

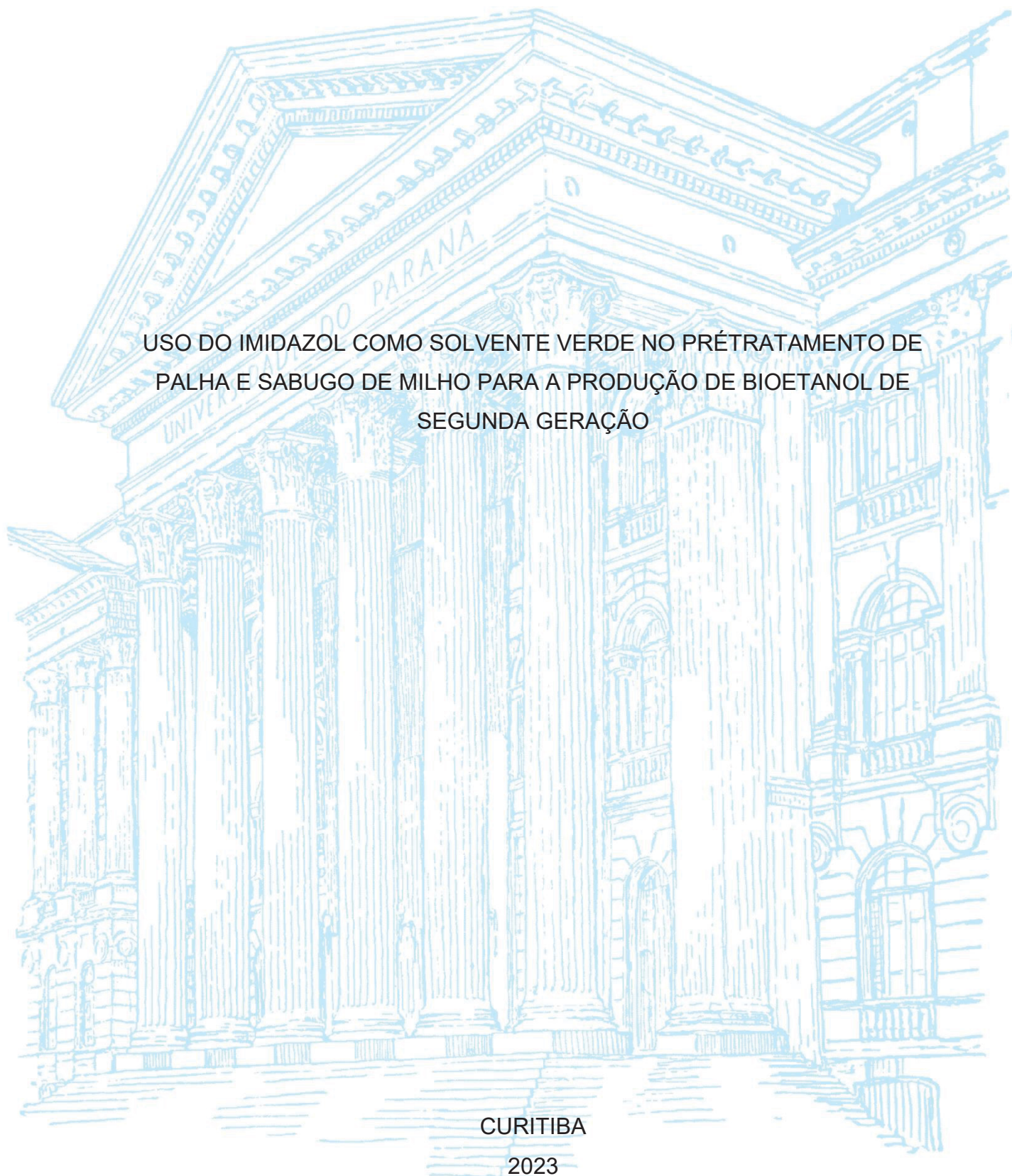
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAROLINA MENE SAVIAN

USO DO IMIDAZOL COMO SOLVENTE VERDE NO PRÉTRATAMENTO DE  
PALHA E SABUGO DE MILHO PARA A PRODUÇÃO DE BIOETANOL DE  
SEGUNDA GERAÇÃO

CURITIBA

2023



CAROLINA MENE SAVIAN

USO DO IMIDAZOL COMO SOLVENTE VERDE NO PRÉTRATAMENTO DE  
PALHA E SABUGO DE MILHO PARA A PRODUÇÃO DE BIOETANOL DE  
SEGUNDA GERAÇÃO

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador(a): Prof(a). Dra. Adenise Lorenci Woiciechowski

Coorientador(a): Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

CURITIBA

2023

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Savian, Carolina Mene

Uso do imidazol como solvente verde no pré-tratamento de palha e sabugo de milho para a produção de bioetanol de segunda geração. / Carolina Mene Savian. – Curitiba, 2023.

1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Adenise Lorenci Woiciechowski .

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol.

1. Etanol. 2. Milho. 3. Imidazóis. I. Woiciechowski, Adenise Lorenci. II. Soccol, Carlos Ricardo. III. Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. IV. Título.

Bibliotecária: Roseny Rivelini Morciani CRB-9/1585



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE TECNOLOGIA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA DE  
BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA – 40001016036P8

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **CAROLINA MENE SAVIAN** intitulada: **USO DO IMIDAZOL COMO SOLVENTE VERDE NO PRÉTRATAMENTO DE PALHA E SABUGO DE MILHO PARA A PRODUÇÃO DE BIOETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO**, sob orientação da Profa. Dra. ADENISE LORENCI WOICIECHOWSKI, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 28 de Abril de 2023.

Assinatura Eletrônica

02/05/2023 11:24:44.0

ADENISE LORENCI WOICIECHOWSKI

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

02/05/2023 11:53:03.0

ADRIANE BIANCHI PEDRONI MEDEIROS

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

02/05/2023 14:34:19.0

LUIS ALBERTO ZEVALLOS TORRES

Avaliador Externo (EXXON MOBIL CORPORATION)

Assinatura Eletrônica

04/05/2023 14:04:41.0

ARION ZANDONÁ FILHO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - PPGEQ)

Assinatura Eletrônica

08/05/2023 16:35:27.0

CARLOS RICARDO SOCCOL

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

---

Universidade Federal do Paraná- Centro Politécnico - CURITIBA - Paraná - Brasil  
CEP 81531-990 - Tel: (41) 3361-3695 - E-mail: secretaria.pb@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

---

Para Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 280622  
autenticar este documento/assinatura, acesse  
<https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 280622

Dedico essa pesquisa à minha família, que sempre me encorajou a seguir os meus sonhos.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Jovaldo Rodrigues Savian e Valéria Sena Mene Savian por sempre apoiarem, incentivarem e me guiarem em minhas decisões.

À minha irmã, Gabriela Mene Savian, por ser inspiração na forma de agir e pensar, e por sempre estar ao meu lado nos piores e melhores momentos.

Aos meus primos, por toda a paciência e por me cederem um lugar na casa e na família deles para amenizar as dificuldades dos últimos anos.

Ao meu namorado, por me incentivar e me apoiar durante a finalização dessa pesquisa.

À minha orientadora pela oportunidade e suporte nessa pesquisa.

Ao Programa de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia e a todos os professores pelo ensinamento ofertado durante todo esse período.

A todos os amigos do laboratório e da vida.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente me ajudaram durante algum momento da minha vida acadêmica.

A CAPES por fornecer a bolsa de estudos.

## RESUMO

Com o intuito de aumentar a performance de pré-tratamentos de biomassa lignocelulósica, o presente estudo foi realizado aplicando imidazol como solvente orgânico para o pré-tratamento de resíduo de biomassa lignocelulósica proveniente do processamento do milho, sendo elas o sabugo de milho (CC) e casca da espiga (CS), com foco na recuperação de celulose para a produção de etanol. O pré-tratamento foi realizado em diferentes temperaturas (120, 150 e 180°C) e tempo (30 e 60 min), com a taxa de biomassa:imidazol de 1:9 (g.g<sup>-1</sup>). Realizou-se a caracterização das alterações químicas nas biomassas após o pré-tratamento através da composição química, morfologia de superfície, nível de cristalinidade da celulose e mudanças na composição total. Os resultados mostraram que o complexo lignocelulósico apresentou alterações significativas durante o pré-tratamento com imidazol, revelado através da redução de lignina, de forma a alcançar 81,7% e 74% para CS em 180°C-60min e CC em 180°C-30min, respectivamente. A quantidade de celulose presente nos sólidos recuperados ao final do pré-tratamento foi 1,5 vezes maior que em biomassa bruta. A biomassa pré-tratada passou por hidrólise enzimática e e pré-tratamento em temperaturas elevadas (150°C e 180°C), respectivamente, alcançando rendimento de glucose de 100% para CC e 77% para CS em uma carga enzimática (Cellic CTec3<sup>®</sup>) de 15 FPU.g<sup>-1</sup> de substrato. A fermentação da glucose ocorreu através da sua metabolização por *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 usando a biomassa hidrolisada, obtendo-se rendimento o rendimento da fermentação de 82% em 12h para CC (180°C-30min) e de 66% para CS (150°C-60min).

Palavras-chave: Etanol. Casca de espiga. Sabugo de milho. Deslignificação. Imidazol

## ABSTRACT

In order to increase the performance of lignocellulosic biomass pretreatments, the present study was carried out by applying imidazole for the pretreatment of lignocellulosic biomass residue from corn, such as corn cob (CC) and corn straw (CS), focusing on the recovery of cellulose for ethanol production. The pretreatment was performed at different temperatures (120-180°C) and time (30 and 60 min), with the biomass:imidazole ratio of 1:9 (m.m<sup>-1</sup>). The chemical changes in the biomass were characterized after pretreatment through chemical composition, surface morphology, cellulose crystallinity level and changes in the total composition. The results showed that the lignocellulosic complex had significant changes during pretreatment with imidazole, revealed through lignin reduction, in order to reach 81.7% and 74% for CS in 180°C-60min and CC in 180°C-30min, respectively. The amount of cellulose in solids recovered at the end of the pretreatment was 1.5 times higher than in crude biomass. The pretreated biomass was enzymatic hydrolysate and pretreated at high temperatures (150°C and 180°C), respectively, achieving glucose yield of 100% for CC and 77% for CS at an enzymatic load (Cellic CTec3) of 15 FPU.g<sup>-1</sup> of substrate. The glucose fermentation occurred through its metabolization by *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 using the hydrolysate biomass, and was obtained a yield of 82% in 12h for CC (180°C-30min) and 66% for CS (150°C-60min).

Keywords: Ethanol.Corn Straw. Corn Cob. Delignification. Imizadole.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura Lignocelulósica .....	20
Figura 2 - Estrutura da celulose .....	21
Figura 3 - Monômeros da lignina .....	22
Figura 4 - Diagrama da hidrólise enzimática da estrutura lignocelulósica .....	27
Figura 5 - Espectros FT-IR para as biomassas CC e CS .....	38
Figura 6 - Imagens de microscopia eletrônica de biomassas de CC e CS pré-tratadas e brutas .....	41
Figura 7 - Consumo de glucose e produção de etanol .....	44
Figura 8 – Resumo do processo de produção de etanol .....	46

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química da biomassa CS pré-tratadas e não tratadas. ....	34
Tabela 2 - Composição química da biomassa de CC pré-tratada e não-tratada.....	35
Tabela 3 - Cristalinidade da celulose nas biomassas CC e CS.....	39

## LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

CS	- Casca da espiga;
CC	- Sabugo de milho;
FPU	- Filter paper unit;
HPLC	- Cromatografia Líquida de Alta Performance;
HMF	- 5-hidroximetilfurfural;
MEV	- Microscopia eletrônica de varredura;
FT-IR	- Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier;
ANOVA	- Análise de variância;
CrI	- Índice de cristalinidade;
ATR	- Attenuated Total Reflection;
XRD	- Análise de difração por raio-X;
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	- Fosfato monopotássico;
MgSO <sub>4</sub>	- Sulfato de magnésio.

## LISTA DE SÍMBOLOS

© - copyright

@ - arroba

® - marca registrada

$\Sigma$  - somatório de números

$\Pi$  - produtório de números

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
1.1 JUSTIFICATIVA .....	17
1.2 OBJETIVOS .....	17
1.2.1 Objetivo geral .....	17
1.2.2 Objetivos específicos.....	18
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>19</b>
2.1 BIOMASSA RESIDUAL LIGNOCELULÓSICA .....	19
2.1.1 Celulose .....	20
2.1.2 Hemicelulose.....	21
2.1.3 Lignina.....	21
2.2 IMIDAZOL .....	22
2.3 PRÉ-TRATAMENTOS.....	23
2.3.1 Pré-tratamento físico .....	24
2.3.2 Pré-tratamentos térmicos .....	24
2.3.3 Pré-tratamentos químicos .....	25
2.3.4 Pré-tratamentos biológicos.....	26
2.4 HIDROLISE ENZIMÁTICA .....	26
2.5 BIOETANOL.....	27
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
3.1 REAGENTES QUÍMICOS .....	29
3.2 BIOMASSA E CARACTERIZAÇÃO .....	29
3.3 PRÉ-TRATAMENTO COM IMIDAZOL.....	29
3.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA BIOMASSA PRÉ-TRATADA.....	30
3.5 FERMENTAÇÃO .....	31
3.6 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE (HPLC).....	31
3.7 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA PRÉ-TRATADA E NÃO-TRATADA.....	32
3.7.1 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) com refletância total atenuada (ATR).....	32
3.7.2 Análise de difração por raio-X (XRD) .....	32

3.7.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	32
3.7.4 Análise Estatística .....	33
<b>4 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS .....</b>	<b>34</b>
4.1 CARACTERIZAÇÃO DE SABUGO DE MILHO (CC) E CASCA DE ESPIGA (CS) 34	
4.2 EFEITOS DO PRÉ-TRATAMENTO COM IMIDAZOL NA COMPOSIÇÃO DE CC E CS 36	
4.3 ANÁLISE POR INFRAVERMELHO TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR) ..	37
4.4 ANÁLISE DE XRD.....	39
4.5 ANÁLISE POR MEV.....	40
4.6 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DAS BIOMASSAS .....	42
4.7 EFEITOS DO PRÉ-TRATAMENTO NA PRODUÇÃO DE ETANOL.....	43
4.8 RESUMO DO PROCESSO .....	45
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>46</b>
4.9 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	47
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>48</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os biocombustíveis são uma alternativa para mitigar os problemas de poluição causados pelo uso indiscriminado de combustíveis fósseis, uma vez que essas fontes de bioenergia podem ser produzidas a partir da biomassa vegetal, um recurso abundante e renovável (SOCCOL *et al.*, 2010). Até 2024, espera-se que a indústria de biocombustíveis nos EUA, França e Brasil gere mais de US\$ 950 milhões (“Global Market Insights”, 2019), e, entre as opções de energia mais limpas, o bioetanol tem a maior capacidade de produção global, além das políticas governamentais mais avançadas para a mistura de biocombustíveis com gasolina (NIPHADKAR; BAGADE; AHMED, 2018). Além disso, alguns países (por exemplo, Brasil, Índia e EUA) já haviam introduzido o bioetanol puro como alternativa à gasolina (MORALES *et al.*, 2015; SOAM *et al.*, 2016; WOJTUSIK *et al.*, 2016). Este biocombustível pode ser produzido a partir de biomassa primária ou secundária, onde o último é considerado mais sustentável, uma vez que é um recurso de baixo custo que deriva do lixo lignocelulósico e não é utilizado como alimento humano (AGOSTINHO *et al.*, 2014).

Uma quantidade expressiva de diferentes resíduos lignocelulósicos é produzida em grande parte em todo o mundo, especialmente matéria-prima de milho, como a palha e o sabugo (MORALES *et al.*, 2015; ZABED *et al.*, 2016), uma vez que este cereal é o maior produto agrícola do mundo ( $1.0 \times 10^9$  toneladas/ano) (FAO, 2019), sendo o Brasil o terceiro país a produzir mais milho no mundo ( $1.01 \times 10^8$  toneladas) (FAO, 2019).

A conversão da biomassa lignocelulósica em bioetanol consiste geralmente em três etapas: pré-tratamento, responsável pela separação da lignina, celulose e hemicelulose, e tornar a celulose acessível para o próximo passo; hidrólise, em que os polímeros de açúcar são reduzidos a monômeros; e após a hidrólise, esses monômeros são convertidos em etanol por bactérias e/ou leveduras na etapa de fermentação (SOCCOL *et al.*, 2011). O pré-tratamento é um passo crucial para produzir bioetanol a partir da biomassa lignocelulósica, uma vez que seu objetivo é a deslignificação, de modo que a estrutura da celulose pode se tornar mais acessível para a hidrólise, aumentando assim o rendimento do açúcar que pode ser fermentado em etanol (ZABED *et al.*, 2017).

