

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Patrícia Daniela Bohn

**PRÉ-TRATAMENTO DE CASCA DE ARROZ UTILIZANDO LÍQUIDO
IÔNICO [C₁₆MIM][Br]**

Santa Maria, RS

2019

Patrícia Daniela Bohn

**PRÉ-TRATAMENTO DE CASCA DE ARROZ UTILIZANDO LÍQUIDO IÔNICO
[C₁₆MIM][Br]**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Química**.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Raquel Cristine Kuhn

Co-orientador: Prof^o Dr. Flávio Dias Mayer

Santa Maria, RS

2019

Bohn, Patrícia Daniela

Pré-tratamento de casca de arroz utilizando o líquido
iônico [C16MIM][Br] / Patrícia Daniela Bohn.- 2019.

74 p.; 30 cm

Orientadora: Raquel Cristine Kuhn

Coorientador: Flávio Dias Mayer

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química, RS, 2019

1. Casca de arroz 2. Pré-tratamento 3. Líquido iônico
[C16MIM][Br] 4. Hidrólise enzimática I. Kuhn, Raquel
Cristine II. Mayer, Flávio Dias III. Título.

Patrícia Daniela Bohn

**PRÉ-TRATAMENTO DE CASCA DE ARROZ UTILIZANDO LÍQUIDO IÔNICO
[C₁₆MIM][Br]**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Química**.

Aprovado em 05 de agosto de 2019:

Raquel Cristine Kuhn, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Flávio Dias Mayer, Dr. (UFSM)
(Coorientador)

Adriano Cancelier, Dr. (UFSM)

Chayene Gonçalves Anchieta, Dra. (UNICAMP)

Santa Maria, RS
2019

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Lauro e Inês e minha irmã Ana, que são minha base, porto seguro e motivo para levantar todos os dias e lutar pelos sonhos.

AGRADECIMENTOS

Por trás de todas as conquistas sempre existe um elenco que torna todos os sonhos possíveis. O meu elenco é repleto de pessoas que admiro profundamente, aos quais agradeço de forma especial:

- aos meus pais Lauro Selvino Bohn e Inês Maria Bohn, que em momento algum medem esforços para amparar, dar suporte, atenção, além de serem exemplo de força, luta, dedicação e amor incondicional;

- à minha irmã Ana Caroline Bohn, por todas as palavras de apoio, horas de conversa, mensagens de incentivo, amor e companheirismo, e que ainda agregou à nossa família o Luan Wastner, que sempre teve um tempo para uma boa conversa e brincadeiras;

- à minha orientadora Raquel Cristine Kuhn e meu coorientador Flávio Dias Mayer pela paciência, atenção, sábios conselhos e pela orientação nesta jornada;

- aos meus amigos Dionatan Schmidt, Sabine Weber, Thais e Éverton Dietrich, Ricardo Casali, Douglas Fritzen, que embarcaram na aventura de mudar de uma pequena cidade para Santa Maria em busca dos sonhos e se tornaram família, e ao César Ramires, que veio do Equador e agregou nossa família; à Mariana Roman, que desde a infância é a amiga que indiferente da distância e tempo a amizade não muda; às colegas Anelise Mossmann, Rejiane da Rosa, presentes recebidos durante o Mestrado; aos colegas e amigos que em períodos difíceis desta jornada fizeram com que conseguisse enfrentar estes obstáculos, em especial ao Juliano Missau e ao Matias Netto, que se tornaram meus melhores amigos e não me deixaram desistir, me instigando a ser uma pessoa melhor a cada dia; ao amigo Marcus Rangel que na reta final me permitiu momentos de descontração, incentivo e apoio; à minha amiga Dielly Chrischon por todo carinho, apoio e alegria em nossos momentos de descontração; e à Patrícia Jung, que traz luz à minha vida, me incentiva a ser uma pessoa melhor, a buscar meu equilíbrio e minha paz e é exemplo de carinho e dedicação. A todos vocês, meu mais sincero obrigada, eu tenho os melhores amigos que a vida poderia me dar;

- à Chayene Anchieta pelo auxílio desde o início desta jornada, por sempre ajudar a encontrar uma saída, pelas horas de conversa, trocas de ideias, pelas correções e principalmente pela paciência que sempre teve comigo;

- aos alunos de iniciação científica Felipe Feltrin, Henrique Rech e Vitória Zaniboni que estavam comigo dia após dia no laboratório, passando pelas dificuldades

juntos, pela disponibilidade e dedicação na realização dos experimentos, esse trabalho não seria nada sem vocês;

- aos técnicos de laboratório Mariana Bassaco, Margiani Fortes, Liége Abelin e Gustavo Ugalde pelo auxílio com as análises, pela dedicação e paciência;

- a todos os membros dos Laboratórios de Bioprocessos e Processamento de Combustíveis Renováveis (PROCORE) pela ajuda na realização dos experimentos, pelas discussões de metodologias e auxílio nas análises;

- ao Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Maria pela oportunidade de aperfeiçoamento profissional e também ao secretário do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Marcos Mello, por toda ajuda e paciência;

- à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro para realização desta pesquisa.

*Aprender é a única coisa de que
a mente nunca se cansa, nunca tem
medo e nunca se arrepende.*

Leonardo da Vinci

RESUMO

PRÉ-TRATAMENTO DE CASCA DE ARROZ UTILIZANDO LÍQUIDO IÔNICO [C₁₆MIM][BR]

AUTORA: Patrícia Daniela Bohn
ORIENTADORA: Raquel Cristine Kuhn
CO-ORIENTADOR: Flávio Dias Mayer

