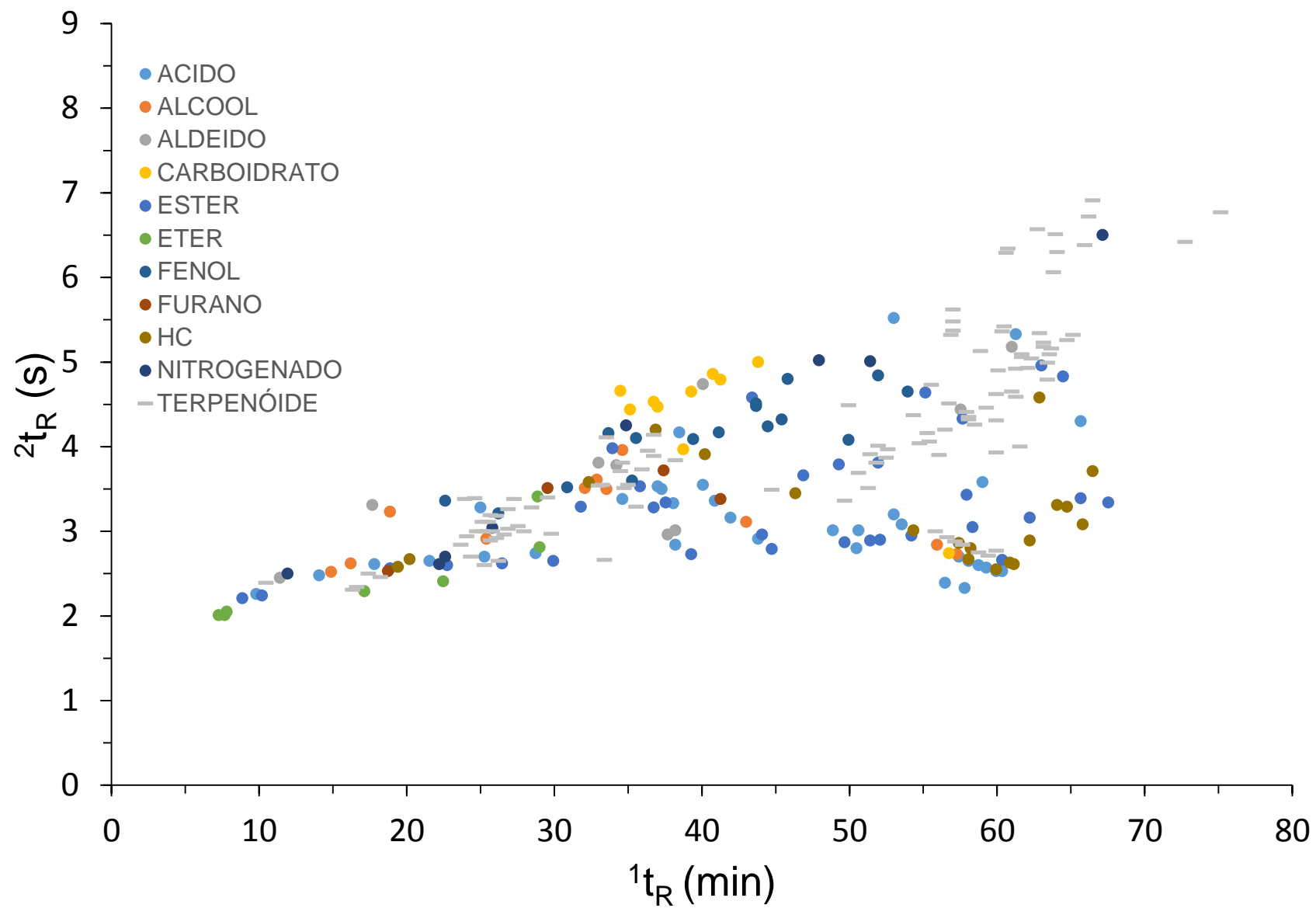
ANEXO 2 – RESULTADOS DE CGXCG/TOF-MS PARA O EXTRATO ETANÓLICO DE CAPIM ELEFANTE.