O pré-tratamento pode ser realizado usando métodos físicos, químicos, físicos e biológicos, sendo que diferentes combinações desses tratamentos foram testadas para buscar o menor custo e impacto ambiental (XIMENES *et al.*, 2011). Ainda assim, as aplicações mais comuns nesta etapa são explosão de vapor com ácido diluído, tratamento de álcali e ácido diluído sequencial e tratamento alcalino (BARTOS *et al.*, 2020; HEMANSI *et al.*, 2020; RAMOS *et al.*, 2015), que são prejudiciais ao meio ambiente devido aos subprodutos gerados.

Morais De Carvalho *et al.*, (2017) propuseram o uso de imidazol, considerado um "solvente verde", no pré-tratamento de biomassa lignocelulósica, uma vez que este reagente oferece risco tóxico relativamente baixo, e alta eficiência na designificação (TAN; LEE, 2012; TAN *et al.*, 2020; USMANI *et al.*, 2020). Além disso, também apresenta baixa toxicidade (JORDAN *et al.*, 2014a). Como vantagens industriais, este solvente tem alto ponto de ebulição, e baixa pressão de vapor, o que o torna facilmente gerenciável (MORAIS *et al.*, 2016a; TOSCAN *et al.*, 2019a). No entanto, o imidazol ainda não foi testado no pré-tratamento de casca de espiga e sabugo de milho.

## 1.1 JUSTIFICATIVA

O presente estudo tem como objetivo analisar os efeitos do imidazol no pré-tratamento de sabugo de milho e casca de espiga, e a eficiência de conversão da celulose em glicose por hidrólise enzimática para produção de bioetanol. O uso desse solvente verde tem potencial para tornar esse processo mais sustentável e baixo custo em comparação com diversos outros solventes intensamente explorados.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi estudar as mudanças ocorridas na biomassa de sabugo de milho e casca da espiga separadamente ao realizar o pré-tratamento destas com aplicação de imidazol, implicando em mudanças conformacionais e remoção de compostos indesejáveis para o aumento da

capacidade de gerar açúcares fermentescíveis para posterior produção de biocombustível de segunda geração.

### 1.2.2 Objetivos específicos

- a) Estudar a influência dos pré-tratamento na casca de espiga e sabugo de milho utilizando imidazol.
- b) Caracterizar os compostos presentes nas biomassas *in natura* e pré-tratadas.
- c) Avaliar as mudanças estruturais e composicionais da biomassa após o pré-tratamento.
- d) Avaliar a capacidade de hidrolisar os açúcares presentes na matéria-prima após o pré-tratamento.
- e) Realizar a fermentação do hidrolisado que contém maior quantidade de açúcares fermentescíveis disponíveis e verificar o rendimento final.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 BIOMASSA RESIDUAL LIGNOCELULÓSICA

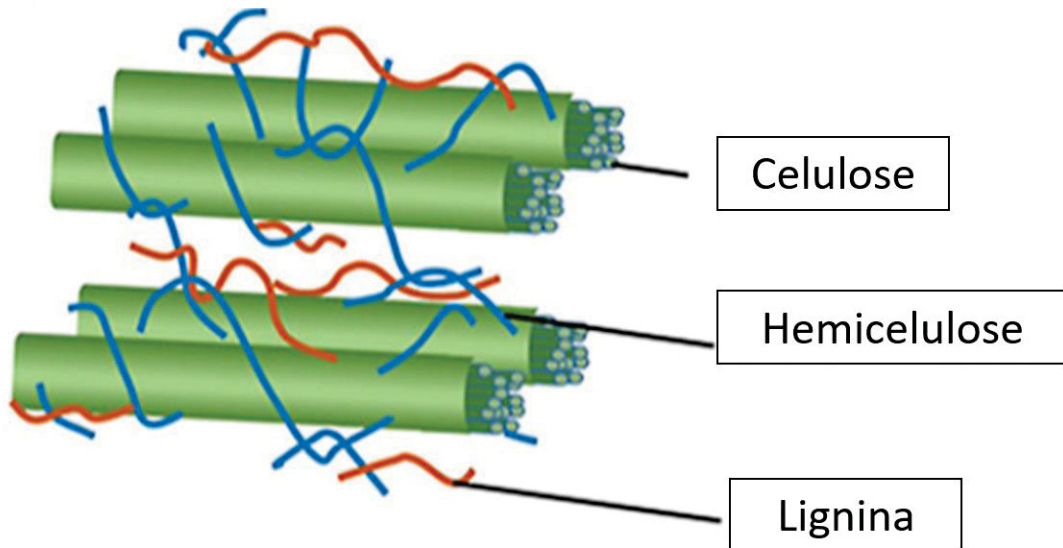
Biomassa lignocelulósica é todo material composto majoritariamente por celulose, hemicelulose e lignina, sendo sua fonte primária as plantas verdes, uma vez que 60 a 90% dos resíduos provenientes delas são utilizados em processo de extração para geração de produtos. Essa biomassa é encontrada em raiz, folhas, casca, caule e outras partes das plantas (ALALWAN; ALMINSHID; ALJAAFARI, 2019). A geração de biomassa lignocelulósica anual atinge 2 bilhões de toneladas a partir de plantas verdes. Fontes desse material podem ser classificadas em 3 tipos: o primeiro são fontes virgens, que contempla árvores, gramíneas e arbustos, devido à sua alta disponibilidade. O segundo tipo de biomassa são fontes energéticas, as quais vem revolucionando a geração de produtos energéticos como biocombustíveis (por exemplo, *Panicum virgatum* e *Miscanthus giganteus* (CRAGG *et al.*, 2015). O terceiro tipo são fontes residuais, sendo considerado subprodutos secundários ou resíduos industriais e municipais; resíduos vegetais e cereais, cascas de arvores, plantas variadas e resíduos agrícolas (KAMARAJ; RAMACHANDRAN; ARAVIND, 2020; NANDA *et al.*, 2015).

Biomassas lignocelulósicas tem se destacado como promissoras fontes de energia renovável, devido ao seu baixo custo e alta disponibilidade, além de serem consideradas uma fonte sustentável de carbono que não comprometem a alimentação humana (ASHOKKUMAR *et al.*, 2022; ULLAH *et al.*, 2015). Essas biomassas podem ser obtidas de resíduos agroindustriais e florestais, principalmente (HUANG; CHIUEH; LO, 2016), sendo produzidas globalmente cerca de 1,3 bilhões de toneladas por ano (ZOGHLAMI; PAËS, 2019).

Essa matéria-prima é composta por minerais, extrativos e um complexo de celulose (40-60%), hemicelulose (20-30%) e lignina (10-25%) (Figura 1 - Estrutura Lignocelulósica), que variam em concentração de acordo com espécie, estágio de crescimento, parte da planta, condições do ambiente, clima, entre outros. Sua estrutura polimérica se organiza de forma tridimensional e não uniforme, sendo considerada uma matriz recalcitrante, devido à cristalinidade da celulose e o seu encapsulamento sobre a matriz de lignina e hemicelulose, somada às ligações

covalentes e de hidrogênio (CAI *et al.*, 2017; LORENCI WOICIECHOWSKI *et al.*, 2020b).

**Figura 1** - Estrutura Lignocelulósica

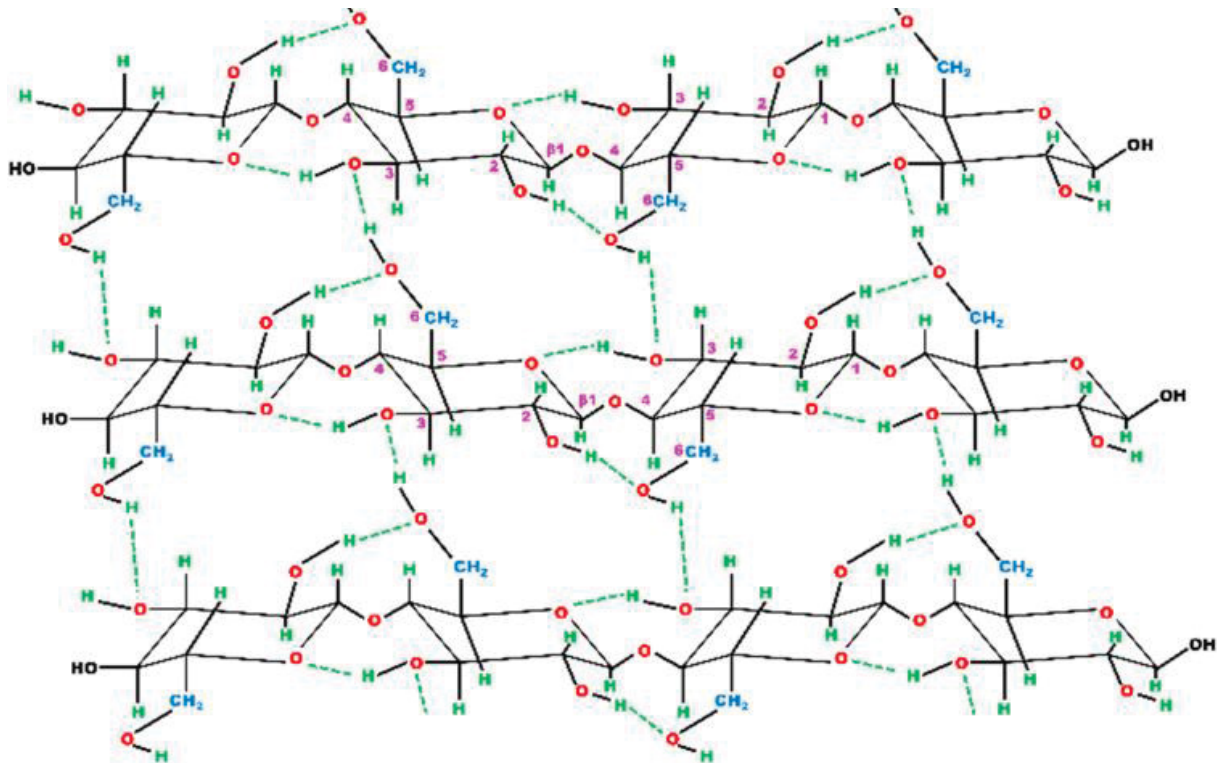


FONTE: Adaptado de WU *et al.*, (2022).

### 2.1.1 Celulose

A celulose é um homo polissacarídeo formado por moléculas de D-glucose unidas por ligações glicosídicas do tipo  $\beta(1-4)$  em conformação principalmente linear, sendo sua cadeia composta por mais de 10.000 dessas subunidades de glucose (BRANDT *et al.*, 2013). As moléculas de celulose se sobrepõem formando diversas camadas com a posição axial de grupos hidroxilas que estabilizam a estrutura, como mostrado na Figura 2, principalmente devido as ligações intra e intermoleculares de hidrogênio, formando assim, micro fibrilas que, em conjunto, formam macro fibrilas (LINDMAN; KARLSTRÖM; STIGSSON, 2010; NAGARAJAN *et al.*, 2017). Estas são majoritariamente cristalinas, apresentando algumas regiões amorfas com orientação estrutural aleatória, que contribui para a sua estabilidade termodinâmica (LORENCI WOICIECHOWSKI *et al.*, 2020a)

Figura 2 - Estrutura da celulose



FONTE: (NAGARAJAN *et al.*, 2017).

A alta estabilidade e insolubilidade da celulose são resultado da composição e propriedade anfifílica da molécula, uma vez que apresenta regiões hidrofílicas e hidrofóbicas (LINDMAN; KARLSTRÖM; STIGSSON, 2010; NAGARAJAN *et al.*, 2017).

### 2.1.2 Hemicelulose

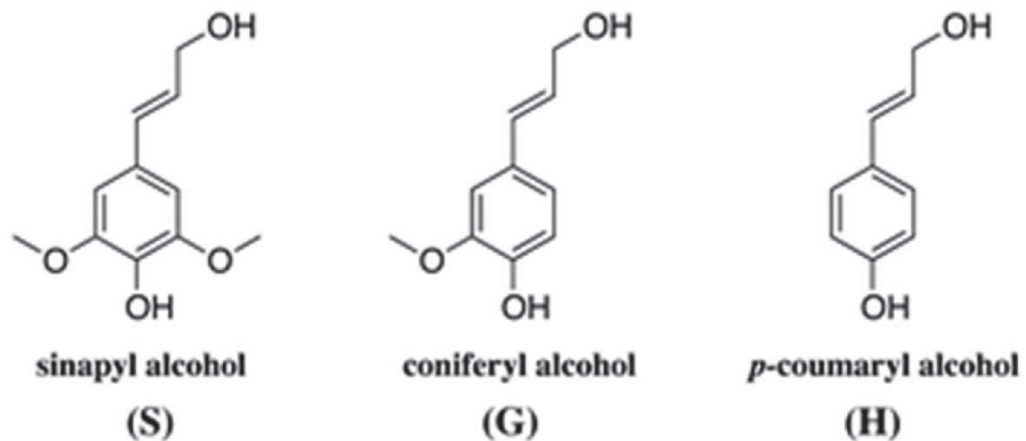
A hemicelulose é um heteropolímero amorfo e ramificado composto por diferentes subunidades de monossacarídeos, sendo estes, hexoses (glucose, manose e galactose) ou pentoses (xilose e arabiose), além de ácidos urônicos e desoxihexoses (ramnose e fucose) (CHANDEL *et al.*, 2018). A maior parte das hemiceluloses são formadas por pentoses e sua interação com a celulose gera estabilidade e flexibilidade para a matriz onde estão inseridas (BRANDT *et al.*, 2013)

### 2.1.3 Lignina

A lignina é um heteropolímero aromático amorfo, o qual apresenta como estrutura primária unidades de fenil-propano unidas por ligações C-O-C e C-C e

diferentes grupos alcoólicos e metoxílicos, sendo que os monômeros e precursores da lignina (Figura 3) são o álcool sinapílico (S), álcool coníferílico (G) e álcool *p*-cumárico (H) (PONNUSAMY *et al.*, 2019). As ligações randômicas feitas entre C-O e C-C, podem gerar ligações reativas que se tornam os principais alvos de clivagem ao se considerar a despolimerização da lignina (ZAKZESKI *et al.*, 2010).

Figura 3 - Monômeros da lignina



FONTE: STRASSBERGER; TANASE; ROTHENBERG, 2014)

A lignina é formada quando três monômeros de fenilpropano polimerizam-se. A estrutura de lignina formada quando precursor é álcool coníferílico, está presente principalmente em “madeiras leves” (softwoods), já a lignina cujo precursor é álcool *p*-cumárico, está principalmente presente em gramíneas, enquanto em “madeiras duras” (hardwoods) são encontradas as ligninas com polímeros de álcool sinapílico (NOVAES *et al.*, 2010).

Diversas técnicas e pré-tratamentos aplicados em biomassas lignocelulósicas apresentam a lignina como co-produto, e, dependendo do método utilizado, são gerados diferentes tipos de ligninas com uma variedade de aplicações, uma vez que esses pré-tratamentos podem alterar a composição, o peso molecular e a estrutura molecular desse composto. (VISHTAL; KRASLAWSKI, 2011).

## 2.2 IMIDAZOL

Imidazol é um composto heterocíclico o qual possui em sua composição três átomos de carbono e dois de nitrogênio, presentes na primeira e terceira posição de seu anel aromático, apresentando assim características polares e alta solubilidade em

água (EVJEN et al., 2018 ; VERMA; JOSHI; SINGH, 2013) Este composto é sólido e incolor em temperatura ambiente, além de apresentar ponto de fusão de 90 °C e ebulição, de 256°C, devido às ligações intermoleculares de hidrogênio presentes em sua estrutura (BAILAR, 1954). O imidazol está inserido em compostos biológicos, como biotina, aminoácidos e vitamina B12, além de ser capaz de agir como uma droga natural ou sintética, como no caso de azomycina, metronidazol e cimetidina, o que lhe confere uma ampla gama de aplicações no meio biológico e clínico, e atrai a pesquisa de áreas acadêmicas e industriais (TAINER *et al.*, 1983).