A casca de arroz, um resíduo agroindustrial, é um material rico em celulose apresentando potencial para a produção de etanol de segunda geração. Entretanto, devido à sua estrutura recalcitrante atribuída à presença de lignina e sílica, faz-se necessária uma etapa de pré-tratamento para o rompimento desta estrutura. Muitos tipos de pré-tratamento podem ser aplicados na dissolução de celulose, sendo os líquidos iônicos muito estudados atualmente para esta finalidade, principalmente por serem considerados solventes verdes devido a sua biodegradabilidade. Neste estudo, a casca de arroz foi pré-tratada com o líquido iônico brometo de 1-hexadecil-3-metilimidazólio [C₁₆MIM][Br] para obter açúcares fermentescíveis, e a influência da razão líquido iônico:água e da temperatura sobre o rendimento de açúcares redutores liberados após a hidrólise enzimática foram investigados a partir de um planejamento experimental. Alterações morfológicas e estruturais foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), difração de raio-x (DRX), espectrometria infravermelha com transformada de Fourier (FTIR) e análise termogravimétrica (TGA). O planejamento experimental demonstrou uma influência positiva da temperatura sobre o pré-tratamento enquanto a razão de líquido iônico:água não teve influência significativa na faixa estudada. Os maiores rendimentos de açúcares redutores (38,04 %) foram obtidos na condição de validação (180°C e razão de líquido iônico:água de 1:20) com 10% de biomassa durante 12 horas. Além disso, uma dissolução da biomassa acima de 60% foi obtida após o pré-tratamento, relacionada à remoção de compostos, alterações das quais foram identificadas nas análises de caracterização, mostrando mudanças na estrutura da casca de arroz, com uma superfície mais exposta e acessível para a enzima e remoção de porções amorfas (como lignina e hemicelulose). Maiores rendimentos de açúcares redutores foram obtidos utilizando o líquido iônico [C₁₆MIM][Br] a partir da casca de arroz quando comparada com os rendimentos para a biomassa sem o pré-tratamento, podendo ser utilizado como uma alternativa de pré-tratamento de biomassa lignocelulósica para a obtenção de açúcares fermentescíveis.

Palavras-chave: Casca de arroz. Pré-tratamento. Líquido Iônico [C₁₆MIM][Br]. Hidrólise enzimática.

ABSTRACT

PRE-TREATMENT OF RICE HULLS USING [C₁₆MIM][Br] IONIC LIQUID

AUTHOR: Patrícia Daniela Bohn
ADVISOR: Raquel Cristine Kuhn
COADVISOR: Flávio Dias Mayer

Rice husk, an agricultural residue, is a cellulose rich material which present potential to produce second generation ethanol, however, due its recalcitrant structure related to the presence of lignin and silica, a pretreatment is necessary to broke down this structure. Many types of pretreatment could be applied, besides that ionic liquids pretreatment have been studied, because are considered green solvents which present characteristics as such biodegradability. In this study, rice husk was pretreated with ionic liquid 1-hexadecyl-3-methylimidazolium bromide [C₁₆MIM][Br] and the influence of ionic liquid:water ratio and temperature in reducing sugars yield after enzymatic hydrolysis was investigated using experimental design. Morphological and structural changes by scanning electron microscopy (SEM), x-ray diffraction (XRD), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and thermogravimetric analysis (TGA) were evaluated. Experimental design shows a positive influence of temperature in the pretreatment whereas ionic liquid:water ratio was not significance at the range evaluated. Validation assay at 180°C, 1:20 ionic liquid:water ratio, 10% of biomass for 12 hours was performed, an improvement in reducing sugars yield (38.04%) was observed in comparison with the untreated (0.18%). Moreover, a dissolution of biomass up to 60% was obtained after the pretreatment, which is related to removal of compounds, which were identified by characterization analysis, showing changes in rice husk structure as such an exposed and more accessible surface for the enzymes and removal of amorphous portions (such as lignin and hemicellulose). The [C₁₆MIM][Br] ionic liquid was effective on rice husk pretreatment, resulting in higher reducing sugars yield comparing to the yield of released sugar from rice husk without pretreatment, it could be used as alternative in the lignocellulosic biomass pretreatment to obtain fermentable sugars.

Keywords: Rice Husk. Pretreatment. [C₁₆MIM][Br] Ionic Liquid. Enzymatic Hydrolysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Composição do grão de arroz <i>in natura</i>	19
Figura 2 - Efeitos do processo de pré-tratamento na biomassa lignocelulósica.....	21
Figura 3 - Cátions e ânions formadores de líquidos iônicos	29
Figura 4 - Mecanismo de dissolução de celulose pelo líquido iônico [BMIM][Cl].....	31
Figura 5 - Estrutura líquido iônico [C ₁₆ MIM][Br]	38
Figura 6 - Representação esquemática da ação da enzima sobre a celulose gerando glicose	39
Figura 7 – Ensaio preliminares do FTIR	47
Figura 8 - Superfície de resposta dos efeitos da temperatura e da razão líquido iônico:água sobre o rendimento de açúcares redutores.....	51
Figura 9 - Imagens MEV da casca de arroz não tratada (a) e pré-tratada (b)	55
Figura 10 - DRX da casca de arroz não tratada e pré-tratada	56
Figura 11 - Espectro FTIR da casca de arroz não tratada (in natura) e pré-tratada. O comprimento de onda (cm ⁻¹) do FTIR: (a) 790; (b) 898; (c) 1085; (d) 1423; (e) 1511; (f) 1637; (g) 2919.....	57
Figura 12 - TGA/DTA/DTG da casca de arroz antes do pré-tratamento com líquido iônico	59
Figura 13 - TGA/DTA/DTG da casca de arroz após o pré-tratamento (A) Ensaio 1 e (B) Ensaio 5.....	61