COMPOSTO	IR _{Lit}	¹ t _R (min)	² t _R (s)	IR _{Exp}	Classe	Área (%)	Fórmula	S
Acetic acid	-	7,3	2,0		Ácido	1,21	C ₂ H ₄ O ₂	963
Maleic anhydride	855	13,4	3,6	868	Anidrido	3,06	C ₄ H ₂ O ₃	937
2,3-Dihydroxy-propanal	-	13,4	3,0	868	Aldeído	0,54	C ₃ H ₆ O ₃	829
2-Methoxy- ethanamine,	-	15,0	2,5	901	Nitrogenado	0,68	C ₃ H ₉ NO	985
Dihydro-3-methylene-2,5-furandione	964	16,7	3,6	946	Furano	3,43	C ₅ H ₄ O ₃	928
Phenol	979	18,2	3,1	984	Fenol	0,75	C ₆ H ₆ O	937
Glycerin	-	18,5	3,4	991	Álcool	18,59	C ₃ H ₈ O ₃	909
Thymine	-	21,9	3,3	1078	Nitrogenado	0,72	C ₅ H ₆ N ₂ O ₂	792
1-Nonen-3-ol	1064	22,3	2,5	1088	Álcool	4,59	C ₉ H ₁₈ O	889
2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-Pyran-4-one	1140	24,6	3,5	1148	Cetona	0,88	C ₆ H ₈ O ₄	861
4-Vinylphenol	1212	27,1	3,5	1217	Fenol	10,52	C ₁₀ H ₁₀ O ₂	879
5-(Hydroxymethyl)-2-Furancarboxaldehyde (HMF)	1236	27,8	4,0	1237	Aldeído	1,93	C ₆ H ₆ O ₃	862
Malic Acid	-	29,1	3,3	1275	Ácido	0,58	C ₄ H ₆ O ₅	835
2-Methoxy-4-vinylphenol	1326	30,9	3,5	1326	Fenol	0,57	C ₉ H ₁₀ O ₂	926
4-Hydroxybenzaldehyde	1316	32,2	4,0	1366	Fenol	0,84	C ₇ H ₆ O ₂	927
Sucrose	-	34,9	4,6	1450	Carboidrato	2,25	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	682
1,6-Anhydro-α -D-glucopyranose (levoglucosan)	1491	36,5	4,8	1503	Carboidrato	0,62	C ₆ H ₁₀ O ₅	861
2',4'-Dimethoxyacetophenone	1586	38,7	3,9	1576	Fenol	0,64	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	735
4-(3-hydroxy-1-propenyl)-2-methoxyphenol	1745	43,7	4,5	1756	Fenol	1,97	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	880
Allo-Inositol	-	45,9	3,7	1845	Carboidrato	2,16	C ₆ H ₁₂ O ₆	825
Neophytadiene	1844	46,1	2,6	1849	HC	1,08	C ₂₀ H ₄₀ O	841
n-Hexadecanoic acid (palmitic acid)	1959	48,9	3,0	1960	Ácido	5,25	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	894
Ethyl Hexadecanoate (ethyl palmitate)	1992	49,7	2,9	1991	Éster	1,31	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	867
Phytol	2122	52,6	3,0	2121	Alcool	1,70	C ₂₀ H ₄₀ O	904
Linolelaidic acid	2144	53,0	3,3	2140	Ácido	1,88	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	875
9-Octadecenoic acid (oleic acid)	2143	53,0	2,6	2140	Ácido	0,56	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	768
(Z,Z,Z)-9,12,15-Octadecatrienoic acid (linolenic acid)	2143	53,1	3,4	2146	Ácido	3,60	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	880
Ethyl (Z,Z,Z)-9,12,15-Octadecatrienoate (ethyl linolenate)	2178	53,8	3,2	2178	Éster	0,85	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	890

IR_{LIT}= ÍNDICE DE RETENÇÃO ENCONTRADO NA LITERATURA; ¹t_R= TEMPO DE RETENÇÃO DA PRIMEIRA DIMENSÃO; ²t_R= TEMPO DE RETENÇÃO DA SEGUNDA DIMENSÃO; IR_{CALC}=ÍNDICE DE RETENÇÃO OBTIDO EXPERIMENTALMENTE; S= FATOR DE SIMILARIDADE ENTRE ESPECTRO DE MASSAS EXPERIMENTAIS E TEÓRICOS.