O imidazol despertou grande interesse uma vez que possui uma estrutura com comportamento anfotérico em solução, além da sua alta estabilidade térmica e baixa volatilidade. pré-tratamento (VELLÉ *et al.*, 2017). Além disso, o imidazol apresenta baixa para moderada toxicidade para diversas classes de seres vivos e sua estabilidade e baixa pressão de vapor o tornam facilmente manipulável. Outra grande vantagem a possibilidade de sua reutilização e reciclo mantendo-se eficiente (JORDAN *et al.*, 2014b; MORAIS *et al.*, 2016b)

### 2.3 PRÉ-TRATAMENTOS

Pré-tratamentos são aplicados em biomassas para a obtenção de estruturas mais acessíveis e biocompatíveis para conversões químicas afim de produzir determinados produtos, como é o caso de biocombustíveis, sendo essa etapa importante para a preparação da matéria-prima para as reações subsequentes (RAMOS; MONTEIRO; ROUBOA, 2022; WAHLSTRÖ *et al.*, 2014).

Os pré-tratamentos podem ser categorizados em diferentes técnicas, sendo as principais delas: física, físico-química, química e biológica (BEIG et al., 2021; DEVI et al., 2021; TUMULURU, 2018). Métodos físicos tem como objetivo principal, reduzir o tamanho da partícula, de forma a aumentar a superfície de contato do substrato (KUMARI; SINGH, 2018; MEDIIVILLA *et al.*, 2017), enquanto os pré-tratamentos físico-químicos são capazes de alterar a composição da biomassa, como no caso da utilização de explosão a vapor, oxidação úmida e hidrólise (ZHENG *et al.*, 2014). Em contrapartida, tratamentos químicos usam solventes orgânicos e inorgânicos, e outros químicos que reagem com as estruturas da matéria prima (USMANI *et al.*, 2020b). Já os pré-tratamentos biológicos envolvem microrganismos e enzimas produzidas por estes para a degradação das estruturas da biomassa (HALDER et al., 2019).

### 2.3.1 Pré-tratamento físico

Pré-tratamentos físicos de biomassa lignocelulósica podem envolver vibração ultrassônica, moagem de bolas, entre outros; que são capazes de aumentar a área de superfície de contato do substrato para facilitar a acessibilidade enzimática às ligações químicas, além de aumentar também a transferência de calor (DAHUNSI, 2019; VIDAL *et al.*, 2011). Dentre os instrumentos utilizados nesse pré-tratamento estão moinho de corte e de martelo, moinho de rotor e moinho de bolas, (CHUNDAWAT; VENKATESH; DALE, 2007; NASIRPOUR; MOUSAVI, 2021; ROJAS-REJÓN; SÁNCHEZ, 2014; SOUZA-CORRÊA *et al.*, 2014) sendo esse último capaz de acetilar compostos lignocelulósicos e despolimerizar a hemicelulose (LU; RALPH, 2003; SIPPONEN; LAAKSO; BAUMBERGER, 2014).

Em pré-tratamentos aplicando ultrassom, ondas mecânicas são capazes de reduzir a viscosidade da celulose e aumentar a energia de ativação da solução de forma a facilitar a ação de enzimas posteriormente (NAKAYAMA *et al.*, 2020).

Em uma combinação de tratamento termo mecânico, o processo de explosão a vapor é amplamente aplicado a fim de converter a energia interna do vapor em energia mecânica. Dessa forma, a explosão à vapor hidrolisa ligações glicosídicas da hemicelulose, extraindo-a com facilidade, porém, gerando ácidos orgânicos de grupos acetil associados à hemicelulose, os quais afetam negativamente o metabolismo de microrganismos importantes nas etapas subsequentes (DENG *et al.*, 2020; MORENO *et al.*, 2013).

A combinação de um catalisador químico com a explosão à vapor têm apresentado aumento de rendimento da liberação de carboidratos de forma a reduzir a degradação de açúcar (WANG *et al.*, 2016). Na maioria dos casos, a explosão à vapor acontece primeiro, a fim de remover a celulose, seguida de um pré-tratamento alcalino para remoção a lignina e hemicelulose residual aplicando CaO ou líquidos verdes (DENG *et al.*, 2020; GAO *et al.*, 2021).

### 2.3.2 Pré-tratamentos térmicos

Ao aquecer a biomassa lignocelulósica em tratamentos térmicos, há o aumento de lignina insolúvel e solúvel em ácido ao mesmo tempo que reduz-se a concentração de hemicelulose. (LIU *et al.*, 2017; VELUCHAMY; KALAMDHAD, 2017).

A torrefação da biomassa é um processo realizado em temperaturas entre 230 °C e 300 °C, que pode acontecer em pressão atmosférica, alta pressão, atmosfera com oxigenação ou com água quente pressurizada (ELGARAHY *et al.*, 2021), gerando perda de aproximadamente 30% de massa devido à volatilização e umidificação da matéria. Em contrapartida, esse método aumenta o valor energético da biomassa, bem como sua hidrofobicidade, resistência contra fungos, resistência à biodegradação e durabilidade (ACHARYA; DUTTA, 2013; TUMULURU, 2018). A temperatura e o tempo de duração do processo são os fatores mais influentes nesse pré-tratamento (SHANKAR TUMULURU, 2018).

Processos hidrotérmicos ocorrem em temperaturas entre 250 °C e 375 °C, pressão de 4 MPa à 22 MPa, sendo capazes de quebrar frações sólidas da biomassa, resultando em produtos altamente energéticos e outros químicos. Este tratamento tem como vantagem a capacidade de utilizar matéria-prima com alta umidade, excluindo a necessidade de uma etapa de pré-secagem (KUMAR; OLAJIRE OYEDUN; KUMAR, 2018). (ELGARAHY *et al.*, 2021; LACHOS-PEREZ *et al.*, 2022).

### 2.3.3 Pré-tratamentos químicos

Os pré-tratamentos químicos são amplamente utilizados para degradar biomassas lignocelulósicas, sendo que ácidos são capazes de solubilizar hemicelulose e convertê-la em açúcar fermentescível. Porém, a aplicação de ácidos concentrados gera compostos indesejáveis para o processo, pois são inibidores da fermentação, como aldeídos, ácidos fenólicos, e hidroximetilfurfural (HMF) (RAJAN; CARRIER, 2014). Em contrapartida, ácidos diluídos apresentam uma taxa de reação mais rápida, permitindo que o processamento da biomassa ocorra de forma ininterrupta (LANCEFIELD *et al.*, 2017), mas requerem reatores resistentes à corrosão, tornando-se inviável economicamente à longo prazo (KUMAR *et al.*, 2018).

Já tratamentos químicos alcalinos, como potássio, sódio, cálcio e amônia, têm a capacidade de remover lignina quando aplicados em pH alto devido à sua ação em ligações químicas glicosídicas e de éster. (KIM *et al.*, 2016). Além disso, esse tratamento também auxilia no processo de desacetilação e remoção de ácido urônico presente na hemicelulose, o que a digestibilidade da celulose pelas enzimas (REILLY; DINSDALE; GUWY, 2015).

### 2.3.4 Pré-tratamentos biológicos

Pré-tratamentos biológicos são considerados seguros e sustentáveis, uma vez que não necessita do uso de reagentes químicos e pouca energia é aplicada para ocorrer a conversão da biomassa lignocelulósica. Entretanto, a taxa de hidrólise ocorre de forma lenta em comparação com os outros tratamentos citados (TAYYAB, 2018).

Dentre os microrganismos utilizados para a degradação de compostos lignocelulósicos estão fungos e bactérias. Fungos pardos é capaz de degradar celulose enquanto fungos brancos, por exemplo degradam celulose e hemicelulose (MANAVALAN; MANAVALAN; HEESE, 2015) e a quebra dessas estruturas dependem de enzimas hidrolíticas e ligninolíticas produzidas por esses fungos (SHARMA; XU; QIN, 2019). Em pré-tratamento de resíduo de algodão e papelão, aplicando o fungo *Paecilomyces inflatus* foi obtido após 14 dias, 76% de degradação de lignina e 25% de degradação de hemicelulose, tendo assim 58% de conversão de celulose e 51 g/L de rendimento de bioetanol (RAMAMOORTHY; T R; SAHADEVAN, 2020).

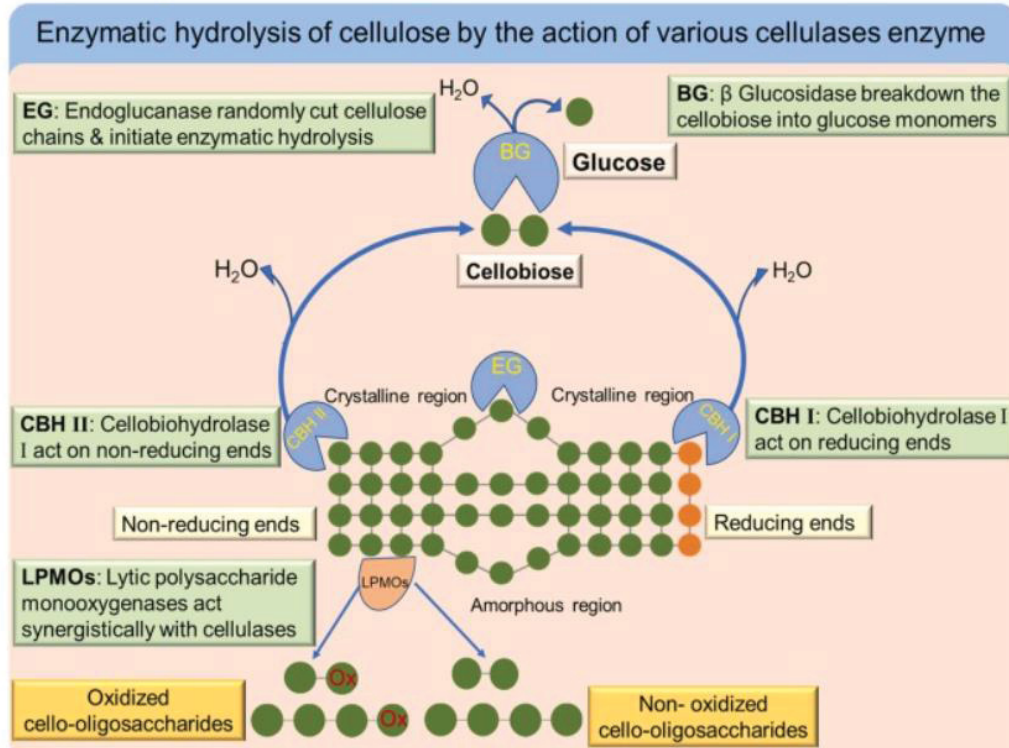
## 2.4 HIDROLISE ENZIMÁTICA

A hidrólise ocorre quando as ligações glicosídicas presentes na celulose são quebradas em cadeias de 5 carbonos (C5) e 6 carbonos (C6) (ABO *et al.*, 2019). A hidrólise química tem sido cada vez menos aplicada devido aos altos custos de reagentes e pela formação de subprodutos indesejáveis que podem reduzir o rendimento do processo, como o furfuraldeído, fazendo necessário assim a aplicação de mais etapas para a purificação do produto. Portanto, o uso de enzimas tem sido amplamente aplicado para a hidrólise da celulose a fim de aumentar a eficiência da fermentação (TAYYAB, 2018). Dessa forma, diversas espécies de fungos e bactérias, como *Trichoderma*, *Sclerotium rolfsii*, *Aspergillus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Schizophyllum*, e *Penicillium* são capazes de produzir essas enzimas de interesse (ANDLAR *et al.*, 2018).

A hidrólise de celulose compreende três grupos principais de celulases que são categorizadas de acordo com a sua ação na molécula visada (WANG; LU, 2016). As endoglucanases agem em ligações internas de regiões amorfas de forma aleatória, reduzindo o grau de polimerização da celulose e iniciando a hidrólise enzimática (ANDLAR *et al.*, 2018). Já as celobiohidrolases I (CHB) e celobiohidrolases II

produzem celobiose a partir da extremidades redutoras das cadeias e extremidades não-redutoras da cadeia, respectivamente. Então ocorre a ação da das  $\beta$ -glucosidades (BG) hidrolisando a glucose como na Figura 4. Quando imobilizadas, as enzimas têm maior eficácia para hidrolisar a cadeia celulósica (ZANUSO *et al.*, 2021).

Figura 4 - Diagrama da hidrólise enzimática da estrutura lignocelulósica



ADAPTADO DE: (MALIK *et al.*, 2022)

## 2.5 BIOETANOL

Existem algumas variedades do etanol geradas de diferentes matérias-primas, sendo a primeira delas proveniente de fontes de alimentos (principalmente amido e sacarose), conhecido como bioetanol de primeira geração (1G). Além do 1G, há o bioetanol lignocelulósico (2G), o qual tem tido destaque desde a década de 1970, com aumento de investimentos em diversos países a fim de viabilizar sua monetização em mercado de combustíveis fósseis e bioetanol 1G (BROWN; HAWKINS; DORAN-PETERSON, 2017).

Em escala global, a produção de etanol se dá principalmente utilizando milho como matéria prima nos EUA, cana-de-açúcar no Brasil, trigo na Europa e mandioca na Tailândia e Nigéria (MUKTHAM *et al.*, 2016). Porém, essas matérias-primas não apresentam viabilidade comercial quanto a longo prazo, pois afetam diretamente a cadeia alimentícia (PUROHIT; DHAR, 2018). Portanto, o bioetanol 2G tem sido

considerado uma alternativa para suprir demandas globais, uma vez que há maior abundância de matéria-prima e esta provém de resíduos lignocelulósicos não alimentícios (PUROHIT; DHAR, 2018), como resíduos florestais, de processamentos agrícolas, de colheitas, entre outros. Estes resíduos apresentam baixa pegada de carbono e consistem em uma faixa de 40-50% de celulose, 25-35% de hemicelulose e 15-20% de lignina, além de pectinas, proteínas, cinzas, lipídios e minerais (ALTHURI; GUJJALA; BANERJEE, 2017).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 REAGENTES QUÍMICOS

O imidazol utilizado apresentou 99% de pureza. Como padrões químicos, utilizou-se *D*-(+)-glucose (>99%), *D*-(+)-manose (>99%), *D*-(+)-galactose (>99%), *D*-(+)-celobiose, *D*-(+)-xilose (>99%) e ácido acético (>99%) de Sigma-Aldrich (EUA). Todos os reagentes aplicados foram de cromatografia de alta performance e alto grau de reagente analítico.

#### 3.2 BIOMASSA E CARACTERIZAÇÃO

A matéria-prima de milho, originada da Fazenda Boa Esperança, Borrazópolis – PR foi separada em espigas de milho (sem grão) (CC) e casca de espiga (CS). As biomassas foram secas em estufa de circulação de ar a 65°C por 48 h e moídas em moinho de facas (Marconi, MA580/E). O tamanho de partícula utilizado em todos os experimentos foi entre as peneiras ASTM nº 20 (0,85 mm) e ASTM nº 45 (0,35 mm) (Bertel, BT-001).

A análise da composição estrutural foi realizada em biomassas brutas e após cada pré-tratamento. Carboidratos estruturais, lignina insolúvel em ácido (AIL), lignina solúvel em ácido (ASL), extrativos, cinzas e teores sólidos foram determinados de acordo com o National Renewable Energy Laboratory (NREL) (SLUITER *et al.*, 2008b, 2008c, 2008a, 2012).

#### 3.3 PRÉ-TRATAMENTO COM IMIDAZOL

O pré-tratamento com CS e CC foi baseado na metodologia descrita por Valladares-Diestra *et al.* (2023) e Sayury Nishida *et al.* (2021), na qual o imidazol foi utilizado como solvente verde para deslignificação de biomassa lignocelulósica.

Experimentos de pré-tratamento foram conduzidos com 5 gramas de biomassa seca (CS e CC) em um reator de aço inoxidável (150 mL) (Parr, EUA) com agitação mecânica na proporção de biomassa 1:9: imidazol (g·g<sup>-1</sup>). A reação foi realizada em três temperaturas diferentes (120°C, 150°C e 180°C) e dois tempos de reação (60 min e 30 min) para cada biomassa.

Após os pré-tratamentos, adicionou-se água deionizada igual ao dobro da massa de imidazol, as quais foram homogeneizadas por 1 h. A fração sólida foi separada por filtração a vácuo e três volumes de etanol 96% (v.v<sup>-1</sup>) foram adicionados

à fração líquida para a recuperação da hemicelulose por precipitação. Subsequentemente, a fração sólida, contendo principalmente celulose, foi lavada com etanol a 96% (v.v<sup>-1</sup>) em filtro a vácuo, enquanto a fração líquida, rica em imidazol, foi armazenada para análise futura (não apresentadas nesse trabalho).

Ao final de cada pré-tratamento, a fração rica em celulose recuperada foi seca em estufa de circulação de ar a 45°C para ser submetida à hidrólise enzimática. Além disso, as biomassas pré-tratadas foram avaliadas quanto à composição estrutural por composição química, análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV), difração de raio-X e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR).