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Aplicação de Líquidos Iônicos na dissolução de material lignocelulósico	33
---------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição da casca de arroz	20
Tabela 2 - Delineamento composto central rotacional (DCCR), valores reais e codificados (entre parêntesis) para avaliação do pré-tratamento de casca de arroz	49
Tabela 3 - Análise de Variância (ANOVA).....	50
Tabela 4 - Dissolução de biomassa após o pré-tratamento com LI.....	53
Tabela 5 - Composição Química da biomassa de acordo com a metodologia NREL	54
Tabela 6 - TGA/DTA da casca de arroz antes do pré-tratamento com líquido iônico	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ONU	Organização das Nações Unidas
CO ₂	Dióxido de Carbono
[C ₂ MIM][OAc] = [EMIM][OAc]	Acetato de 1-etil-3-metilimidazólio
[C ₂ MIM][Cl] = [EMIM][Cl]	Cloreto de 1-etil-3-metilimidazólio
[C ₄ MIM][OAc] = [BMIM][OAc]	Acetato de 1-butil-3-metilimidazólio
[C ₄ MIM][BF ₄] = [BMIM][BF ₄]	Tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazólio
[C ₂ MIM][Ac] = [EMIM][Ac]	Acetato de 1-etil-3-metilimidazólio
[C ₄ MIM][Cl] = [BMIM][Cl]	Cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio
[C ₁₆ MIM][Br]	Brometo de 1-hexadecil-3-metilimidazólio
CaCO ₃	Carbonato de Cálcio
[EMIM][Br]	Brometo de 1-etil-3-metilimidazólio
[EMIM][MePO ₃ H]	Metilfosfanato de 1-etil-3-metilimidazólio
[PrMIM][Cl]	Cloreto de 1-propil-3-metilimidazólio
[BMIM][Br]	Brometo de 1-butil-3-metilimidazólio
[HexMIM][BF ₄]	Tetrafluoroborato de 1-hexil-3-metilimidazólio
[Cho][OAc] = [Ch][OAc]	Acetato de Colino
DMSO	Dimetilsulfóxido
[EMIM][DEP]	Dimetil fosfato de 1-etil-3-metilimidazólio
[HMIM][Cl]	Cloreto de 1-hexil-3-metilimidazólio
[AMIM][Cl]	Cloreto de 1-alil-3-metilimidazólio
H ₂ O	Água
NMMO	N-óxido de N-metilmorfalina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 OBJETIVOS	18
2. REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1 CASCA DE ARROZ	19
2.2 PRÉ-TRATAMENTOS	21
2.2.1.1 Pré-tratamento físico	22
2.2.1.2 Pré-tratamento físico-químico	23
2.2.1.3 Pré-tratamento biológico	25
2.2.1.4 Pré-tratamento químico	25
2.2.1.4.1 Líquidos Iônicos	28
2.2.1.4.1.1 Brometo de 1-hexadecil-3-metilimidazol [C ₁₆ MIM][Br]	38
2.3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	39
3. MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA	41
3.2 LÍQUIDO IÔNICO	41
3.3 PRÉ-TRATAMENTO COM LÍQUIDO IÔNICO	41
3.4 REUTILIZAÇÃO DO LÍQUIDO IÔNICO	43
3.5 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	43
3.6 CARACTERIZAÇÃO DA CASCA DE ARROZ	44
3.6.2.1 Difração de Raio-X (DRX)	44
3.6.2.2 Espectrometria do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	44
3.6.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	45
3.6.2.4 Degradação térmica (TGA)	45
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	46
4.1 ENSAIOS PRELIMINARES	46
4.2 EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM LI	48

4.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA E ESTRUTURAL	54
4.4 REUTILIZAÇÃO DO LÍQUIDO IÔNICO.....	61
5. CONCLUSÃO.....	63
6. REFERÊNCIAS.....	64

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a ONU, a população mundial no ano de 2017 era de 7,6 bilhões e as projeções para o ano de 2030 são que este número atinja 8,6 bilhões. Apesar de uma sutil redução na taxa de crescimento populacional, estima-se que a população mundial continue aumentando, o que acarreta em uma demanda energética cada vez maior.

Desde a Revolução Industrial, a demanda energética do planeta é baseada em combustíveis fósseis (YOKOO, MIYAFUJI, 2014), os quais são provenientes de reservas limitadas. O crescimento demográfico, associado à necessidade cada vez maior de fontes fósseis acarreta em sua escassez, além disso, seu consumo está associado a diversos problemas ambientais devido à emissão de CO₂ proveniente da queima dos combustíveis fósseis (AMOAHA *et al.*, 2017; ELGHARBAWY *et al.*, 2016), o qual é ligado diretamente à poluição da atmosfera, grande causador do efeito estufa (BRANDT-TALBOT *et al.*, 2017).

Considerando o cenário político atual, relacionando a instabilidade dos preços dos combustíveis fósseis (AMOAHA *et al.*, 2017), as políticas ambientais e sociais (CHEN *et al.*, 2017) e a limitação das reservas fósseis (XU *et al.*, 2014), pesquisadores têm feito uma busca por fontes renováveis, limpas e sustentáveis de energia (CHEN *et al.*, 2017), como o etanol de segunda geração, proveniente de diferentes tipos de resíduos, ganhando destaque a biomassa lignocelulósica (MILANEZ *et al.*, 2015). Conforme, Tye *et al.* (2016), o termo biomassa lignocelulósica refere-se à celulose ligada a lignina presente na parede celular das plantas, sendo composta basicamente por celulose, hemicelulose e lignina e proveniente de resíduos agroindustriais.

A celulose, formada por unidades de D-glicose, e a hemicelulose, formada por diferentes tipos de pentoses, hexoses e açúcares podem ser convertidas a açúcares fermentescíveis para produzir etanol (PACHECO, 2011). Porém, a lignina presente, que é uma estrutura polimérica complexa, confere rigidez e impermeabilidade (MÄKI-ARVELA *et al.*, 2010) devido às fortes interações intra e intermoleculares na lignocelulose (ELGHARBAWY *et al.*, 2016), tornando necessária uma etapa de pré-tratamento da biomassa para transpor a recalcitrância da estrutura e tornar possível a produção de etanol de segunda geração.

As etapas para a produção de etanol de segunda geração envolvem o transporte da biomassa, a moagem ou trituração, o pré-tratamento, do qual são

obtidos a lignina, que pode ser destinada para combustão ou pode ser empregada em indústrias químicas, a celulose e a hemicelulose, que são hidrolisadas a glicose e xilose, respectivamente, e seguem então para as etapas de fermentação e destilação (HAHN-HÄGERDAL *et al.*, 2006).

Muitos tipos de pré-tratamento podem ser empregados: pré-tratamento físico (moagem, irradiação, micro-ondas), físico-químico (explosão a vapor, explosão de fibra de amônia, explosão com CO₂ supercrítico), químico (solventes orgânicos, álcali, ácido diluído e concentrado, líquidos iônicos), biológico (enzimas) ou a combinação destes (TAHERZADEH, KARIMI, 2008; KUMARI, SINGH, 2018).

Os líquidos iônicos atraem interesse dos pesquisadores por serem considerados solventes verdes, pois não formam gases tóxicos ou explosivos, além de apresentarem propriedades interessantes como baixa pressão de vapor, alta estabilidade térmica e química (ALVIRA *et al.*, 2010). Sua aplicação na dissolução de biomassa lignocelulósica gera alterações estruturais, como redução da cristalinidade da celulose e do conteúdo de lignina (LOPES *et al.*, 2013), melhorando a hidrólise enzimática, ou seja, sua conversão em açúcares (DADI *et al.*, 2007).