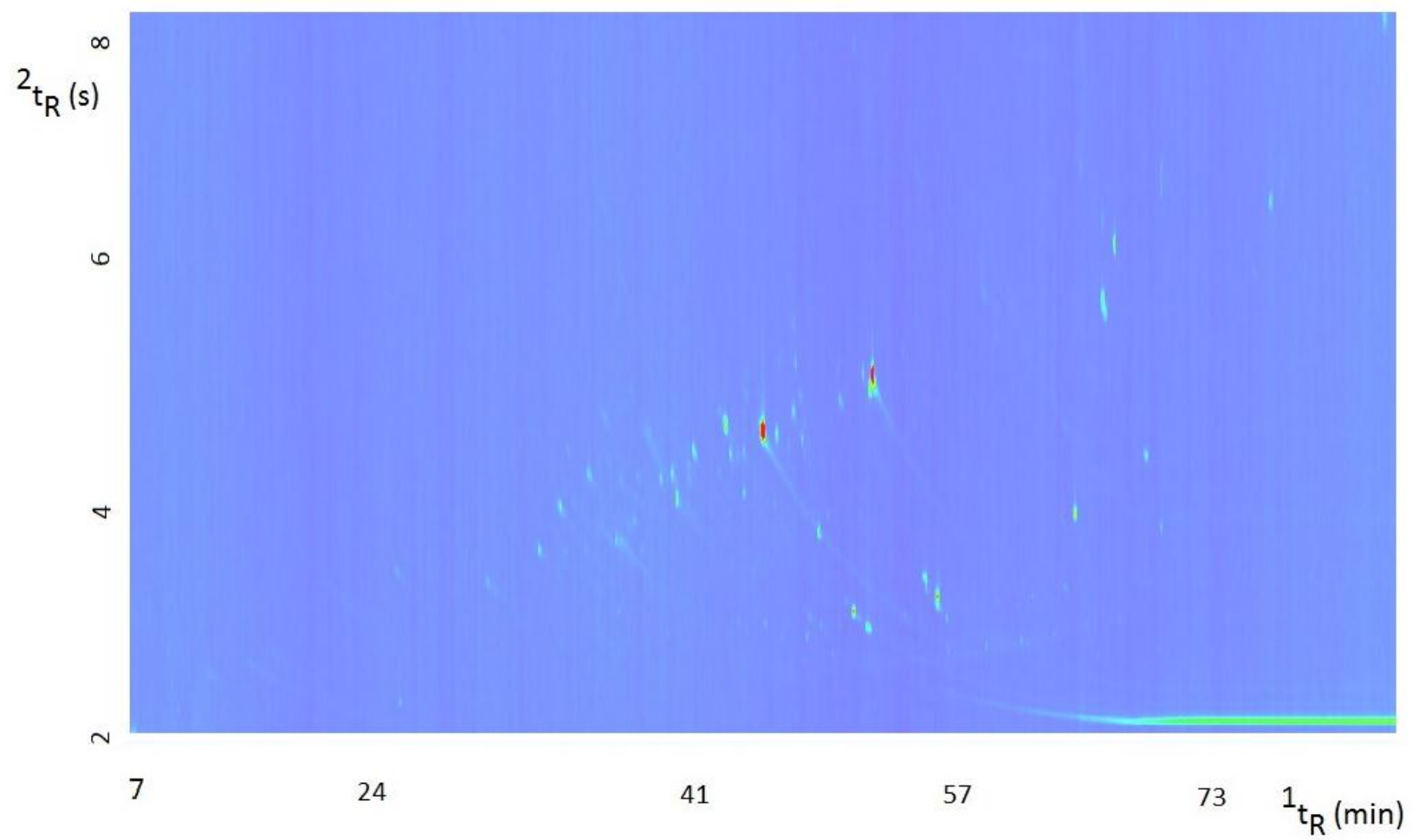
ANEXO 3 – RESULTADOS DE CGXCG/TOF-MS PARA O EXTRATO ETANÓLICO DE *Pinus taeda*.