### 3.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA BIOMASSA PRÉ-TRATADA

A hidrólise enzimática das biomassas pré-tratadas foi realizada em frascos Erlenmeyers de 100 mL. Cada biomassa pré-tratada e sua condição de pré-tratamento foi adicionada em 5% m·v<sup>-1</sup> (peso seco) com 10 mL de solução tampão de acetato de sódio (0,05 M; pH 5,2) e celulase (carga enzimática de 15 FPU·g<sup>-1</sup>) - Cellic CTec3 HS® (Novozymes – Araucária, Brasil).

O meio de reação foi incubado em agitador orbital a 50°C por 48 h a 150 rpm, e as amostras coletadas foram aquecidas até 95°C por 10 min para inativação enzimática. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) determinou a liberação do teor de açúcar. O experimento foi duplicado e a biomassa não pré-tratada (CC e CS) foi testada para comparação. Os hidrolisados obtidos foram utilizados no processo de fermentação.

O rendimento de glucose das biomassas não-tratadas e pré-tratadas foi calculado usando a (Eq. 1).

$$\text{Rendimento de Glucose convertida (\%)} = \frac{[\text{Glu}] \cdot V}{m_{\text{biomassa}} \cdot f \cdot 1.11} \cdot 100$$

(Eq. 1)

onde [Glu] é a concentração de glicose em g.L<sup>-1</sup> no hidrolisado observado por HPLC, V é o volume em L do hidrolisado; biomassa, se o peso da biomassa seca (g); f é a fração de glucana na biomassa; 1.11 é o fator de conversão de glucana em glucose.

### 3.5 FERMENTAÇÃO

*Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 foi mantida em caldo YM (composição (% w.v<sup>-1</sup>): glicose (1); peptona (0,5); ágar (1,5); extrato de levedura (0,3); extrato de malte (0,3)). O pré-crescimento ocorreu em estufa microbiológica a 35°C por 24 h e após inoculação em 20 mL de meio de cultivo YM (sem ágar) por 24 h, 150 rpm e 35°C.

A fermentação foi realizada em frascos Erlenmeyer (125 mL) onde os hidrolisados obtidos conforme descrito em 3.4 foram submetidos ao processo de fermentação após suplementação por (composição (g.L<sup>-1</sup>): peptona (5); extrato de levedura (5); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2); MgSO<sub>4</sub> (1)), o pH da mistura foi de aproximadamente 5,5. Posteriormente, os hidrolisados foram esterilizados a 121°C por 15 min. A inoculação foi realizada com inóculo a 10% (v.v<sup>-1</sup>) da levedura *S. cerevisiae* CAT-1. Os ensaios foram incubados em estufa bacteriológica a 35°C por 48 h. As amostras foram coletadas a cada 0, 3, 6 e 12 h por até 48 h e centrifugadas a 10.000 rpm por 15 min a 25°C. O teor de etanol e o consumo de açúcar foram estimados nas amostras por HPLC.

O rendimento teórico do etanol foi calculado de acordo com a (Eq 2).

$$\text{Rendimento de etanol (\%)} = \frac{[\text{Etanol}]}{0.511 \cdot ([\text{Glu}_i] - [\text{Glu}_r])} \cdot 100$$

(Eq 2)

onde [Etanol] é a concentração de etanol produzida pela fermentação, 0,511 é o fator de conversão de glicose em etanol, e [Glu<sub>i</sub>] e [Glu<sub>r</sub>] são as concentrações iniciais e residuais de glicose na fermentação, respectivamente.

### 3.6 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE (HPLC)

Açúcares, ácidos orgânicos e etanol foram quantificados por HPLC (cromatógrafo Shimadzu) equipado com detector de índice de refração, operado com coluna Aminex Bio-Rad HPX-87H utilizando uma fase móvel de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,005 mol. L<sup>-1</sup> com vazão de 0,6 mL.min<sup>-1</sup>. As amostras foram adequadamente diluídas e filtradas com filtro de 0,22 µm de tamanho de poro (Millipore Corp., Billerica, MA, EUA) e injetados 10 µL no HPLC. A concentração de cada composto foi determinada por curvas de calibração utilizando reagentes cromatográficos padrão para HPLC.

### 3.7 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA PRÉ-TRATADA E NÃO-TRATADA E NÃO-TRATADA

#### 3.7.1 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) com refletância total atenuada (ATR)

As análises FT-IR foram realizadas em CC e CS pré-tratadas e não pré-tratadas para investigar e determinar alterações químicas nessas biomassas. Generosamente cedido pela Central Analítica do Departamento de Química da UFPR, a espectroscopia FT-IR (4000-400  $\text{cm}^{-1}$ ) foi realizada em espectrômetro VERTEX 70 (Bruker) em modo Attenuated Total Reflection (ATR) para observar as mudanças dos grupos funcionais presentes nas biomassas CC e CS. As amostras foram escaneadas 128 vezes com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 3.7.2 Análise de difração por raio-X (XRD)

A cristalinidade da biomassa foi analisada em difratômetro de raio-X no Laboratório de Óptica de Raios X do Departamento de Física da UFPR através de análises de difração por raio-X, sendo a fonte de raios-X o Ni filtrado Cu kappa ( $\text{CuK}\alpha$ ,  $\lambda=1,5418 \text{ \AA}$ ). As análises de XRD foram realizadas em CC e CS pré-tratados e não pré-tratados e a varredura das amostras foi realizada na faixa de  $2\theta$  de  $10^\circ$ -  $30^\circ$  a uma taxa de  $2^\circ \cdot \text{min}^{-1}$ . O gerador utilizado foi operado a 40 kV e 20 mA. O índice de cristalinidade (CrI) foi calculado de acordo com a (Eq 3).

$$\text{CrI} = \frac{I_c - I_a}{I_c} \cdot 100$$

(Eq 3)

onde  $I_c$  é o pico de intensidade no seu máximo de  $2\theta$  a  $22^\circ$ , e  $I_a$  é o pico de intensidade no seu mínimo de  $2\theta$  em torno de  $16^\circ$ .

#### 3.7.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise de MEV foi realizada no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFPR, em biomassas não tratadas e pré-tratadas para observar alterações ultra estruturais. As amostras foram revestidas com uma camada de ouro em câmara de vácuo e fotografadas em um Jeol JSM 6360-LV (Oxford Instruments) com resolução de 3nm, operadas com microscópio eletrônico de varredura a 15 kV. As biomassas foram secas a  $65^\circ\text{C}$  por 24 h e analisadas em bases de alumínio.

#### 3.7.4 Análise Estatística

Os resultados obtidos a partir da hidrólise enzimática foram avaliados estatisticamente por meio da análise de variância (ANOVA), e o teste de Tukey foi aplicado para comparação das diferenças entre as médias a um nível de confiança de 95%. As análises estatísticas foram realizadas no software STATISTIC 7.

## 4 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DE SABUGO DE MILHO (CC) E CASCA DE ESPIGA (CS)

Os resíduos utilizados neste estudo são derivados do cultivo de milho, portanto, considerando que diferentes fatores (solo, água, nutrientes, etc.) podem afetar as características da biomassa, foram conduzidos experimentos que determinam a composição macromolecular das biomassas CC e CS. A composição química é apresentada nas Tabela 1 e Tabela 2

Tabela 1 - Composição química da biomassa CS pré-tratadas e não tratadas secas nas condições testadas (unidade de medida \*).

Condições de Reação	Biomassa não tratada	Biomassa Pré-tratada					
		CS <sub>180-60</sub>	CS <sub>180-30</sub>	CS <sub>150-60</sub>	CS <sub>150-30</sub>	CS <sub>120-60</sub>	CS <sub>120-30</sub>
T (°C)	-	180	180	150	150	120	120
Tempo (min)	-	60	30	60	30	60	30
<b>Rendimento sólido (% massa)</b>	100	56.16	45.38	59.63	64.34	75.76	80.09
<b>Composição (% massa)</b>							
Anhydro glucose	31.54 ± 0.67	46.63 ± 2.63	48.18 ± 3.36	48.31 ± 2.26	37.49 ± 0.24	39.68 ± 1.30	33.95 ± 1.00
Anhydro xilose	16.01 ± 0.86	14.72 ± 0.48	13.17 ± 1.66	14.42 ± 1.00	12.65 ± 0.05	14.32 ± 1.32	14.37 ± 0.45
Anhydro arabinose	2.00 ± 0.10	2.27 ± 1.19	1.07 ± 0.02	1.97 ± 0.23	1.74 ± 0.08	2.22 ± 0.23	2.24 ± 0.20
Acetil grupo	4.04 ± 0.08	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Lignina Ácido-Insolúvel	24.23 ± 0.57	2.71 ± 0.08	6.11 ± 0.10	6.53 ± 1.19	27.49 ± 2.51	12.40 ± 1.12	8.07 ± 1.18
Lignina Ácido-solúvel	1.73 ± 0.18	2.10 ± 0.37	1.87 ± 0.38	2.23 ± 0.61	2.21 ± 0.16	2.79 ± 0.66	2.32 ± 0.61
HMF	0.04 ± 0.02	0.19 ± 0.03	0.22 ± 0.05	0.22 ± 0.03	0.16 ± 0.09	0.13 ± 0.05	0.05 ± 0.01
Furfural	0.54 ± 0.32	0.05 ± 0.02	0.02 ± 0.02	0.08 ± 0.04	0.09 ± 0.03	0.09 ± 0.02	0.08 ± 0.02

FONTE: O autor (2022).

Tabela 2 - Composição química da biomassa de CC pré-tratada e não-tratada nas condições testadas

Condições de Reação	Biomassa não-tratada	Biomassa pré-tratada					
		CC <sub>180-60</sub>	CC <sub>180-30</sub>	CC <sub>150-60</sub>	CC <sub>150-30</sub>	CC <sub>120-60</sub>	CC <sub>120-30</sub>
T (°C)	-	180	180	150	150	120	120
Tempo (min)	-	60	30	60	30	60	30
<b>Rendimento sólido (% massa)</b>	100	58.97	53.06	76.31	78.47	64.62	85.97
<b>Composição (% massa)</b>							
Anidro glucose	30.57 ± 0.97	44.76 ± 1.38	48.38 ± 1.13	36.23 ± 0.45	43.50 ± 0.80	27.82 ± 2.09	36.7 ± 0.89
Anidro xilose	18.04 ± 0.63	17.46 ± 1.50	19.60 ± 0.8	15.99 ± 0.83	22.08 ± 0.94	14.47 ± 0.88	19.37 ± 0.85
Anidro arabinose	2.22 ± 0.19	1.56 ± 0.15	2.00 ± 0.16	2.07 ± 0.80	1.81 ± 0.09	2.74 ± 0.43	0.35 ± 0.71
Acetil grupo	3.91 ± 0.39	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Lignina Ácido-Insolúvel	23.97 ± 0.81	6.4 ± 2.11	4.24 ± 1.50	17.45 ± 1.24	14.86 ± 1.79	8.31 ± 0.50	11.98 ± 0.84
Lignina Ácido-solúvel	1.91 ± 0.55	4.23 ± 0.36	2.35 ± 0.35	5.76 ± 0.49	3.39 ± 0.25	5.76 ± 0.49	3.14 ± 0.13
HMF	0.05 ± 0.00	0.5 ± 0.06	0.35 ± 0.024	0.41 ± 0.06	0.15 ± 0.01	0.24 ± 0.18	0.07 ± 0.02
Furfural	0.73 ± 0.06	0.24 ± 0.02	0.10 ± 0.02	0.23 ± 0.01	0.10 ± 0.03	0.16 ± 0.09	0.13 ± 0.06

FONTE: O autor (2022).

A composição de CC e CS em base seca foi de 30,57% e 31,54% celulose, 24,17% e 22,05% hemicelulose, 25,88% e 25,96% de lignina, 7,77% e 11,06% de extrativos e 2,34% e 3,96% de cinzas, respectivamente. A composição das biomassas

brutas está de acordo com outros trabalhos realizados com CS e CC (G. DEL RÍO *et al.*, 2020; OUYANG, 2018; THAKKAR *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2022).

#### 4.2 EFEITOS DO PRÉ-TRATAMENTO COM IMIDAZOL NA COMPOSIÇÃO DE CC E CS

Para avaliar a eficiência do fracionamento das biomassas de CC e CS ao realizar pré-tratamentos com imidazol, as alterações nas composições químicas foram examinadas após as seis diferentes condições de pré-tratamento para cada biomassa a fim de maximizar a biodisponibilidade de celulose, recuperação sólida e deslignificação. As condições de pré-tratamento variaram de 120°C a 180°C, em tempos de exposição de 30 a 60 min. As Tabela 1 e Tabela 2 mostram as alterações nas composições químicas das biomassas CC e CS após o pré-tratamento com imidazol.

A Tabela 1 mostra que o CS<sub>120-30</sub> apresentou o maior rendimento de recuperação sólida (80,09%), seguido pelo CS<sub>120-60</sub> (75,76%). Ao mesmo tempo, diminui quando exposto a condições mais severas. O resultado obtido a 180°C por 30 min (45,38%) mostra que a severidade do pré-tratamento pode estar associada à degradação estrutural da biomassa (PEREIRA *et al.*, 2021; VALLADARES-DIESTRA *et al.*, 2021). Em comparação com a CS, a CC pré-tratada também apresentou a maior porcentagem de recuperação de sólidos quando em condições mais brandas; uma vez que 85,97% dos sólidos foram obtidos em CC<sub>120-30</sub>, e apenas 58,97% foram recuperados em CC<sub>180-60</sub>, como mostra a Tabela 2. Isto ocorreu provavelmente devido à exposição da estrutura de biomassa à altas temperaturas e ao imidazol, o que poderia iniciar o processo de quebra das macromoléculas da estrutura de biomassa e, conseqüente, redução de sólidos.

Nota-se que a redução de sólidos após o pré-tratamento não afetou significativamente ( $p \leq 0,05$ ) o teor de celulose, uma vez que a maior porcentagem de glucose anidra foi obtida em condições mais severas a 150°C e 60 min (48,31%) e 180°C e 30 min (48,18%) para CS, e 180°C a 60 min (44,76%) e 30 min (48,38%) para CC. O aumento da temperatura (180°C) aumentou o teor de celulose no sólido recuperado em 1,5 vezes em relação às biomassas brutas (Tabelas Tabela 1 e Tabela 2).

O teor de lignina diminuiu à medida que aumentaram as condições de severidade dos pré-tratamentos. A redução do teor de lignina no sólido pode estar fortemente associada ao aumento do teor de celulose, uma vez que a celulose é

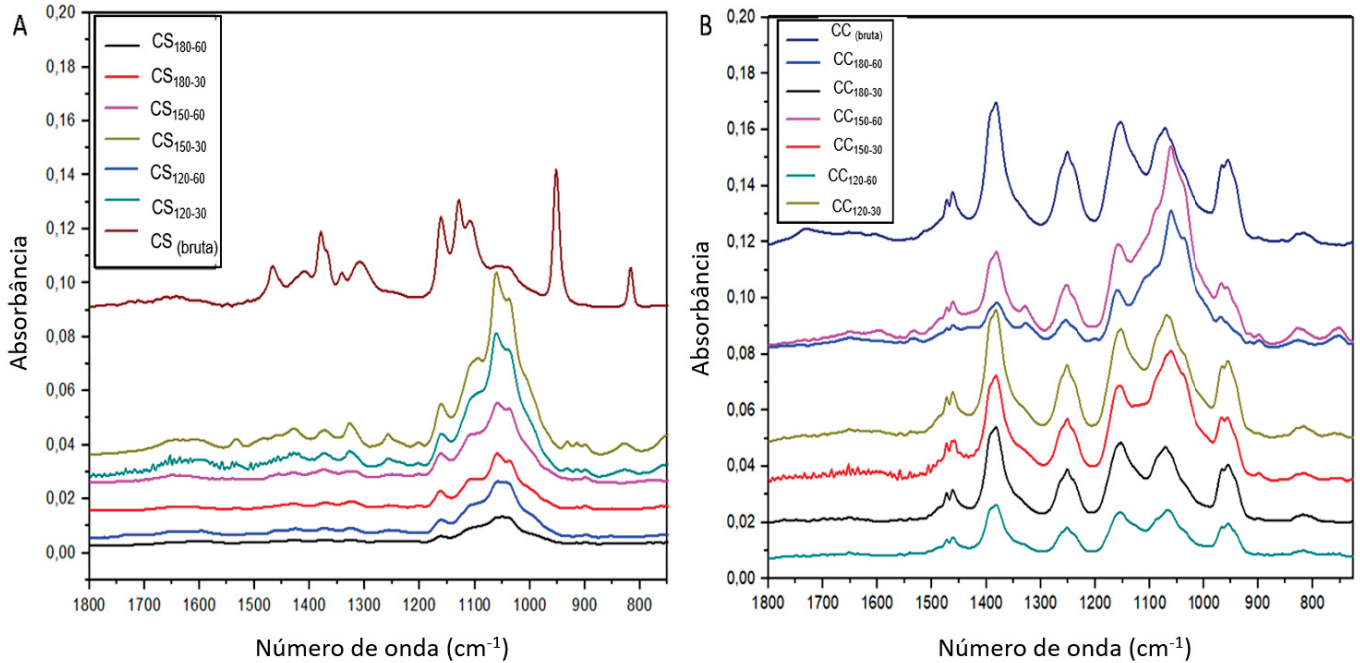
polimerizada e intensamente recoberta pela lignina (TREICHEL *et al.*, 2020). Altas temperaturas de pré-tratamento resultaram em maior deslignificação das biomassas, dessa forma, a quantidade de lignina foi melhor removida em condições severas de temperatura aplicadas em ambas as biomassas, atingindo até 81,47% quando o CS foi aquecido a 180°C por 60 min (Tabela 1) e 74% quando o CC foi aquecido a 180°C por 30 min (Tabela 2), principalmente pela intensificação da solubilização da lignina insolúvel em temperaturas mais elevadas (150 e 180°C). A alta basicidade do imidazol associada a altas temperaturas pode influenciar significativamente a alta eficiência de deslignificação obtida para as biomassas CC e CS.