Muitos líquidos iônicos já foram descritos como efetivos no pré-tratamento de biomassas lignocelulósicas, como [C₂MIM][OAc], [C₂MIM][Cl], [C₄MIM][OAc], [C₄MIM][BF₄] (RAJ *et al.*, 2016), [C₂MIM][Cl], [C₂MIM][Ac] (AID *et al.*, 2016), [BMIM][Cl], [EMIM][Ac] (CHEENKACHORN *et al.*, 2016), inclusive com a casca de arroz, porém nenhum trabalho apresentou a aplicação do líquido iônico [C₁₆MIM][Br] para o pré-tratamento de biomassa até o momento. Portanto, o objetivo principal deste trabalho foi avaliar a aplicação do líquido iônico [C₁₆MIM][Br] no pré-tratamento da casca de arroz.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do líquido iônico [C₁₆MIM][Br] no pré-tratamento da casca de arroz para a obtenção de açúcares fermentescíveis.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Realizar a caracterização da biomassa antes e após o pré-tratamento através de FTIR, DRX, MEV e TGA;
- Avaliar o efeito do pré-tratamento na obtenção de açúcares fermentescíveis por hidrólise enzimática;
- Avaliar o efeito da razão de líquido iônico:água e da temperatura na etapa de pré-tratamento através de um planejamento experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR);
- Avaliar o reuso do líquido iônico na etapa de pré-tratamento.

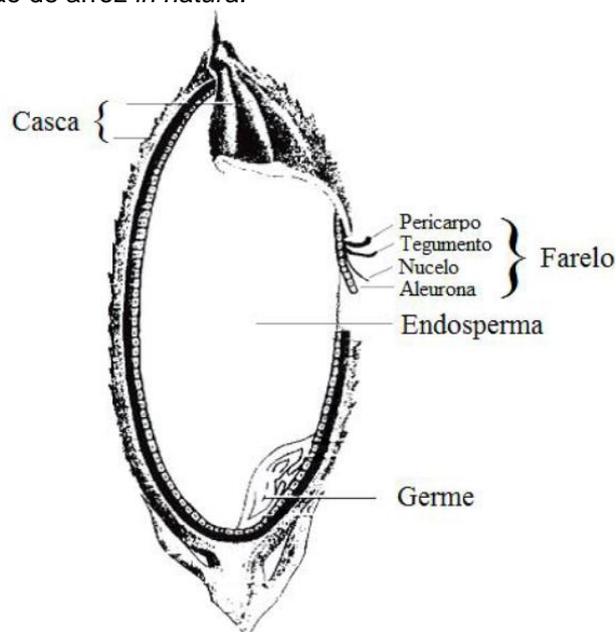
2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CASCA DE ARROZ

A economia brasileira é fortemente ligada à agricultura, baseada na cultura de arroz, milho, soja, trigo, algodão dentre outros, onde o arroz ocupa a segunda colocação em questão de produção e extensão de área cultivada, sendo que o país ocupava a nona posição na produção mundial em 2016, segundo a FAO (Food and Agriculture Organization). Dentre os estados brasileiros, o Rio Grande do Sul é responsável por aproximadamente 70% da produção e colheita do cereal (IBGE, 2018).

O arroz (*Oryzae sativa*) é formado basicamente pela casca, que corresponde de 20 a 33%, pelo farelo, que representa de 5 a 8% e pelo endosperma que é responsável pela maior parte do grão (em torno de 70%) (KIM *et al.*, 2004; MICHEL JR. *et al.*, 2016; SOARES, 2015), sendo sua estrutura apresentada na Figura 1. O arroz seco é separado da casca, através do processo de descascagem, onde é obtido o arroz integral, composto pelo farelo e o endosperma, e através do processo de polimento é retirado o farelo, obtendo-se o arroz branco ou polido. Conforme Walter *et al.* (2008), este grão é composto basicamente por amido (87,58%), e quantidades menores de proteínas (8,94%), lipídeos (0,36%), cinzas (0,30%) e fibras (2,87%).

Figura 1 - Composição do grão de arroz *in natura*.



Fonte: SOARES (2015).

Considerando que a safra de arroz 2017/18 no Rio Grande do Sul foi de 8,47 milhões de toneladas segundo o Boletim Final da Safra do Instituto Rio Grandense de Arroz (IRGA) e que destes, 20% corresponde à casca (LYNAM *et al.*, 2012), tem-se uma produção de casca de arroz de aproximadamente 1,69 milhões de toneladas. A casca de arroz é constituída, basicamente, por 33-36% de celulose, 12-26% de hemicelulose, 7-16% de lignina e 20% de cinzas (DÍAZ *et al.*, 2014; NDAZI *et al.*, 2007; JOHAR *et al.*, 2012; SAHA, COTTA, 2008).

Na Tabela 1 é apresentada a composição da casca de arroz, sendo os açúcares correspondentes à celulose e hemicelulose.

Tabela 1 – Composição da casca de arroz.

Componente da biomassa	Composição em base seca (wt%)
Glucano	38,9
Galactano	0,5
Xilano	20,4
Arabinano	3,4
Lignina	13,5
Extrativos	5,3
Cinzas	18,0
Total	100,0

Fonte: Kadam, Forrest e Jacobson, 2000 (adaptado).

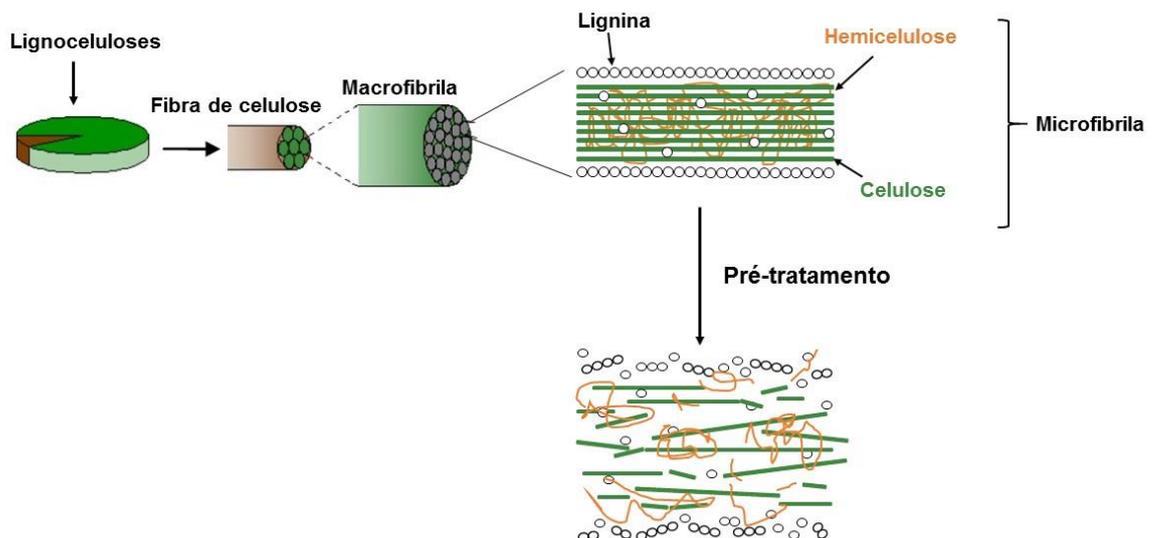
A casca de arroz é um resíduo agrícola, muitas vezes utilizada como fonte de energia através da queima, ou ainda queimada nas propriedades de forma não controlada causando impactos ambientais (JOHAR *et al.*, 2012; LYNAM *et al.*, 2012), pode, por apresentar uma composição rica em celulose e hemicelulose, ser convertida em açúcares, podendo ser utilizada para a produção de etanol de segunda geração, agregando valor a um resíduo que comumente é subutilizado. Porém, necessita passar por uma etapa de pré-tratamento para quebrar a estrutura compacta e recalcitrante da lignina, além de facilitar a acessibilidade da celulose e hemicelulose por enzimas celulolíticas (KOPPRAM *et al.*, 2014).