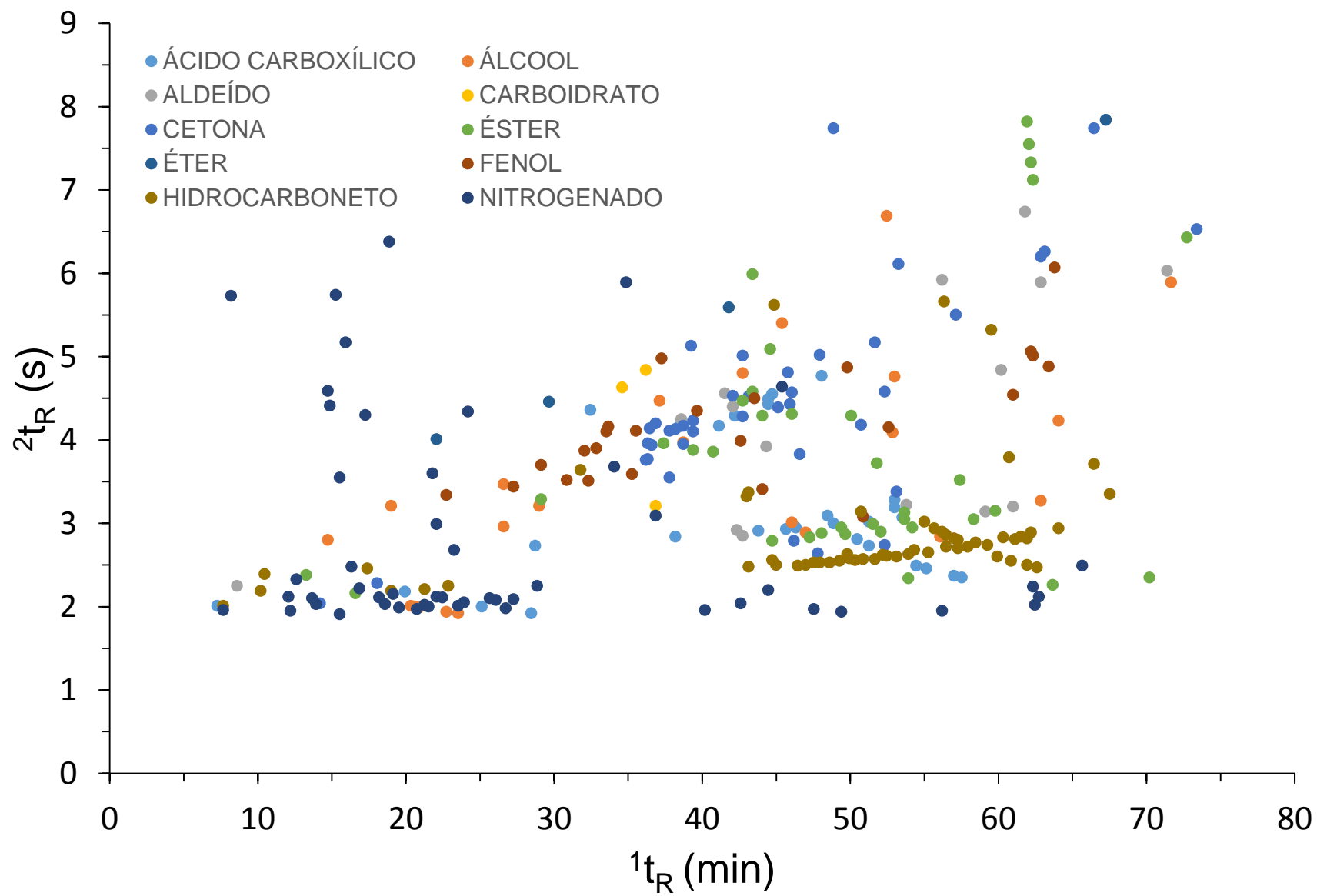


COMPOSTO	IR _{Lit}	¹ t _R (min)	² t _R (s)	IR _{Exp}	Classe	Área (%)	Fórmula	S
Methoxyethane	-	7,3	2,0	-	Éter	1,49	C ₃ H ₈ O	926
2-methoxy-ethanamine	-	11,9	2,5	837	Nitrogenado	1,28	C ₃ H ₉ NO	952
Dehydrosabinene ¹	959	17,4	2,5	963	Terpenóide	0,98	C ₁₀ H ₁₄	821
Hexanoic acid	977	17,8	2,6	974	Ácido	0,67	C ₆ H ₁₂ O ₂	931
1,2,3-Propanetriol (glicerol)	-	18,9	3,2	1001	Álcool	2,88	C ₃ H ₈ O ₃	873
(-)-Pinocarveol ²	1157	24,7	3,0	1151	Terpenóide	1,24	C ₁₀ H ₁₆ O	880
Borneol ³	1179	25,8	3,0	1180	Terpenóide	1,06	C ₁₀ H ₁₈ O	918
α-Terpineol ⁴	1198	26,6	3,0	1201	Terpenóide	3,18	C ₁₀ H ₁₈ O	899
(-)-Myrtenol ⁵	1201	26,9	3,0	1209	Terpenóide	0,91	C ₁₀ H ₁₆ O	860
(-)-Verbenone ⁶	1204	27,3	3,4	1221	Terpenóide	1,47	C ₁₀ H ₁₄ O	942
Vanillin	1410	33,7	4,2	1411	Fenol	0,53	C ₈ H ₈ O ₃	930
3-O-Methyl-d-glucose	-	41,3	4,8	1665	Carboidrato	2,00	C ₇ H ₁₄ O ₆	741
Coniferyl alcohol ⁷	1745	43,7	4,5	1756	Fenol	1,26	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	890
n-Hexadecanoic acid	1959	48,9	3,0	1960	Ácido	1,55	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	893
Hexadecanoic acid, ethyl ester	1992	49,7	2,9	1991	Éster	1,81	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	883
(+)-Juvabione ⁸	2017	50,6	3,7	2032	Terpenóide	0,68	C ₁₆ H ₂₆ O ₃	835