Em ambas as biomassas, em relação à recuperação de sólidos, teor de celulose e deslignificação, as condições de temperatura foram mais relevantes do que o tempo associado ao pré-tratamento com imidazol. Outros autores também observaram o efeito dominante da temperatura no pré-tratamento com imidazol de biomassas lignocelulósicas como palha de trigo, bagaço de cana-de-açúcar e capim-elefante (MORAIS *et al.*, 2016c; NISHIDA *et al.*, 2023; TOSCAN *et al.*, 2019b; VALLADARES-DIESTRA *et al.*, 2021). No bagaço da cana-de-açúcar, temperaturas mais elevadas (160°C) associadas ao pré-tratamento com imidazol também promoveram maiores eficiências de deslignificação da biomassa e aumentaram em 1,7 vezes a quantidade de celulose nos sólidos recuperados (VALLADARES-DIESTRA *et al.*, 2021). Em contrapartida, Pereira *et al.*, (2021), observaram que na biomassa residual de *Cupressus lusitanica* (folhas, cones e ramos) pré-tratada com imidazol; a temperatura tem um efeito dominante na recuperação de sólidos e, ainda assim, não havia influência significativa na composição macromolecular (nem a variável tempo), o que pode ser uma característica do projeto estrutural de biomassas de madeira.

#### 4.3 ANÁLISE POR INFRAVERMELHO TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR)

Alterações nas estruturas químicas das biomassas foram avaliadas pela análise FT-IR com base na intensidade de bandas características de grupos funcionais associadas à celulose, hemicelulose e lignina, principalmente em comprimentos de onda inferiores a 2000 cm<sup>-1</sup> (RÍOS-GONZÁLEZ *et al.*, 2021a; SUN; DING; YIN, 2022). A Figura 5 mostra os espectros FT-IR para as biomassas CC e CS.

Figura 5 - Espectros FT-IR para as biomassas CC e CS.



FONTE: O autor (2022).

As bandas de cerca de 1516, 1458 e 1373 cm<sup>-1</sup> estão associadas a grupos funcionais presentes na lignina estrutural da biomassa (CORREDOR *et al.*, 2009; FATRIASARI *et al.*, 2019; TREICHEL *et al.*, 2020; VENTURIN *et al.*, 2018). Nota-se que para CS e CC, a maioria dos picos achatou ou desapareceu completamente para todas as condições de pré-tratamento devido à ação do imidazol, o que corrobora os resultados observados na composição estrutural, onde todos os experimentos apresentaram deslignificação.

O pico na região de 1000 a 1110 cm<sup>-1</sup> indica vibração de alongamento de estruturas C-O-C e grupos metóxi da celulose. O seu aumento após os pré-tratamentos em CC e CS pode ser atribuído à recuperação de celulose no sólido (KAMALINI *et al.*, 2018; SHATERZADEH; ATAEI, 2017; VENTURIN *et al.*, 2018). O pico em torno de ~900 cm<sup>-1</sup> é atribuído ao alongamento da ligação C-O-C (ligação β-glicosídica), associada principalmente à celulose I, uma característica estrutural amorfa (VALLADARES-DIESTRA *et al.*, 2021; ZHU *et al.*, 2021). A redução acentuada

dos picos nessa faixa pode ser notada à medida que essas estruturas são alcançadas pelo pré-tratamento. Além disso, a proporção de celulose cristalina para amorfa ( $1500\text{ cm}^{-1}/897\text{ cm}^{-1}$ ) mostrou uma diminuição na biomassa CC, o que também pode ser notado pelo aumento da cristalinidade da celulose (Tabela 3) (FATRIASARI *et al.*, 2019; VENTURIN *et al.*, 2018).

Ao comparar as biomassas, os espectros FT-IR de CC e CS apresentam diferenças notáveis pelas bandas amorfas de celulose e cristalinidade ( $1500\text{ cm}^{-1}/897\text{ cm}^{-1}$ ), que podem resultar da estrutura nativa de ambas as biomassas.

#### 4.4 ANÁLISE DE XRD

Ao observar os padrões de XRD das amostras de biomassas brutas e pré-tratadas, todos os picos de ambas as biomassas apresentaram características típicas de celulose I e celulose II a  $2\theta = 22^\circ$  e  $2\theta = 16^\circ$ , respectivamente (JOSÉ *et al.*, 2022). Todos os valores foram calculados pela (Eq 3) (Tabela 3).

Tabela 3 - Cristalinidade da celulose nas biomassas CC e CS

Biomassa	Condição de Pré-tratamento	CrI (%)
Sabugo de milho (CC)	Biomassa bruta	40,42
	180°C – 60 min	59,11
	180°C – 30 min	58,81
	150°C – 60 min	52,44
	150°C – 30 min	50,14
	120°C – 60 min	47,67
	120°C – 30 min	47,97
	Casca de espiga (CS)	Biomassa bruta
180°C – 60 min		54,11
180°C – 30 min		60,20
150°C – 60 min		61,91
150°C – 30 min		54,07
120°C – 60 min		50,85
120°C – 30 min		51,72

FONTE: O autor (2022).

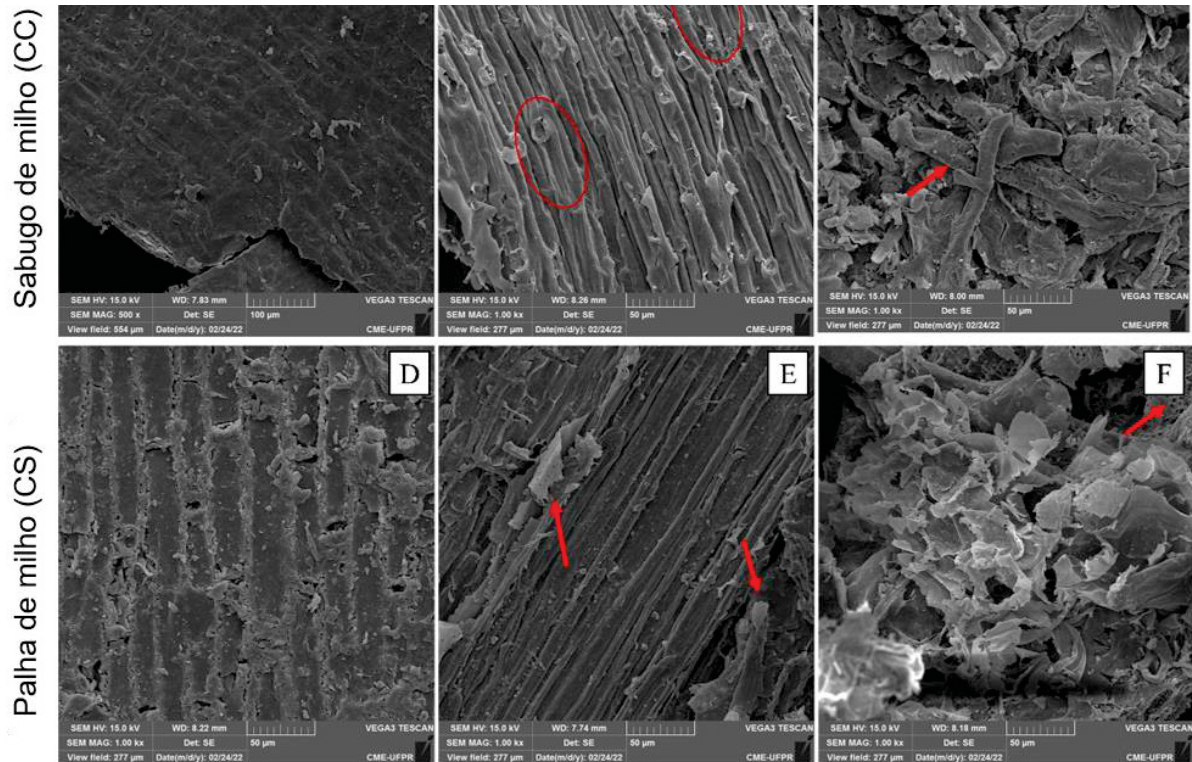
Após o pré-tratamento com imidazol, as intensidades de todos os picos mudaram em comparação com a biomassa bruta. Os valores de CrI aumentaram após o pré-tratamento e corroboraram com os resultados obtidos na composição estrutural das amostras, uma vez que a redução de sólidos e a perda de lignina foram observadas nas amostras. A redução de estruturas amorfas (como lignina e hemicelulose) na biomassa sólida é relatada como o principal fator no aumento da cristalinidade da celulose) (ETHAIB *et al.*, 2016; KLEINGESINDS *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2018; RÍOS-GONZÁLEZ *et al.*, 2021b).

#### 4.5 ANÁLISE POR MEV

A análise morfológica do CC e CS após o pré-tratamento com imidazol foi realizada para as condições de processo mais leves (120°C por 30 min) e mais severas (180°C por 60 min) para explorar as mudanças estruturais decorrentes dos pré-tratamentos.

Como indicado pela Figura 6A e Figura 6D, uma estrutura quase não porosa e não disruptiva forneceu às biomassas brutas uma superfície homogênea. O pré-tratamento com imidazol à uma temperatura mais amena (120°C) não rompeu agressivamente as microfibras das biomassas CC e CS e teve um impacto menor no tamanho das partículas do que a condição de pré-tratamento mais agressiva (180°C). Esse fator pode ser visto nas Figura 6B e Figura 6E, onde as biomassas a 120°C mostram uma estrutura fibrilar ainda alongada, com algumas evidências de quebra, e pequenos poros irregulares na superfície. Em ambas as biomassas, as condições de pré-tratamento com imidazol a 120°C apresentaram menor redução de sólidos associada a uma pequena diminuição do teor de lignina, o que é observado pela análise de MEV pela menor agressividade aparente das fibras de biomassa e maior suavidade superficial quando comparadas às amostras expostas a 180°C.

Figura 6 - Imagens de microscopia eletrônica de biomassas de CC e CS pré-tratadas e brutas



FONTE: O autor (2021).

Em comparação, o estado nativo das biomassas foi significativamente afetado pelo tratamento com imidazol a 180°C. A degradação e desorganização das estruturas são mostradas na Fig. 2C e 2F. As biomassas pré-tratadas com imidazol a 180°C também apresentaram altas perdas de sólidos, corroborando para algumas alterações morfológicas notáveis na análise de MEV. Imagens de MEV para sólidos pré-tratados à 180°C revelam que a formação superficial de orifícios nas biomassas e fibras alongadas são quase inexistentes, o que pode ser consistente com a remoção de componentes hemicelulósicos e lignina durante o pré-tratamento (KUMAR *et al.*, 2009).

Esses resultados são comparados a estudos recentes utilizando imidazol, onde o pré-tratamento severo promoveu a desorganização das fibras do casco de soja (NISHIDA *et al.*, 2023). Tais resultados indicam um aumento na área superficial da biomassa, o que pode facilitar processos enzimáticos para a liberação de açúcares fermentáveis (NISHIDA *et al.*, 2023; VALLADARES-DIESTRA *et al.*, 2021).

#### 4.6 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DAS BIOMASSAS

Os resultados para ambas as biomassas (CC e CS) demonstram que o pré-tratamento com imidazol gera um aumento significativo na eficiência da hidrólise e que, em algumas condições de pré-tratamento, apresenta rendimento de açúcar satisfatório, atingindo uma conversão completa ( $27,9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) de ambos os glucanos a açúcares fermentescíveis em condições de pré-tratamento de  $180^\circ\text{C}$  e 30 min para CC.

Resultados mais promissores de sacarificação de biomassa foram obtidos em biomassas CC e CS pré-tratadas em condições de temperatura mais elevadas  $150^\circ\text{C}$  e  $180^\circ\text{C}$ , respectivamente, o que pode ser resultado do tamanho reduzido da fibra, aumentando o potencial de sacarificação da biomassa bruta e aumentando também a área superficial da biomassa, conseqüentemente, havendo maior contato entre a enzima e a celulose, o que favorece a hidrólise enzimática da biomassa.

Ao analisar a concentração de glucose liberada durante o processo de sacarificação em relação às biomassas brutas ( $5,22 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  para CC e  $5,62 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  para CS), é possível observar o aumento de cerca de 5 vezes para CC e cerca de 4 vezes para CS, atingindo  $27 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  e  $21 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , respectivamente. Resultados semelhantes foram obtidos em condições mais graves de pré-tratamento por extrusão em espiga de milho (JOSÉ *et al.*, 2022).

O aumento do rendimento de hidrólise das biomassas avaliadas também sugere que a remoção de lignina foi um fator essencial para o aumento da digestibilidade enzimática, além do fato de que a ruptura de cristais de celulose é crucial para a degradação eficiente das biomassas CC e CS (JOSÉ *et al.*, 2022; NISHIDA *et al.*, 2023).

O presente trabalho atingiu 100% de rendimento de glucose para CC e 77,76% para CS, com desempenho real de pré-tratamento com imidazol, demonstrando algumas vantagens da tecnologia e bioprocessos à base de imidazol para melhor produção de açúcares fermentáveis e uma degradação mínima da celulose no sólido recuperado. Além disso, altos rendimentos de hidrólise enzimática também foram encontrados em outras investigações usando imidazol como solvente de pré-tratamento. Cachos de frutos vazios de dendê pré-tratados com imidazol a  $180^\circ\text{C}$  por 60 min, atingindo um rendimento de hidrólise de 96,2% para glucose e 98,8% para xilose (ZEVALLOS TORRES *et al.*, 2022). Alta eficiência na liberação de glucose também foi observada por Valladares-Diestra *et al.* (2021) após pré-

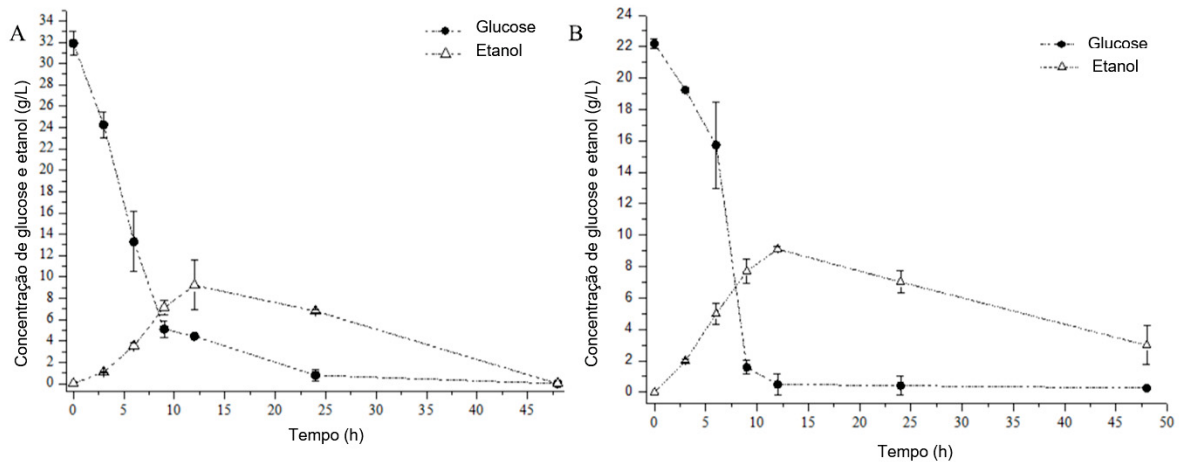
tratamento com imidazol da biomassa de cana-de-açúcar à 160°C. Além disso, o estudo de Valladares-Diestra et al. (2021) observou que pré-tratamentos com temperaturas mais severas requerem tempos de hidrólise mais curtos, o que pode ser observado nos resultados deste estudo, onde as biomassas pré-tratadas a temperaturas mais baixas (120°C) em geral, apresentaram menores rendimentos de açúcar. Ao contrário do que foi observado em Nishida et al., (2023), onde o casco de soja foi pré-tratado a 120°C com imidazol, obteve-se 100% de conversão. Este fator demonstra a relevância de avaliar o comportamento de diferentes biomassas para o desenvolvimento de bioprocessos eficientes com imidazol.