2.2 PRÉ-TRATAMENTOS

O conteúdo de lignina, o grau de polimerização, o tamanho de partícula, a cristalinidade da celulose e a área superficial são fatores que apresentam grande influência na conversão da celulose em açúcares monoméricos que podem ser fermentados (WU *et al.*, 2013; BANERJEE *et al.*, 2009). Diferentes pré-tratamentos tem sido propostos envolvendo processos físicos (moagem, trituração, irradiação, pirólise), físico-químicos (oxidação úmida, explosão de vapor, explosão de fibra por amônia - AFEX), químicos (álcali, ácido diluído, líquido iônico, solventes orgânicos), biológicos (enzimas) ou a combinação destes (ELGHARBAWY *et al.*, 2016, CHEN *et al.*, 2017).

A Figura 2 apresenta as mudanças na estrutura, remoção da lignina, aumento da área superficial e da porosidade, redução da cristalinidade da celulose, remoção de hemicelulose, despolimerização parcial da celulose, solubilização de hemicelulose e/ou lignina, com uma estrutura menos ordenada acarretando no aumento da acessibilidade à celulose a fim de hidrolisar os carboidratos poliméricos em açúcares fermentescíveis (BEHERA *et al.*, 2014; BINOD *et al.*, 2010; PEREIRA, 2015).

Figura 2 - Efeitos do processo de pré-tratamento na biomassa lignocelulósica.



Fonte: TAHERZADEH, KARIMI, 2008 (adaptado).

O pré-tratamento constitui em torno de 20% do custo total de processamento da biomassa para conversão em etanol (YANG, WYMAN, 2008), desta forma, este deve liberar efetivamente celulose e hemicelulose de forma rápida, apresentar baixo

consumo de energia e principalmente evitar a formação de inibidores do processo de fermentação (AMOAHA *et al.*, 2017).

2.2.1 Tipos de Pré-tratamentos

De forma geral, todos os pré-tratamentos tem por objetivo evitar perdas e degradação de açúcares redutores, evitar formação de subprodutos que interferem na conversão dos açúcares e/ou a utilização de reagentes químicos poluentes ou que possam ser corrosivos aos equipamentos, reduzir a geração de resíduos sólidos ou poluentes ao meio ambiente, além de controlar custos e viabilidade econômica do processo (CHEN *et al.*, 2017).

2.2.1.1 Pré-tratamento físico

O pré-tratamento físico aumenta a área superficial e o tamanho do poro da biomassa, diminuindo o grau de polimerização e a cristalinidade. Normalmente este tratamento causa menor poluição ambiental, e apesar de ser um processo relativamente simples, demanda alta energia que acarreta em maior custo no processo (SINGH *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2017).

Diversos processos de cominuição mecânica podem ser empregados, como moagem, a partir da utilização de diferentes moinhos, como de bolas, facas, sapatas, vibração, além de trituração e cortes em formatos de *chips*, que reduzem o tamanho da partícula da biomassa (BEHERA *et al.*, 2014; BINOD *et al.*, 2010; SINGH *et al.*, 2014). Esses métodos são comumente utilizados anteriormente a outros processos de pré-tratamento, facilitando-os e tornando-os mais efetivos pois com o tamanho de partículas reduzido aumenta-se a área de contato superficial (CHEN *et al.*, 2017; MAACHE-REZZOUG *et al.*, 2011). Elgharbawy *et al.* (2016) citam que a principal vantagem deste processo é a viabilidade econômica, porém apresenta como desvantagens o alto consumo de energia e a incapacidade de remover a lignina.

Outro método de pré-tratamento físico é a utilização de irradiação de feixe de elétrons sobre a biomassa, onde as ligações glicosídicas da celulose podem ser quebradas, reduzindo o grau de polimerização, perda na estrutura da celulose, menor poluição, aumento na taxa de conversão na hidrólise, além de ser ambientalmente amigável, porém é um procedimento caro, além de apresentar um alto consumo de

energia, tornando-o inviável industrialmente. Pode-se também empregar irradiação micro-ondas, que apresenta fácil operação e alta eficiência de aquecimento (aquecimento em curto espaço de tempo) que possibilita a modificação da estrutura da celulose, melhorando o rendimento de açúcares fermentáveis, porém requer alto investimento em equipamento ou ainda a utilização de ultrassom, que abre a estrutura cristalina da celulose e degrada lignina, contudo degrada também hemicelulose, o qual apresenta influência negativa na hidrólise enzimática (BINOD *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2017).

Além disso, a pirólise pode ser empregada como método de pré-tratamento para a conversão de biomassa lignocelulósica, onde a celulose é decomposta rapidamente quando empregadas temperaturas acima de 300°C liberando produtos gasosos e carvão residual, e para temperaturas menores a velocidade de decomposição da celulose é menor, resultando em uma conversão de aproximadamente 50% de glicose quando aplicada hidrólise ácida (FAN, GHARPURAY, LEE, 1987).

2.2.1.2 Pré-tratamento físico-químico

A explosão por vapor tem sido apresentada como um método de pré-tratamento de biomassa promissor, pois utiliza vapor em alta temperatura seguido por uma etapa de descompressão explosiva à pressão atmosférica (FERNÁNDEZ-BOLAÑOS *et al.*, 2001). Altas temperaturas, em torno de 200°C, promovem a auto hidrólise do grupo acetil da hemicelulose, que são convertidos em ácido acético, sendo desnecessário o emprego de ácidos para promover a hidrólise. Segundo Alvira *et al.* (2010), esta é a contribuição química do processo, já a contribuição física está relacionada ao efeito mecânico causado pela redução de pressão, onde as fibras são separadas pela descompressão explosiva. Assim, a remoção de hemicelulose e a solubilização dos componentes lignina e desfibração expõem a celulose aumentando a acessibilidade às enzimas (SINGH *et al.*, 2014). O emprego de maiores temperaturas acarreta em maior digestibilidade da celulose, porém aumenta a degradação de açúcares.