Oleic Acid	2141	53,0	3,2	2140	Ácido	1,15	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	906
Octadecanoic acid (stearic acid)	2162	53,5	3,1	2165	Ácido	0,65	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	874
Ethyl octadecenoate (ethyl stearate)	2196	54,2	3,0	2196	Éster	0,85	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	876
Methyl 7,15-Isopimaradien-18-oate	2252	55,5	4,7	2260	Terpenóide	3,33	C ₁₆ H ₁₆ O ₂	781
Methyl dehydroabietate ⁹	2378	58,1	4,4	2470	Terpenóide	1,94	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	878
Methyl abietate ¹⁰	2466	59,9	3,9	2464	Terpenóide	2,94	C ₂₀ H ₃₀ O ₅	761
Dehydroabietic acid ¹¹	2490	60,1	4,9	2384	Terpenóide	9,55	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	847
Dihydrochrisin ¹²	-	60,7	6,3	2499	Terpenóide	4,07	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	865
Methyl 15-hydroxydehydroabietate	2521	61,7	5,1	2533	Terpenóide	1,33	C ₂₁ H ₃₂ O ₂	617
Naringenin ¹³	-	62,7	6,6	2574	Terpenóide	2,38	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	834
(-)-Nortrachelogenin ¹⁴	-	75,1	6,8	-	Terpenóide	3,05	C ₂₀ H ₂₂ O ₇	806

IR_{LIT}= ÍNDICE DE RETENÇÃO ENCONTRADO NA LITERATURA; ¹t_R= TEMPO DE RETENÇÃO DA PRIMEIRA DIMENSÃO; ²t_R= TEMPO DE RETENÇÃO DA SEGUNDA DIMENSÃO; IR_{CALC}=ÍNDICE DE RETENÇÃO OBTIDO EXPERIMENTALMENTE; S= FATOR DE SIMILARIDADE ENTRE ESPECTRO DE MASSAS EXPERIMENTAIS E TEÓRICOS.