#### 4.7 EFEITOS DO PRÉ-TRATAMENTO NA PRODUÇÃO DE ETANOL

Além de ser um pré-tratamento eficiente para melhorar a deslignificação da estrutura lignocelulósica, o pré-tratamento com imidazol pode separar eficientemente a celulose e permitir a hidrólise enzimática da estrutura posteriormente. Este conceito permite o pré-tratamento com imidazol em diferentes condições para obter a quantidade máxima de glucose de CS e CC na fase líquida (hidrolisado). O hidrolisado obtido a partir da hidrólise enzimática de biomassa pré-tratada com imidazol foi submetido à fermentação utilizando *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1, que é uma das cepas mais utilizadas para a produção industrial de etanol, principalmente devido à sua alta eficiência na conversão de glicose em bioetanol e adaptação ao processo, apresentando eficiências acima de 90% em reatores industriais (CARLOS; OLITTA; NITSCHKE, 2011).

Os experimentos de fermentação alcoólica para produção de etanol 2G foram conduzidos com as biomassas de CC e CS pré-tratadas nas duas condições de maior liberação de glicose, sendo para CC: 180° por 30 min e 150°C por 30 min, e para CS: 180°C por 60 min e 150°C por 60 min. O perfil de consumo de glucose e a produção de etanol foram analisados por 48 h e estão apresentados na Figura 7. A concentração de xilose não mostrou diferença ao longo da fermentação, por isso não foi apresentada.

Figura 7 - Consumo de glicose e produção de etanol



A partir dos dados de concentração de etanol, determinou-se a produtividade atingida pelo processo. Como pode ser observado (Figura 7), a produção de etanol atingindo uma concentração máxima de  $9,11 \pm 0,18 \text{ g.L}^{-1}$  e  $9,22 \pm 2,33 \text{ g.L}^{-1}$  às 12 h para CC e CS, respectivamente, mostrando um perfil de aumento rápido e inversamente decrescente da concentração de glicose. CS alcançou um rendimento de produção de 0,335 g de etanol/g de glicose, correspondendo a 65,73% do rendimento teórico. Em contrapartida, os rendimentos de produção obtidos para CC foram elevados em relação ao teórico, com 0,42 g de etanol/g de glicose com eficiência teórica de 82,2% e produtividade de etanol de  $0,759 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  em 12 h. Vale ressaltar que foram obtidos rendimentos de hidrólise enzimática de 100% para essa biomassa, reforçando a relevância dessas condições de pré-tratamento com imidazol ( $180^\circ\text{C} - 30 \text{ min}$ ) para a sabugo.

Além disso, os dados de rendimento satisfatório demonstram que o pré-tratamento com imidazol também é potencial, pois não apresenta geração de inibidores, ou seja, 5-hidroximetilfurfural (HMF), que o processo de tratamento com imidazol da biomassa lignocelulósica pode produzir. Resultados semelhantes foram discutidos por Valladares-Diestra et al., (2021).

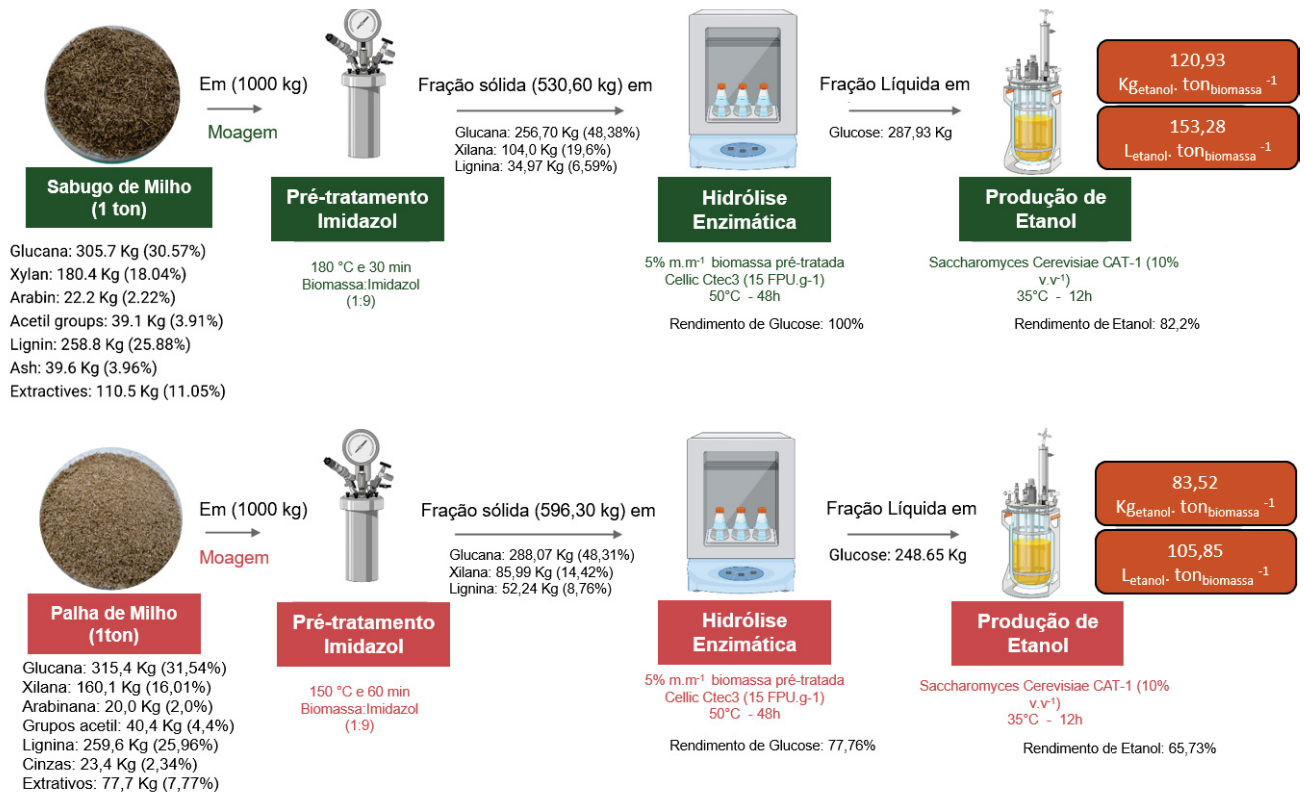
A eficiência de fermentação obtida é comparável ou mesmo superior às obtidas com subprodutos de milho ou outros substratos lignocelulósicos. Utilizando imidazol para bagaço de cana-de-açúcar, rendimentos teóricos de 83,7% foram alcançados em 12 h por *S. cerevisiae* LPB2705 (VALLADARES-DIESTRA et al., 2021), sendo comparáveis aos obtidos neste estudo. A levedura *Pichia stipitis* também

foi capaz de fermentar um hidrolisado produzido a partir de biomassa de casco de soja pré-tratada com imidazol, atingindo uma concentração de etanol de  $10,8 \text{ g.L}^{-1}$  em 48 h, demonstrando que há potencial biotecnológico na exploração de outras cepas e biomassa lignocelulósica para expandir a técnica com imidazol, principalmente quando se trata de eficiência para fracionamento de estruturas lignocelulósicas (SAYURY NISHIDA *et al.*, 2021). Além do potencial ainda pouco explorado para produzir outras biomoléculas, como o ácido succínico (SAYURY NISHIDA *et al.*, 2021; ZEVALLOS TORRES *et al.*, 2022) e recuperação da fração rica em lignina (PEREIRA *et al.*, 2021), e é uma estratégia para estudos futuros.

#### 4.8 RESUMO DO PROCESSO

Os resultados obtidos a partir do pré-tratamento com imidazol, hidrólise enzimática e fermentação alcoólica foram utilizados para desenvolver um balanço de massa para a via proposta para a produção de etanol 2G, extrapolando os resultados para 1000 kg de subprodutos de milho (Figura 8). Com base nos rendimentos e composições de biomassas,  $120,93 \text{ Kg}_{\text{Etanol.ton}^{-1}}$  e  $83,52 \text{ Kg}_{\text{Etanol.ton}^{-1}}$  podem ser obtidos para CC e CS, respectivamente.

Figura 8 – Resumo do processo de produção de etanol



Em comparação, os resultados para CC foram 1,45 vezes maiores do que para CS na produção de etanol, o que pode ser inferido a partir da diferença entre as biomassas, principalmente na composição estrutural, corroborada pelas diferenças apresentadas no FT-IR e pelos dados obtidos na hidrólise enzimática. No entanto, não minimiza a relevância dos resultados obtidos neste estudo, comparáveis e até superiores aos dados de produção de etanol com outras biomassas pré-tratadas com imidazol (NISHIDA *et al.*, 2023; SAYURY NISHIDA *et al.*, 2021; VALLADARES-DIESTRA *et al.*, 2022, 2023), sendo essencial destacar que a otimização do bioprocessamento pode ser fundamental para melhorar os rendimentos e possibilitar a inserção dessa tecnologia no mercado de biocombustíveis 2G.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo demonstrou que o pré-tratamento com imidazol (considerado um solvente verde) pode ser utilizado com resultados promissores para a biomassa residual de milho. O pré-tratamento com imidazol sob diferentes condições de

temperatura (120 a 180°C) e tempo (30 e 60 min) alterou a estrutura da biomassa, expondo a estrutura dos polissacarídeos (principalmente celulose). Portanto, foram observados resultados satisfatórios de digestibilidade enzimática, atingindo 100% de sacarificação para a biomassa CC. O hidrolisado rico em açúcar foi fermentado para produção de etanol com rendimentos superiores a 80%, demonstrando o potencial biotecnológico da aplicação do imidazol no pré-tratamento da biomassa lignocelulósica.

#### 4.9 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

O imidazol apresentou-se como um promissor solvente verde para aplicação em pré-tratamento de biomassas lignocelulósicas, tendo resultados satisfatórios para a deslignificação desse tipo de biomassa. Com o intuito de ampliar o estudo realizado nesse trabalho, recomenda-se buscar por aplicações para as frações ricas em hemicelulose e lignina dos resíduos de milho a fim de gerar novos produtos. Adicionalmente, pode-se avaliar a aplicação de imidazol em pré-tratamento de outras biomassas com teores de celulose, hemicelulose e lignina diferentes, e estudar sobre a recuperação do imidazol após os pré-tratamentos e sua possibilidade de reutilização.

## REFERÊNCIAS

- ABO, B. O.; GAO, M.; WANG, Y.; WU, C.; MA, H.; WANG, Q. Lignocellulosic biomass for bioethanol: an overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation processes. **Reviews on Environmental Health**, v. 34, n. 1, p. 57–68, 26 mar. 2019.
- ACHARYA, B.; DUTTA, A. Characterization of Torrefied Willow for Combustion Application. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**, v. 7, n. 6, p. 667–674, 1 dez. 2013.
- AGOSTINHO, F.; BERTAGLIA, A. B. B.; ALMEIDA, C. M. V. B.; GIANNETTI, B. F. Influence of cellulase enzyme production on the energetic – environmental performance of lignocellulosic ethanol. 2014.
- ALALWAN, H. A.; ALMINSHID, A. H.; ALJAAFARI, H. A. S. Promising evolution of biofuel generations. Subject review. **Renewable Energy Focus**, v. 28, p. 127–139, mar. 2019.
- ALTHURI, A.; GUJJALA, L. K. S.; BANERJEE, R. Partially consolidated bioprocessing of mixed lignocellulosic feedstocks for ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 530–539, dez. 2017.
- ANDLAR, M.; REZIĆ, T.; MARĐETKO, N.; KRACHER, D.; LUDWIG, R.; ŠANTEK, B. Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. **Engineering in Life Sciences**, v. 18, n. 11, p. 768–778, nov. 2018.
- ASHOKKUMAR, V.; VENKATKARTHICK, R.; JAYASHREE, S.; CHUETOR, S.; DHARMARAJ, S.; KUMAR, G.; CHEN, W.-H.; NGAMCHARUSSRIVICHAI, C. Recent advances in lignocellulosic biomass for biofuels and value-added bioproducts - A critical review. **Bioresource Technology**, v. 344, p. 126195, jan. 2022.
- BAILAR, J. C. **Inorganic Syntheses**. [s.l: s.n.].
- BARTOS, A.; ANGGONO, J.; FARKAS, Á. E.; KUN, D.; SOETAREDJO, F. E.; MÓCZÓ, J.; ANTONI; PURWANINGSIH, H.; PUKÁNSZKY, B. Alkali treatment of lignocellulosic fibers extracted from sugarcane bagasse: Composition, structure, properties. **Polymer Testing**, v. 88, n. March, 2020.
- BEIG, B.; RIAZ, M.; RAZA NAQVI, S.; HASSAN, M.; ZHENG, Z.; KARIMI, K.; PUGAZHENDHI, A.; ATABANI, A. E.; THUY LAN CHI, N. Current challenges and innovative developments in pretreatment of lignocellulosic residues for biofuel production: A review. **Fuel**, v. 287, p. 119670, 1 mar. 2021. . Acesso em: 21 out. 2022.

BRANDT, A.; GRÄSVIK, J.; HALLETT, J. P.; WELTON, T. Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. **Green Chemistry**, v. 15, n. 3, p. 550, 2013.

BROWN, L. M.; HAWKINS, G. M.; DORAN-PETERSON, J. Ethanol Production from Renewable Lignocellulosic Biomass. *Em: Biofuels and Bioenergy*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2017. p. 89–104.

CAI, J.; HE, Y.; YU, X.; BANKS, S. W.; YANG, Y.; ZHANG, X.; YU, Y.; LIU, R.; BRIDGWATER, A. V. Review of physicochemical properties and analytical characterization of lignocellulosic biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 76, p. 309–322, set. 2017.

CARLOS, L.; OLITTA, T.; NITSCHE, S. Ethanol Production in Brazil: The Industrial Process and Its Impact on Yeast Fermentation. *Em: Biofuel Production-Recent Developments and Prospects*. [s.l.] InTech, 2011.

CHANDEL, A. K.; GARLAPATI, V. K.; SINGH, A. K.; ANTUNES, F. A. F.; DA SILVA, S. S. **The path forward for lignocellulose biorefineries: Bottlenecks, solutions, and perspective on commercialization** *Bioresource Technology* 2018.

CHUNDAWAT, S. P. S.; VENKATESH, B.; DALE, B. E. Effect of particle size based separation of milled corn stover on AFEX pretreatment and enzymatic digestibility. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 96, n. 2, p. 219–231, 1 fev. 2007.

CORREDOR, D. Y.; SALAZAR, J. M.; HOHN, K. L.; BEAN, S.; BEAN, B.; WANG, D. Evaluation and Characterization of Forage Sorghum as Feedstock for Fermentable Sugar Production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 158, n. 1, p. 164–179, 27 jul. 2009.

CRAGG, S. M.; BECKHAM, G. T.; BRUCE, N. C.; BUGG, T. D.; DISTEL, D. L.; DUPREE, P.; ETXABE, A. G.; GOODELL, B. S.; JELLISON, J.; MCGEEHAN, J. E.; MCQUEEN-MASON, S. J.; SCHNORR, K.; WALTON, P. H.; WATTS, J. E.; ZIMMER, M. Lignocellulose degradation mechanisms across the Tree of Life. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 29, p. 108–119, dez. 2015.

DAHUNSI, S. O. Mechanical pretreatment of lignocelluloses for enhanced biogas production: Methane yield prediction from biomass structural components. **Bioresource Technology**, v. 280, p. 18–26, 1 maio 2019. . Acesso em: 21 out. 2022.