As maiores vantagens da utilização de explosão de vapor são sua viabilidade econômica, menor utilização de produtos químicos, eficiência energética, possível aplicação industrial, e menor impacto ambiental. Todavia, a degradação da hemicelulose e o rompimento incompleto da estrutura da lignina causam a geração de

alguns componentes tóxicos que inibem a etapa subsequente de conversão enzimática (ELGHARBAWY *et al.*, 2016; ALVIRA *et al.*, 2010; SINGH *et al.*, 2014; MAACHE-REZZOUG *et al.*, 2011).

Outro pré-tratamento físico-químico que tem sido muito estudado é a explosão de fibra por amônia (AFEX – *Ammonia Fiber Explosion*), onde a biomassa é exposta à amônia líquida em temperaturas moderadas, curto período de residência e pressão relativamente alta, sendo a pressão liberada rapidamente, afetando as características químicas e físicas da biomassa (alteração da lignina, cristalinidade da celulose, acessibilidade da superfície) (SUNDARAM, MUTHUKUMARAPPAN, 2016; KUMAR, *et al.*, 2009). Durante o processo, apenas uma pequena quantidade de biomassa é solubilizada, a hemicelulose é degradada em açúcares oligoméricos e ocorre remoção de grupamentos acetil, sendo que as alterações estruturais geram uma melhora na digestibilidade da biomassa e sua conversão na hidrólise enzimática, além disso, diferente de outros pré-tratamentos, o processo AFEX não gera uma corrente líquida, apenas material sólido pré-tratado (TEYMOURI *et al.*, 2005; BONNER *et al.*, 2015; ALVIRA *et al.*, 2010). Este processo não gera inibidores às etapas seguintes envolvendo enzimas, porém, para proteger o meio ambiente e diminuir os custos, a amônia deve ser recuperada e reutilizada, e a quantidade remanescente serve como nitrogênio para os micro-organismos dos processos sucessivos, não sendo necessária neutralização (TEYMOURI *et al.*, 2005; LAUREANO-PEREZ *et al.*, 2005; ALVIRA *et al.*, 2010; ELGHABAWY *et al.*, 2016).

Adicionalmente, outros dois pré-tratamentos físico-químicos são muito empregados: a oxidação úmida e água quente líquida, ambos solubilizando hemicelulose e lignina, com uma formação mínima ou nula de produtos de degradação. A oxidação úmida utiliza oxigênio ou ar como catalisador da reação, formando ácidos no processo de hidrólise e oxidação, que aumentam a digestibilidade da celulose. Carbonato de sódio normalmente é adicionado para diminuir a formação de inibidores. Sua principal desvantagem está relacionada ao custo do oxigênio e do catalisador. Já o processo utilizando água quente líquida não necessita de catalisadores ou outros produtos químicos, mas necessita de pressão para manter a água no estado líquido em altas temperaturas. Da mesma forma, solubiliza hemicelulose, despolimeriza parte da lignina e torna a celulose mais acessível ao ataque enzimático, porém a demanda de água e energia no processo são muito elevadas tornando inviável sua aplicação industrial (ALVIRA *et al.*, 2010).

2.2.1.3 Pré-tratamento biológico

Considerado um pré-tratamento ambientalmente amigável, o pré-tratamento biológico ou microbiano utiliza micro-organismos, majoritariamente fungos, para converter biomassa lignocelulósica. Normalmente é um processo mais simples, pois o fungo consegue crescer diretamente no substrato a ser tratado, não necessita de muita energia ou produtos químicos adicionais, opera em condições moderadas e não gera inibidores ou resíduos (ROUCHES *et al.*, 2016). Além disso, apresenta vantagem quando empregados fungos que degradam especificamente lignina, degradando pouca quantidade de hemicelulose e celulose, os chamados fungos de podridão branco (*white-rot fungi*) (MOOD *et al.*, 2013; ALVIRA *et al.*, 2010).

Alguns exemplos de *White-rot fungi* são *Phanerochaete chrysosporium*, *Ceriporia lacerata*, *Cyathus stercoleris*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Pycnoporus cinnabarinus* e *Pleurotus ostreatus* que apresentam alta eficiência de delignificação (ALVIRA *et al.*, 2010), pois são considerados fungos seletivos para degradação de lignina, relacionada a três enzimas principais, lignina peroxidase (LiP), manganase peroxidase (MnP) e lacase (Lac) (SINGH *et al.*, 2014; SHIRKAVAND *et al.*, 2016).

Entretanto, o longo tempo de duração, que pode variar de dias a semanas, o grande espaço requerido e a necessidade de monitoramento contínuo do crescimento dos micro-organismos, são as principais desvantagens para a sua aplicação em escala industrial (MOOD *et al.*, 2013; ROUCHES *et al.*, 2016; SINGH *et al.*, 2014).

2.2.1.4 Pré-tratamento químico

Um dos pré-tratamentos químicos mais utilizados emprega ácidos, mais comumente o ácido sulfúrico (H₂SO₄). Porém, outros ácidos como ácido clorídrico (HCl), nítrico (HNO₃), trifluoroacético (TFA), fosfórico (H₃PO₄), maleico, fórmico ou acético podem ser aplicados (CARVALHEIRO, DUARTE, GÍRIO, 2008; KUMARI, SINGH, 2018). Conforme Mood *et al.* (2013), o pré-tratamento pode ser aplicado com baixa concentração de ácido e alta temperatura (variando entre 120-160°C) ou com ácido concentrado e baixa temperatura, ambos hidrolisando hemicelulose à monossacarídeos e tornando a celulose mais suscetível ao ataque enzimático.