1=4-methylene-1-(1-methylethyl-bicyclo[3.1.0]hex-2-ene); **2**=[1S-(1 α ,3 α ,5 α)]-6,6-dimethyl-2-methylene-Bicyclo[3.1.1]heptan-3-ol; **3**=Bicyclo[2.2.1]heptan-2-ol, 1,7,7-trimethyl-; **4**= *p*-menth-1-en-8-ol; **5**= Bicyclo[3.1.1]hept-2-ene-2-methanol, 6,6-dimethyl-; **6**= Bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-one, 4,6,6-trimethyl-, (1S)-; **7**= Phenol, 4-(3-hydroxy-1-propenyl)-2-methoxy- ; **8**=1-Cyclohexene-1-carboxylic acid, 4-(1,5-dimethyl-3-oxohexyl)-, methyl ester, [S-(R*,R*)]-; **9**=1-Phenanthrenecarboxylic acid, 1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahydro-1,4a-dimethyl-7-(1-methylethyl)-, methyl ester, [1R-(1 α ,4a β ,10a α)]- ; **10**=1-Phenanthrenecarboxylic acid, 1,2,3,4,4a,4b,5,6,10,10a-decahydro-1,4a-dimethyl-7-(1-methylethenyl)-, methyl ester, [1R-(1 α ,4a β ,4b α ,10a α)]-; **11**=1-Phenanthrenecarboxylic acid, 1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahydro-1,4a-dimethyl-7-(1-methylethyl)-, [1R-(1 α ,4a α ,10a α)]-; **12**=4H-1-Benzopyran-4-one, 2,3-dihydro-5,7-dihydroxy-2-phenyl-, (S)-; **13**=4H-1-Benzopyran-4-one, 2,3-dihydro-5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-, (S)-; **14**=2(3H)-Furanone,dihydro-3-hydroxy-3,4-bis[(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)methyl]-(3S-cis).

ANEXO 4 – RESULTADOS DE CGXCG/TOF-MS PARA O EXTRATO ETANÓLICO DE *Eucalyptus urograndis*.



COMPOSTO	IR _{Lit}	¹ t _R (min)	² t _R (s)	IR _{Exp}	Classe	Área (%)	Fórmula	S
Acetic acid	-	7,3	2,01		Ácido	1,95	C ₂ H ₄ O ₂	849
2-Propanamine	-	11,8	2,12	834	Nitrogenado	2,13	C ₃ H ₉ N	903
2-Methoxyethanamine	-	12,1	2,49	840	Nitrogenado	2,12	C ₃ H ₉ NO	939
Glycerin	-	19,0	3,21	1005	Álcool	5,63	C ₃ H ₈ O ₃	899
(S)-2-Hydroxypropanoic acid	-	19,9	2,18	1028	Ácido	0,73	C ₃ H ₆ O ₃	943
2-methoxyphenol	1095	22,7	3,34	1098	Fenol	0,90	C ₇ H ₈ O ₂	900
Undecane	1100	22,9	2,25	1101	HC	0,58	C ₁₁ H ₂₄	904
2-Methoxy-4-vinylphenol	1326	30,9	3,52	1326	Fenol	1,10	C ₉ H ₁₀ O ₂	923
Phenol-2,6-dimethoxy	1365	32,1	3,87	1362	Fenol	1,14	C ₈ H ₁₀ O ₃	942
5-Oxotetrahydrofuran-2-carboxylic acid	-	32,5	4,36	1374	Ácido	0,91	C ₅ H ₆ O ₄	704
Vanillin	1410	33,7	4,16	1411	Fenol	1,02	C ₈ H ₈ O ₃	919
Sucrose	-	34,6	4,63	1442	Carboidrato	1,15	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	676
1,6-Anhydro-α -D-glucopyranose (levoglucosan)	1491	36,2	4,84	1494	Carboidrato	0,73	C ₆ H ₁₀ O ₅	882