DENG, J.; ZHU, X.; CHEN, P.; HE, B.; TANG, S.; ZHAO, W.; LI, X.; ZHANG, R.; LV, Z.; KANG, H.; YU, L.; PENG, L. Mechanism of lignocellulose modification and

enzyme disadsorption for complete biomass saccharification to maximize bioethanol yield in rapeseed stalks. **Sustainable Energy & Fuels**, v. 4, n. 2, p. 607–618, 2020.

DEVI, A.; SINGH, A.; BAJAR, S.; PANT, D.; DIN, Z. U. Ethanol from lignocellulosic biomass: An in-depth analysis of pre-treatment methods, fermentation approaches and detoxification processes. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. 5, p. 105798, 1 out. 2021. . Acesso em: 21 out. 2022.

ELGARAHY, A. M.; HAMMAD, A.; EL-SHERIF, D. M.; ABOUZID, M.; GABALLAH, M. S.; ELWAKEEL, K. Z. Thermochemical conversion strategies of biomass to biofuels, techno-economic and bibliometric analysis: A conceptual review. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. 6, p. 106503, dez. 2021.

ETHAIB, S.; OMAR, R.; SITI MAZLINA, M. K.; DAYANG RADIAH, A. B.; SYAFIIE, S. Microwave-assisted Dilute Acid Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of Sago Palm Bark. **BioResources**, v. 11, n. 3, 5 maio 2016.

EVJEN, S.; ALEXANDER HØGMOEN ÅSTRAND, O.; GAARDER, M.; PAULSEN, R. E.; FIKSDAHL, A.; KNUUTILA, H. K. **Degradative behavior and toxicity of alkylated imidazoles**. [s.l: s.n.].

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/?#data/QC>>. Acesso em: 20 dez. 2020.

FATRIASARI, W.; FAJRIUTAMI, T.; LAKSANA, R. P. B.; WISTARA, N. J. Microwave Assisted-Acid Hydrolysis of Jabon Kraft Pulp. **Waste and Biomass Valorization**, v. 10, n. 6, p. 1503–1517, 5 jun. 2019.

G. DEL RÍO, P.; GULLÓN, P.; REBELO, F. R.; ROMANÍ, A.; GARROTE, G.; GULLÓN, B. A Whole-Slurry Fermentation Approach to High-Solid Loading for Bioethanol Production from Corn Stover. **Agronomy**, v. 10, n. 11, p. 1790, 15 nov. 2020.

GAO, H.; WANG, Y.; YANG, Q.; PENG, H.; LI, Y.; ZHAN, D.; WEI, H.; LU, H.; BAKR, M. M. A.; EI-SHEEKH, M. M.; QI, Z.; PENG, L.; LIN, X. Combined steam explosion and optimized green-liquor pretreatments are effective for complete saccharification to maximize bioethanol production by reducing lignocellulose recalcitrance in one-year-old bamboo. **Renewable Energy**, v. 175, p. 1069–1079, set. 2021.

#### **Global Market Insights.**

HALDER, P.; KUNDU, S.; PATEL, S.; SETIAWAN, A.; ATKIN, R.; PARTHASARTHY, R.; PAZ-FERREIRO, J.; SURAPANENI, A.; SHAH, K. Progress

on the pre-treatment of lignocellulosic biomass employing ionic liquids. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 105, p. 268–292, 1 maio 2019. . Acesso em: 21 out. 2022.

HEMANSI; GUPTA, R.; ASWAL, V. K.; SAINI, J. K. Sequential dilute acid and alkali deconstruction of sugarcane bagasse for improved hydrolysis: Insight from small angle neutron scattering (SANS). **Renewable Energy**, v. 147, p. 2091–2101, 2020.

HUANG, Y.-F.; CHIUEH, P.-T.; LO, S.-L. A review on microwave pyrolysis of lignocellulosic biomass. **Sustainable Environment Research**, v. 26, n. 3, p. 103–109, maio 2016.

JORDAN, T.; SCHMIDT, S.; LIEBERT, T.; HEINZE, T. Molten imidazole-a starch solvent. **Green Chemistry**, v. 16, n. 4, p. 1967–1973, 2014a.

JORDAN, T.; SCHMIDT, S.; LIEBERT, T.; HEINZE, T. Molten imidazole – a starch solvent. **Green Chemistry**, v. 16, n. 4, p. 1967, 2014b.

JOSÉ, Á. H. M.; MOURA, E. A. B.; RODRIGUES JR, D.; KLEINGESINDS, E. K.; RODRIGUES, R. C. L. B. A residue-free and effective corncob extrusion pretreatment for the enhancement of high solids loading enzymatic hydrolysis to produce sugars. **Industrial Crops and Products**, v. 188, p. 115655, nov. 2022.

KAMALINI, A.; MUTHUSAMY, S.; RAMAPRIYA, R.; MUTHUSAMY, B.; PUGAZHENDHI, A. Optimization of sugar recovery efficiency using microwave assisted alkaline pretreatment of cassava stem using response surface methodology and its structural characterization. **Journal of Molecular Liquids**, v. 254, p. 55–63, mar. 2018.

KAMARAJ, M.; RAMACHANDRAN, K. K.; ARAVIND, J. Biohydrogen production from waste materials: benefits and challenges. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 17, n. 1, p. 559–576, 6 jan. 2020.

KIM, J.; SUNAGAWA, M.; KOBAYASHI, S.; SHIN, T.; TAKAYAMA, C. Developmental localization of calcitonin gene-related peptide in dorsal sensory axons and ventral motor neurons of mouse cervical spinal cord. **Neuroscience Research**, v. 105, p. 42–48, abr. 2016.

KLEINGESINDS, E. K.; JOSÉ, Á. H. M.; BRUMANO, L. P.; SILVA-FERNANDES, T.; RODRIGUES, D.; RODRIGUES, R. C. L. B. Intensification of bioethanol production by using Tween 80 to enhance dilute acid pretreatment and

enzymatic saccharification of corncob. **Industrial Crops and Products**, v. 124, p. 166–176, nov. 2018.

KUMAR, M.; OLAJIRE OYEDUN, A.; KUMAR, A. A review on the current status of various hydrothermal technologies on biomass feedstock. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 81, p. 1742–1770, jan. 2018.

KUMAR, R.; MAGO, G.; BALAN, V.; WYMAN, C. E. Physical and chemical characterizations of corn stover and poplar solids resulting from leading pretreatment technologies. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 17, p. 3948–3962, set. 2009.

KUMAR, S.; PARITOSH, K.; PAREEK, N.; CHAWADE, A.; VIVEKANAND, V. De-construction of major Indian cereal crop residues through chemical pretreatment for improved biogas production: An overview. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 90, p. 160–170, jul. 2018.

KUMARI, D.; SINGH, R. Pretreatment of lignocellulosic wastes for biofuel production: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 90, p. 877–891, 1 jul. 2018. . Acesso em: 21 out. 2022.

LACHOS-PEREZ, D.; CÉSAR TORRES-MAYANGA, P.; ABAIDE, E. R.; ZABOT, G. L.; DE CASTILHOS, F. Hydrothermal carbonization and Liquefaction: differences, progress, challenges, and opportunities. **Bioresource Technology**, v. 343, p. 126084, jan. 2022.

LANCEFIELD, C. S.; PANOVIC, I.; DEUSS, P. J.; BARTA, K.; WESTWOOD, N. J. Pre-treatment of lignocellulosic feedstocks using biorenewable alcohols: towards complete biomass valorisation. **Green Chemistry**, v. 19, n. 1, p. 202–214, 2017.

LI, J.; LU, M.; GUO, X.; ZHANG, H.; LI, Y.; HAN, L. Insights into the improvement of alkaline hydrogen peroxide (AHP) pretreatment on the enzymatic hydrolysis of corn stover: Chemical and microstructural analyses. **Bioresource Technology**, v. 265, p. 1–7, out. 2018.

LINDMAN, B.; KARLSTRÖM, G.; STIGSSON, L. On the mechanism of dissolution of cellulose. **Journal of Molecular Liquids**, v. 156, n. 1, p. 76–81, set. 2010.

LIU, D.; NING, P.; QU, G.; HUANG, X.; LIU, Y.; ZHANG, J. The effects of cathodic micro-voltage combined with hydrothermal pretreatment on methane fermentation of lignocellulose substrate. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 64, p. 012083, maio 2017.

LORENCI WOICIECHOWSKI, A.; DALMAS NETO, C. J.; PORTO DE SOUZA VANDENBERGHE, L.; DE CARVALHO NETO, D. P.; NOVAK SYDNEY, A. C.; LETTI, L. A. J.; KARP, S. G.; ZEVALLOS TORRES, L. A.; SOCCOL, C. R. Lignocellulosic biomass: Acid and alkaline pretreatments and their effects on biomass recalcitrance – Conventional processing and recent advances. **Bioresource Technology**, v. 304, p. 122848, 2020a.

LORENCI WOICIECHOWSKI, A.; DALMAS NETO, C. J.; PORTO DE SOUZA VANDENBERGHE, L.; DE CARVALHO NETO, D. P.; NOVAK SYDNEY, A. C.; LETTI, L. A. J.; KARP, S. G.; ZEVALLOS TORRES, L. A.; SOCCOL, C. R. Lignocellulosic biomass: Acid and alkaline pretreatments and their effects on biomass recalcitrance – Conventional processing and recent advances. **Bioresource Technology**, v. 304, p. 122848, maio 2020b.

LU, F.; RALPH, J. Non-degradative dissolution and acetylation of ball-milled plant cell walls: high-resolution solution-state NMR. **The Plant Journal**, v. 35, n. 4, p. 535–544, ago. 2003.

MALIK, K.; SHARMA, P.; YANG, Y.; ZHANG, P.; ZHANG, L.; XING, X.; YUE, J.; SONG, Z.; NAN, L.; YUJUN, S.; EL-DALATONY, M. M.; SALAMA, E.-S.; LI, X. Lignocellulosic biomass for bioethanol: Insight into the advanced pretreatment and fermentation approaches. **Industrial Crops and Products**, v. 188, p. 115569, nov. 2022.

MANAVALAN, T.; MANAVALAN, A.; HEESE, K. Characterization of Lignocellulolytic Enzymes from White-Rot Fungi. **Current Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 485–498, 9 abr. 2015.

MEDIAVILLA, I.; BORJABAD, E.; FERNÁNDEZ, M. J.; RAMOS, R.; PÉREZ, P.; BADOS, R.; CARRASCO, J. E.; ESTEBAN, L. S. Biofuels from broom clearings: Production and combustion in commercial boilers. **Energy**, v. 141, p. 1845–1856, 15 dez. 2017. . Acesso em: 21 out. 2022.

MORAIS, A. R. C.; PINTO, J. V.; NUNES, D.; ROSEIRO, L. B.; OLIVEIRA, M. C.; FORTUNATO, E.; BOGEL-ŁUKASIK, R. Imidazole: Prospect Solvent for Lignocellulosic Biomass Fractionation and Delignification. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 4, n. 3, p. 1643–1652, 2016a.

MORAIS, A. R. C.; PINTO, J. V.; NUNES, D.; ROSEIRO, L. B.; OLIVEIRA, M. C.; FORTUNATO, E.; BOGEL-ŁUKASIK, R. Imidazole: Prospect Solvent for

Lignocellulosic Biomass Fractionation and Delignification. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 4, n. 3, p. 1643–1652, 7 mar. 2016b.

MORAIS, A. R. C.; PINTO, J. V.; NUNES, D.; ROSEIRO, L. B.; OLIVEIRA, M. C.; FORTUNATO, E.; BOGEL-ŁUKASIK, R. Imidazole: Prospect Solvent for Lignocellulosic Biomass Fractionation and Delignification. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 4, n. 3, p. 1643–1652, 7 mar. 2016c.

MORAIS DE CARVALHO, D.; ABAD, A. M.; EVTUGUIN, D. V.; COLODETTE, J. L.; LINDSTRÖM, M. E.; VILAPLANA, F.; SEVASTYANOVA, O. Isolation and characterization of acetylated glucuronoarabinoxylan from sugarcane bagasse and straw. **Carbohydrate Polymers**, v. 156, p. 223–234, 2017.

MORALES, M.; QUINTERO, J.; CONEJEROS, R.; AROCA, G. Life cycle assessment of lignocellulosic bioethanol: Environmental impacts and energy balance. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, p. 1349–1361, 2015.

MORENO, A. D.; IBARRA, D.; BALLESTEROS, I.; FERNÁNDEZ, J. L.; BALLESTEROS, M. Ethanol from laccase-detoxified lignocellulose by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*—Effects of steam pretreatment conditions, process configurations and substrate loadings. **Biochemical Engineering Journal**, v. 79, p. 94–103, out. 2013.

MUKTHAM, R.; K. BHARGAVA, S.; BANKUPALLI, S.; S. BALL, A. A Review on 1st and 2nd Generation Bioethanol Production-Recent Progress. **Journal of Sustainable Bioenergy Systems**, v. 06, n. 03, p. 72–92, 2016.

NAGARAJAN, S.; SKILLEN, N. C.; IRVINE, J. T. S.; LAWTON, L. A.; ROBERTSON, P. K. J. Cellulose II as bioethanol feedstock and its advantages over native cellulose. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 77, p. 182–192, set. 2017.

NAKAYAMA, R.; MURAKAMI, M.; NAMIKI, N.; IMAI, M. Impact of ultrasonic irradiation pretreatment of water-soluble cellulose on enzymatic hydrolysis. **SN Applied Sciences**, v. 2, n. 5, p. 846, 7 maio 2020.

NANDA, S.; AZARGOHAR, R.; DALAI, A. K.; KOZINSKI, J. A. An assessment on the sustainability of lignocellulosic biomass for biorefining. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 50, p. 925–941, out. 2015.

NASIRPOUR, N.; MOUSAVI, S. M. Effect of Particle Size in Polyethyltene Glycol-Assisted [BMIM][Cl] Pretreatment of Sugarcane Bagasse. **BioEnergy Research**, v. 14, n. 4, p. 1136–1146, 8 dez. 2021.

NIPHADKAR, S.; BAGADE, P.; AHMED, S. Bioethanol production: insight into past, present and future perspectives. **Biofuels**, v. 9, n. 2, p. 229–238, 2018.

NISHIDA, V. S.; WOICIECHOWSKI, A. L.; VALLADARES-DIESTRA, K. K.; ZEVALLOS TORRES, L. A.; VANDENBERGHE, L. P. de S.; ZANDONÁ FILHO, A.; SOCCOL, C. R. Second Generation Bioethanol Production from Soybean Hulls Pretreated with Imidazole as a New Solvent. **Fermentation**, v. 9, n. 2, p. 93, 20 jan. 2023.

NOVAES, E.; KIRST, M.; CHIANG, V.; WINTER-SEDEROFF, H.; SEDEROFF, R. Lignin and Biomass: A Negative Correlation for Wood Formation and Lignin Content in Trees. **Plant Physiology**, v. 154, n. 2, p. 555–561, 4 out. 2010.

OUYANG, X. Effect of Simultaneous Steam Explosion and Alkaline Depolymerization on Corncob Lignin and Cellulose Structure. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 32, n. 2, p. 177–189, 6 jul. 2018.

PEREIRA, P. M. A.; BERNARDO, J. R.; OLIVEIRA, M. C.; ROSEIRO, L. B.; ŁUKASIK, R. M. Depolymerization of Lignin from Extracted Solid Waste of *Cupressus lusitanica* Mill. Biomass Using Imidazole. **Waste and Biomass Valorization**, v. 12, n. 3, p. 1341–1355, 14 mar. 2021.

PONNUSAMY, V. K.; NGUYEN, D. D.; DHARMARAJA, J.; SHOBANA, S.; BANU, J. R.; SARATALE, R. G.; CHANG, S. W.; KUMAR, G. A review on lignin structure, pretreatments, fermentation reactions and biorefinery potential. **Bioresource Technology**, v. 271, p. 462–472, jan. 2019.

PUROHIT, P.; DHAR, S. Lignocellulosic biofuels in India: current perspectives, potential issues and future prospects. **AIMS Energy**, v. 6, n. 3, p. 453–486, 2018.

RAJAN, K.; CARRIER, D. J. Effect of dilute acid pretreatment conditions and washing on the production of inhibitors and on recovery of sugars during wheat straw enzymatic hydrolysis. **Biomass and Bioenergy**, v. 62, p. 222–227, mar. 2014.

RAMAMOORTHY, N. K.; T R, T. R.; SAHADEVAN, R. Production of bioethanol by an innovative biological pre-treatment of a novel mixture of surgical waste cotton and waste card board. **Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects**, v. 42, n. 8, p. 942–953, 17 abr. 2020.