O emprego de ácido concentrado é mais eficiente na hidrólise de celulose, além de ser um processo mais econômico devido à baixa temperatura, porém apresenta significativos efeitos negativos, como toxicidade, corrosão, requer equipamentos construídos com materiais especiais, resistentes à corrosão, além de necessitar de recuperação do ácido e neutralização da biomassa anterior ao processo envolvendo micro-organismos, e são formados diversos produtos de degradação, que inibem a etapa enzimática (CARVALHEIRO, DUARTE, GÍRIO, 2008; PONNUSAMY *et al.*, 2019; TAHERZADEH, KARIMI, 2008; LI *et al.*, 2009), como ácido acético, furfural e h-hidroximetil furfural (HMF). Com isso, a utilização de ácido diluído torna-se mais atrativa para a aplicação industrial, pois além de remover hemicelulose, rompe a estrutura da lignina a aumenta o acesso à celulose, inibidores são formados em quantidades muito inferiores e é muito menos corrosivo que quando aplicado ácido concentrado (TAHERZADEH, KARIMI, 2008; KUMARI, SINGH, 2018; KUMAR *et al.*, 2009).

Componentes alcalinos como hidróxido de sódio (NaOH), hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), hidróxido de potássio (KOH), amônia aquosa (NH_3), hidróxido de amônia (NH_4OH) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (BEHERA *et al.*, 2014; KUMARI, SINGH, 2018), podem ser utilizados para realizar o pré-tratamento alcalino atuando sobre a estrutura da biomassa, aumentando a área superficial interna, diminuindo o grau de polimerização e a cristalinidade, quebrando as ligações entre a lignina e carboidratos, e rompendo a estrutura da lignina através das reações de saponificação, ligando hemicelulose a outros componentes (CARVALHEIRO, DUARTE, GÍRIO, 2008; BEHERA *et al.*, 2014). Além disso, o acesso enzimático à celulose aumenta devido à remoção de grupamentos acetil e substituições do ácido urônico na hemicelulose, promovendo uma digestibilidade da celulose.

O pré-tratamento pode ser realizado utilizando baixas temperaturas (normalmente temperatura ambiente), durante minutos, horas ou até dias (KUMAR *et al.*, 2009), variando conforme o tipo de substrato, contudo sendo mais efetivo em resíduos agrícolas que em resíduos de madeira (SINGH *et al.*, 2014; TAHERZADEH, KARIMI, 2008). Conforme Kumar *et al.* (2009), o processo causa menor degradação de açúcar quando comparado com o processo ácido, e muitos sais podem ser recuperados ou regenerados. O pré-tratamento utilizando cal (hidróxido de cálcio) remove lignina e tem um custo menor que NaOH e KOH, além de ser possível recuperá-lo da fração aquosa pela neutralização com CO_2 (KUMAR *et al.*, 2009; CHEN

et al., 2017). Além disso, o uso excessivo de NaOH pode causar inibição enzimática, salinização do solo e poluição da água (KUMARI, SINGH, 2018), e o uso de álcalis pode levar à conversão em sais irrecuperáveis e/ou sua incorporação à biomassa (BEHERA *et al.*, 2014).

Em adição, outros dois processos de pré-tratamento químico podem ser empregados, solventes orgânicos (organosolv) e ozonólise. Os organosolv são solventes orgânicos ou orgânicos aquosos, misturados com catalisadores orgânicos ou inorgânicos, que podem ser ácidos, como HCl ou H₂SO₄, ou básicos, como NaOH, NH₃, CaCO₃ (KUMARI, SINGH, 2018; KUMAR *et al.*, 2009), que rompem ou decompõem a rede da lignina e parte da hemicelulose, permitindo maior acesso à celulose na fase sólida. Solventes muito empregados no processo são acetona, metanol, etanol, trietileno glicol, etileno glicol, fenol aquoso, n-butanol aquoso, álcool tetrahidrofurfuril, e os ácidos orgânicos mais utilizados como catalisadores são acetilsalicílico, oxálico e salicílico (TAHERZADEH, KARIMI, 2008; KUMAR *et al.*, 2009). Normalmente etanol e metanol tem preferência em relação aos demais, devido ao alto custo dos solventes, sendo retirados, e recuperados por evaporação e condensação para diminuir estes custos, além de ser necessária sua remoção por ser inibidor para a hidrólise enzimática, fermentação ou digestão (BEHERA *et al.*, 2014; KUMAR *et al.*, 2009). Além disso, se ocorrer um aumento da temperatura, acima de 185°C, pode-se evitar o uso de catalisadores e obter-se deslignificação satisfatória igualmente (ALVIRA *et al.*, 2010).

Uma das principais vantagens desse processo é a obtenção de lignina pura, celulose e hemicelulose quase sem alterações estruturais, os quais são subprodutos de alto valor agregado (CHEN *et al.*, 2017). Ainda, conforme Papatheofanous *et al.* (1995), é possível obter uma remoção de lignina em torno de 70%, com uma mínima perda de celulose (em torno de 2%), quando combinado o processo organosolv com prévia hidrólise ácida em um fracionamento de dois estágios.

Da mesma forma, a ozonólise degrada lignina e parte da hemicelulose, porém não afeta a celulose (KUMAR *et al.*, 2009). O ozônio é um poderoso agente oxidante solúvel em água que tem a capacidade de quebrar lignina e liberar componentes solúveis como ácido fórmico e acético, sendo que as moléculas de ozônio são desintegradas em radicais hidroxilas, resultando na oxidação (KUMARI, SINGH, 2018). A ozonólise normalmente é realizada em temperatura ambiente, pressão normal e não forma qualquer inibidor ou substância tóxica, que podem afetar a

fermentação ou hidrólise subsequente, porém devido à grande demanda de ozônio, torna-se um procedimento bem caro (TAHERZADEH, KARIMI, 2008; KUMAR *et al.*, 2009; BEHERA *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2017).

Atualmente, um dos processos de pré-tratamento químico que tem sido muito estudado nos últimos anos é a aplicação de líquidos iônicos, os quais serão abordados no item seguinte.

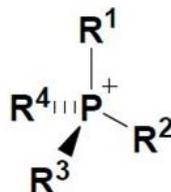
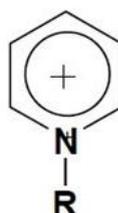
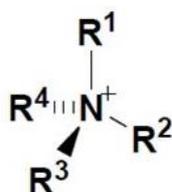
2.2.1.4.1 Líquidos Iônicos

Recentemente, os líquidos iônicos (LIs) têm despertado o interesse dos pesquisadores, desde que Swatloski *et al.* (2002) demonstraram sua capacidade de dissolução de biomassa lignocelulósica, e Yoon *et al.* (2012) e Yang e Fang (2015) apresentaram melhora na sacarificação enzimática para fins de produção de etanol de segunda geração, além de serem considerados sistemas de solventes “verdes”, ambientalmente amigáveis (IBRAHIM *et al.*, 2015).