1-(2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-ethanone	1470	36,3	3,77	1498	Fenol	0,88	C ₉ H ₁₀ O ₃	702
Xylitol	-	37,1	4,47	1524	Álcool	3,21	C ₅ H ₁₂ O ₅	896
1-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-propanone	1541	37,8	4,11	1546	Fenol	1,47	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	828
4-Hydroxy-3-methoxybenzoic acid	1570	38,5	4,16	1567	Fenol	0,76	C ₈ H ₈ O ₄	869
2',4'-Dimethoxyacetophenone	1586	38,7	3,95	1576	Fenol	1,37	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	735
3,4,5-trimethoxyphenol,	-	39,7	4,35	1607	Fenol	1,06	C ₉ H ₁₂ O ₄	852
4-hydroxy-3,5-dimethoxy-benzaldehyde,	-	41,5	4,56	1670	Fenol	2,17	C ₉ H ₁₀ O ₄	893
2-Tetradecen-1-ol	1713	42,7	4,28	1719	Álcool	0,80	C ₁₄ H ₂₈ O	738
4-(3-hydroxy-1-propenyl)-2-methoxyphenol (coniferyl alcohol)	1745	43,5	4,5	1750	Fenol	0,82	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	700
Syringylpropanone	1781	44,5	4,49	1787	Fenol	1,56	C ₁₁ H ₁₄ O ₄	674
1-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-ethanone	-	45,9	4,43	1845	Fenol	0,89	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	756
n-Hexadecanoic acid (palmitic acid)	1959	48,9	3	1960	Ácido	2,40	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	894
Ethyl hexadecanoate (ethyl palmitate)	1992	49,7	2,87	1991	Éster	2,00	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	874
3,5-Dimethoxy-4-hydroxycinnamaldehyde	-	49,8	4,87	1998	Fenol	1,01	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	853
(Z,Z)-9,12-Octadecadienoic acid (linoleic acid)	2140	53,0	3,28	2140	Ácido	1,38	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	845

(Z)-2-Heneicosene	2120	53,1	2,6	2146	HC	0,51	C ₂₁ H ₄₂	802
Methyl Octadecynoate	2150	53,7	3,13	2171	Éster	2,26	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	872
(E)-2-Tricosene	2308	56,5	2,72	2302	HC	0,87	C ₂₃ H ₄₆	894
7-Methyl-tricosane	2341	57,3	2,7	2342	HC	0,56	C ₂₄ H ₅₀	814
Tetracosane	2400	58,5	2,77	2402	HC	0,57	C ₂₄ H ₅₀	907
10,11-Dihydro-10-hydroxy-2,3-dimethoxydibenzoxepin	2634	63,8	6,07	2616	Álcool	1,76	C ₁₆ H ₁₆ O ₄	682
9-(Z)-Octadecenamide	2675	65,7	4,3	2697	Nitrogenado	1,83	C ₁₈ H ₃₅ NO	807
2-(Z)-Heptacosene	2720	66,5	3,71	2730	HC	0,78	C ₂₇ H ₅₄	793

IR_{LIT}= ÍNDICE DE RETENÇÃO ENCONTRADO NA LITERATURA; ¹t_R= TEMPO DE RETENÇÃO DA PRIMEIRA DIMENSÃO; ²t_R= TEMPO DE RETENÇÃO DA SEGUNDA DIMENSÃO;
 IR_{CALC}=ÍNDICE DE RETENÇÃO OBTIDO EXPERIMENTALMENTE; S= FATOR DE SIMILARIDADE ENTRE ESPECTRO DE MASSAS EXPERIMENTAIS E TEÓRICOS.