RAMOS, A.; MONTEIRO, E.; ROUBOA, A. Biomass pre-treatment techniques for the production of biofuels using thermal conversion methods – A review. **Energy Conversion and Management**, v. 270, p. 116271, 15 out. 2022. . Acesso em: 21 out. 2022.

RAMOS, L. P.; DA SILVA, L.; BALLEM, A. C.; PITARELO, A. P.; CHIARELLO, L. M.; SILVEIRA, M. H. L. Enzymatic hydrolysis of steam-exploded sugarcane bagasse using high total solids and low enzyme loadings. **Bioresource Technology**, v. 175, p. 195–202, 2015.

REILLY, M.; DINSDALE, R.; GUWY, A. Enhanced biomethane potential from wheat straw by low temperature alkaline calcium hydroxide pre-treatment.

**Bioresource Technology**, v. 189, p. 258–265, ago. 2015.

RICARDO SOCCOL, C.; FARACO, V.; KARP, S.; VANDENBERGHE, L. P. S.; THOMAZ-SOCCOL, V.; WOICIECHOWSKI, A.; PANDEY, A. **Lignocellulosic bioethanol: Current status and future perspectives**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2011. 101–122 p.

RÍOS-GONZÁLEZ, L. J.; MEDINA-MORALES, M. A.; RODRÍGUEZ-DE LA GARZA, J. A.; ROMERO-GALARZA, A.; MEDINA, D. D.; MORALES-MARTÍNEZ, T. K. Comparison of dilute acid pretreatment of agave assisted by microwave versus ultrasound to enhance enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 319, p. 124099, jan. 2021a.

RÍOS-GONZÁLEZ, L. J.; MEDINA-MORALES, M. A.; RODRÍGUEZ-DE LA GARZA, J. A.; ROMERO-GALARZA, A.; MEDINA, D. D.; MORALES-MARTÍNEZ, T. K. Comparison of dilute acid pretreatment of agave assisted by microwave versus ultrasound to enhance enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 319, p. 124099, jan. 2021b.

ROJAS-REJÓN, O. A.; SÁNCHEZ, A. The impact of particle size and initial solid loading on thermochemical pretreatment of wheat straw for improving sugar recovery. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, n. 7, p. 1427–1436, 4 jul. 2014.

SAYURY NISHIDA, V.; LORENCI WOICIECHOWSKI, A.; VALLADARES-DIESTRA, K. K.; ZEVALLOS TORRES, L. A.; PORTO DE SOUZA VANDENBERGHE, L.; ZANDONA FILHO, A.; SOCCOL, C. R. Bioethanol and succinic acid co-production from imidazole-pretreated soybean hulls. **Industrial Crops and Products**, v. 172, p. 114060, nov. 2021.

SHANKAR TUMULURU, J. **Biomass Preprocessing and Pretreatments for Production of Biofuels**. [s.l.] CRC Press, 2018. 1–13 p.

SHARMA, H. K.; XU, C.; QIN, W. Biological Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuels and Bioproducts: An Overview. **Waste and Biomass**

**Valorization**, v. 10, n. 2, p. 235–251, 28 fev. 2019.

SHATERZADEH, M. J.; ATAELI, S. A. The effects of temperature, initial pH, and glucose concentration on biohydrogen production from *Clostridium acetobutylicum*. **Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects**, v. 39, n. 11, p. 1118–1123, 3 jun. 2017.

SIPPONEN, M. H.; LAAKSO, S.; BAUMBERGER, S. Impact of ball milling on maize (*Zea mays* L.) stem structural components and on enzymatic hydrolysis of carbohydrates. **Industrial Crops and Products**, v. 61, p. 130–136, nov. 2014.

SLUITER, A.; HAMES, B.; HYMAN, D.; PAYNE, C.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; WOLFE, J. **Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples Laboratory Analytical Procedure (LAP) Issue**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <www.nrel.gov>.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. **Determination of Ash in Biomass**. [s.l.: s.n.].

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D. **Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass NREL/TP-510-42618 analytical procedure - Determination of structural carbohydrates and lignin in Biomass. Laboratory Analytical Procedure (LAP)** . [s.l.: s.n.].

SLUITER, A.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. **Determination of Extractives in Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP)**. [s.l.: s.n.]. Disponível em:

<[http://www.nrel.gov/biomass/analytical\\_procedures.html](http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html)>.

SOAM, S.; KAPOOR, M.; KUMAR, R.; BORJESSON, P.; GUPTA, R. P.; TULI, D. K. Global warming potential and energy analysis of second generation ethanol production from rice straw in India. **Applied Energy**, v. 184, p. 353–364, 2016.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. de S.; MEDEIROS, A. B. P.; KARP, S. G.; BUCKERIDGE, M.; RAMOS, L. P.; PITARELO, A. P.; FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L. M. F.; FERRARA, M. A.; SILVA BON, E. P. da; MORAES, L. M. P. de; ARAÚJO, J. de A.; TORRES, F. A. G. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4820–4825, 2010.

SOUZA-CORRÊA, J. A.; OLIVEIRA, C.; NASCIMENTO, V. M.; WOLF, L. D.; GÓMEZ, E. O.; ROCHA, G. J. M.; AMORIM, J. Atmospheric Pressure Plasma Pretreatment of Sugarcane Bagasse: the Influence of Biomass Particle Size in the Ozonation Process. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 3, p. 1663–1672, 19 fev. 2014.

STRASSBERGER, Z.; TANASE, S.; ROTHENBERG, G. The pros and cons of lignin valorisation in an integrated biorefinery. **RSC Adv.**, v. 4, n. 48, p. 25310–25318, 2014.

SUN, J.; DING, R.; YIN, J. Pretreatment of corn cobs and corn stalks with tetrabutyl phosphate hydroxide ionic liquid to enhance enzymatic hydrolysis process. **Biochemical Engineering Journal**, v. 177, p. 108270, jan. 2022.

TAINER, J. A.; GETZOFF, E. D.; RICHARDSON, J. S.; RICHARDSON, D. C. Structure and mechanism of copper, zinc superoxide dismutase. **Nature**, v. 306, n. 5940, p. 284–287, nov. 1983.

TAN, H. T.; LEE, K. T. Understanding the impact of ionic liquid pretreatment on biomass and enzymatic hydrolysis. **Chemical Engineering Journal**, v. 183, p. 448–458, 2012.

TAN, Y. T.; CHUA, A. S. M.; NGOH, G. C. Deep eutectic solvent for lignocellulosic biomass fractionation and the subsequent conversion to bio-based products – A review. **Bioresource Technology**, v. 297, p. 122522, 2020.

TAYYAB, M. BIOETHANOL PRODUCTION FROM LIGNOCELLULOSIC BIOMASS BY ENVIRONMENT-FRIENDLY PRETREATMENT METHODS: A REVIEW. **Applied Ecology and Environmental Research**, v. 16, n. 1, p. 225–249, 2018.

THAKKAR, A.; SHELL, K. M.; BERTOSIN, M.; RODENE, D. D.; AMAR, V.; BERTUCCO, A.; GUPTA, R. B.; SHENDE, R.; KUMAR, S. Production of levulinic acid and biocarbon electrode material from corn stover through an integrated biorefinery process. **Fuel Processing Technology**, v. 213, p. 106644, mar. 2021.

TOSCAN, A.; FONTANA, R. C.; ANDREAUS, J.; CAMASSOLA, M.; LUKASIK, R. M.; DILLON, A. J. P. New two-stage pretreatment for the fractionation of lignocellulosic components using hydrothermal pretreatment followed by imidazole delignification: Focus on the polysaccharide valorization. **Bioresource Technology**, v. 285, n. February, p. 121346, 2019a.

TOSCAN, A.; FONTANA, R. C.; ANDREAUS, J.; CAMASSOLA, M.; LUKASIK, R. M.; DILLON, A. J. P. New two-stage pretreatment for the fractionation of lignocellulosic components using hydrothermal pretreatment followed by imidazole delignification: Focus on the polysaccharide valorization. **Bioresource Technology**, v. 285, p. 121346, ago. 2019b.

TREICHEL, H.; FONGARO, G.; SCAPINI, T.; FRUMI CAMARGO, A.; SPITZA STEFANSKI, F.; VENTURIN, B. Structure of Residual Biomass Characterization. *Em*: [s.l: s.n.]p. 7–18.

TUMULURU, J. S. **Biomass preprocessing and pretreatments for production of biofuels : mechanical, chemical and thermal methods**. [s.l: s.n.]

ULLAH, K.; KUMAR SHARMA, V.; DHINGRA, S.; BRACCIO, G.; AHMAD, M.; SOFIA, S. Assessing the lignocellulosic biomass resources potential in developing countries: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 51, p. 682–698, nov. 2015.

USMANI, Z.; SHARMA, M.; GUPTA, P.; KARPICHEV, Y.; GATHERGOOD, N.; BHAT, R.; GUPTA, V. K. Ionic liquid based pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced bioconversion. **Bioresource Technology**, v. 304, n. February, p. 123003, 2020a.

USMANI, Z.; SHARMA, M.; GUPTA, P.; KARPICHEV, Y.; GATHERGOOD, N.; BHAT, R.; GUPTA, V. K. Ionic liquid based pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced bioconversion. **Bioresource Technology**, v. 304, p. 123003, 1 maio 2020b. . Acesso em: 21 out. 2022.

VALLADARES-DIESTRA, K. K.; PORTO DE SOUZA VANDENBERGHE, L.; NISHIDA, V. S.; SOCCOL, C. R. The potential of imidazole as a new solvent in the pretreatment of agro-industrial lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 372, p. 128666, mar. 2023.

VALLADARES-DIESTRA, K. K.; PORTO DE SOUZA VANDENBERGHE, L.; NISHIDA, V. S.; ZEVALLOS TORRES, L. A.; ZANDONÁ FILHO, A.; SOCCOL, C. R. Integrated sugarcane biorefinery for first- and second-generation bioethanol production using imidazole pretreatment. **Journal of Cleaner Production**, v. 381, p. 135179, dez. 2022.

VALLADARES-DIESTRA, K. K.; PORTO DE SOUZA VANDENBERGHE, L.; ZEVALLOS TORRES, L. A.; NISHIDA, V. S.; ZANDONÁ FILHO, A.; WOICIECHOWSKI, A. L.; SOCCOL, C. R. Imidazole green solvent pre-treatment as

a strategy for second-generation bioethanol production from sugarcane bagasse.

**Chemical Engineering Journal**, v. 420, p. 127708, set. 2021.

VELLÉ, A.; CEBOLLADA, A.; MACÍAS, R.; IGLESIAS, M.; GIL-MOLES, M.; SANZ MIGUEL, P. J. From Imidazole toward Imidazolium Salts and N-Heterocyclic Carbene Ligands: Electronic and Geometrical Redistribution. **ACS Omega**, v. 2, n. 4, p. 1392–1399, 30 abr. 2017.

VELUCHAMY, C.; KALAMDHAD, A. S. Enhancement of hydrolysis of lignocellulose waste pulp and paper mill sludge through different heating processes on thermal pretreatment. **Journal of Cleaner Production**, v. 168, p. 219–226, dez. 2017.

VENTURIN, B.; FRUMI CAMARGO, A.; SCAPINI, T.; MULINARI, J.; BONATTO, C.; BAZOTI, S.; PEREIRA SIQUEIRA, D.; MARIA COLLA, L.; ALVES, S. L.; PAULO BENDER, J.; LUÍS RADIS STEINMETZ, R.; KUNZ, A.; FONGARO, G.; TREICHEL, H. Effect of pretreatments on corn stalk chemical properties for biogas production purposes. **Bioresource Technology**, v. 266, p. 116–124, out. 2018.

VERMA, A.; JOSHI, S.; SINGH, D. Imidazole: Having versatile biological activities. **Journal of Chemistry**, 2013.

VIDAL, B. C.; DIEN, B. S.; TING, K. C.; SINGH, V.; VIDAL, B. C.; SINGH, V.; DIEN, B. S. Influence of Feedstock Particle Size on Lignocellulose Conversion-A Review. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 164, p. 1405–1421, 2011.

VISHTAL, A.; KRASLAWSKI, A. Challenges in industrial applications of technical lignins. **BioResources**, v. 6, n. 3, p. 3547–3568, 7 jun. 2011.

WAHLSTRÖ, R.; RAHIKAINEN, J.; KRUUS, K.; SUURNÄKKI, A. Cellulose Hydrolysis and Binding With *Trichoderma reesei* Cel5A and Cel7A and Their Core Domains in Ionic Liquid Solutions. **Biotechnol. Bioeng**, v. 111, p. 726–733, 2014. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bit.25144/abstract>>.

WANG, M.; LU, X. Exploring the Synergy between Cellobiose Dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium* and Cellulase from *Trichoderma reesei*.

**Frontiers in Microbiology**, v. 7, 29 abr. 2016.

WANG, S.; OUYANG, X.; WANG, W.; YUAN, Q.; YAN, A. Comparison of ultrasound-assisted Fenton reaction and dilute acid-catalysed steam explosion pretreatment of corncobs: cellulose characteristics and enzymatic saccharification.

**RSC Advances**, v. 6, n. 80, p. 76848–76854, 2016.

WOJTUSIK, M.; ZURITA, M.; VILLAR, J. C.; LADERO, M.; GARCIA-OCHOA, F. Influence of fluid dynamic conditions on enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: Effect of mass transfer rate. **Bioresource Technology**, v. 216, p. 28–35, 2016.

WU, Z.; PENG, K.; ZHANG, Y.; WANG, M.; YONG, C.; CHEN, L.; QU, P.; HUANG, H.; SUN, E.; PAN, M. Lignocellulose dissociation with biological pretreatment towards the biochemical platform: A review. **Materials Today Bio**, v. 16, p. 100445, dez. 2022.

XIMENES, E.; KIM, Y.; MOSIER, N.; DIEN, B.; LADISCH, M. Deactivation of cellulases by phenols. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, n. 1, p. 54–60, 2011.

XU, H.; PENG, J.; KONG, Y.; LIU, Y.; SU, Z.; LI, B.; SONG, X.; LIU, S.; TIAN, W. Key process parameters for deep eutectic solvents pretreatment of lignocellulosic biomass materials: A review. **Bioresource Technology**, v. 310, n. March, p. 123416, 2020.

ZABED, H.; SAHU, J. N.; BOYCE, A. N.; FARUQ, G. Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: An overview on feedstocks and technological approaches. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 66, p. 751–774, 2016.

ZABED, H.; SAHU, J. N.; SUELY, A.; BOYCE, A. N.; FARUQ, G. Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 71, n. January, p. 475–501, 2017.

ZAKZESKI, J.; BRUIJNINCX, P. C. A.; JONGERIUS, A. L.; WECKHUYSEN, B. M. The Catalytic Valorization of Lignin for the Production of Renewable Chemicals. **Chemical Reviews**, v. 110, n. 6, p. 3552–3599, 9 jun. 2010.

ZANUSO, E.; GOMES, D. G.; RUIZ, H. A.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Enzyme immobilization as a strategy towards efficient and sustainable lignocellulosic biomass conversion into chemicals and biofuels: current status and perspectives. **Sustainable Energy & Fuels**, v. 5, n. 17, p. 4233–4247, 2021.

ZEVALLOS TORRES, L. A.; LORENCI WOICIECHOWSKI, A.; NISHIDA, V. S.; VALLADARES-DIESTRA, K. K.; PORTO DE SOUZA VANDENBERGHE, L.; ZANDONA FILHO, A.; SOCCOL, C. R. Imidazole Pretreatment of Oil Palm Empty

Fruit Bunches for Ethanol and Succinic Acid Co-production by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*. **BioEnergy Research**, 15 set. 2022.

ZHANG, Y.; WANG, R.; YANG, J.; LIU, L.; YANG, Y.; WANG, E.; YUAN, H. Enzymatic formulation strategies unlock highly-efficient saccharification of distinct pretreated corncobs. **Industrial Crops and Products**, v. 187, p. 115320, nov. 2022.

ZHENG, Y.; ZHAO, J.; XU, F.; LI, Y. Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 42, n. 1, p. 35–53, 1 jun. 2014. . Acesso em: 21 out. 2022.

ZHU, Z.; LIU, Y.; YANG, X.; MCQUEEN-MASON, S. J.; GOMEZ, L. D.; MACQUARRIE, D. J. Comparative evaluation of microwave-assisted acid, alkaline, and inorganic salt pretreatments of sugarcane bagasse for sugar recovery. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 11, n. 6, p. 2681–2693, 30 dez. 2021.

ZOGLAMI, A.; PAËS, G. Lignocellulosic Biomass: Understanding Recalcitrance and Predicting Hydrolysis. **Frontiers in Chemistry**, v. 7, 18 dez. 2019.