Os líquidos iônicos são sais orgânicos com baixo ponto de fusão, normalmente apresentam-se na forma líquida em temperaturas inferiores a 100°C, sendo compostos por grandes cátions orgânicos e pequenos ânions inorgânicos, geralmente estáveis em ar e água (CHEN *et al.*, 2017; REDDY, 2015; CUNHA-PEREIRA, RECH, AYUB, 2016; ZHAO *et al.*, 2009; MEENATCHI, RENUGA, MANIKANDAN, 2017). Através das diferentes combinações de cátions e ânions, pode-se ajustar a diferentes propriedades físicas, químicas e biológicas dos LIs, tornando sua aplicação atrativa (VANCOV *et al.*, 2012; JIANG *et al.*, 2011), principalmente o emprego dos líquidos iônicos baseados em imidazoles. Alguns exemplos de cátions e ânions empregados estão apresentados na Figura 3.

Figura 3 - Cátions e ânions formadores de líquidos iônicos.

CÁTIONS:



ÂNIONS:



Fonte: SILVA, 2004 (adaptado).

Além disso, apresentam propriedades únicas: boa solubilidade, pressão de vapor negligenciável, não inflamabilidade, estabilidade térmica (em uma larga faixa de temperatura) e química, não volátil, alta condutividade iônica, ampla janela eletroquímica, habilidade de solvatação de componentes com ampla variedade de polaridades, incluindo componentes orgânicos, inorgânicos e poliméricos, e também são reutilizáveis, podendo assim ser aplicados em diferentes campos, incluindo catálise e biocatálise, separação, eletroquímica, plastificantes, dissolução e regeneração de polímeros naturais, nanomateriais (LIU *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2006; MEENATCHI, RENUGA, MANIKANDAN, 2017).

O primeiro líquido iônico foi descrito em 1914 por Walden, o nitrato de etil amônia ($[\text{EtNH}_3][\text{NO}_3]$), que apresentava um ponto de fusão de $12,5^\circ\text{C}$ (WANG, ZHU, LI, 2015; SINGH, KUMAR, 2008). Em 1934, Graenacher sugeriu que seria possível dissolver celulose utilizando o líquido iônico cloreto de N-etilpiridínio na presença de bases contendo nitrogênio, porém não foi dada muita atenção devido à baixa aplicabilidade, já em 2002, Swatloski *et al.* conseguiram descrever a dissolução e regeneração de celulose quando empregado o líquido iônico cloreto de 1-butil-3-metilimidazol ($[\text{C}_4\text{MIM}][\text{Cl}]$). Desde então, diversos líquidos iônicos, como $[\text{EMIM}][\text{Cl}]$,

[EMIM][Br], [EMIM][OAc], [EMIM][MePO₃H], [PrMIM][Cl], [BMIM][Br], [HexMIM][BF₄] tem sido empregados na dissolução de celulose (MÄKI-ARVELA *et al.* 2010).

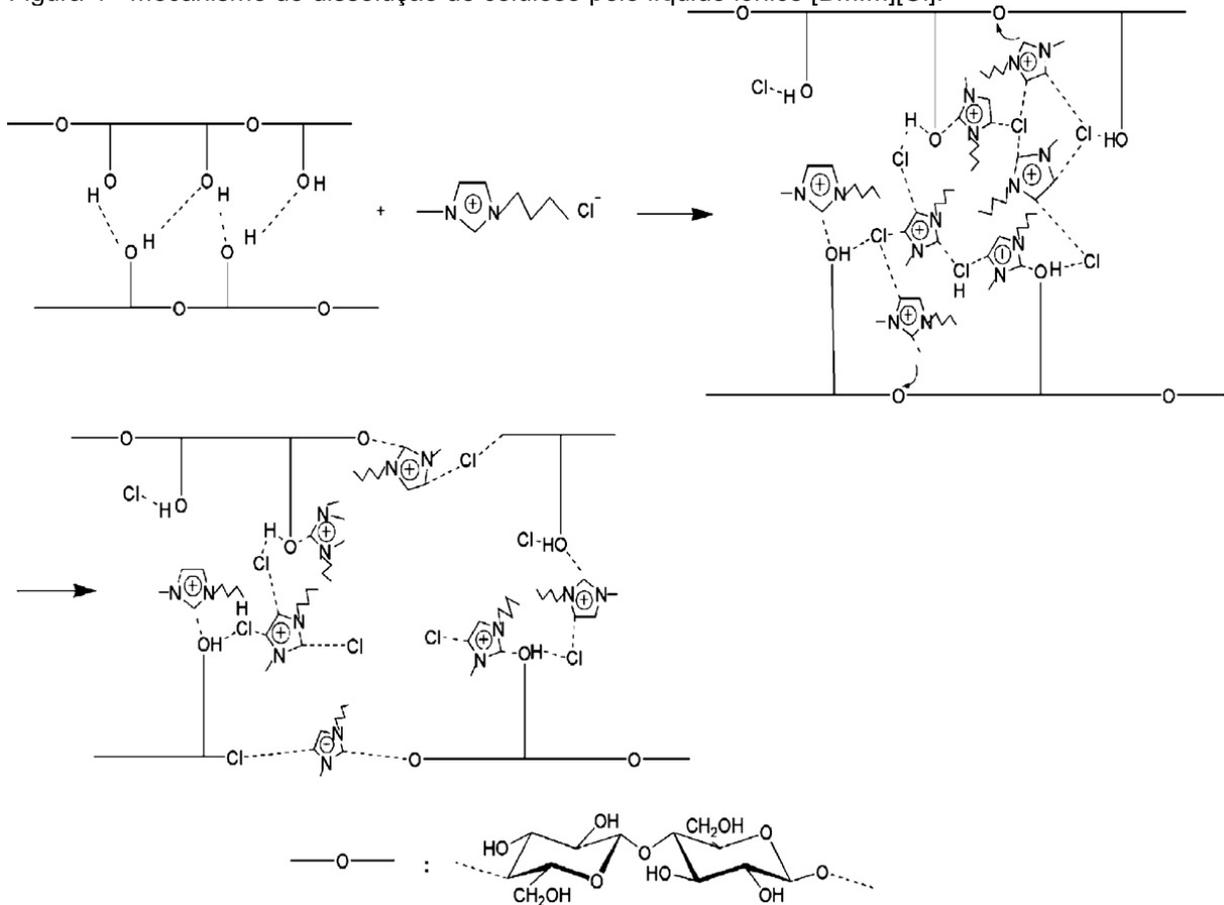
Algumas características dos LIs são o ponto de fusão, densidade e viscosidade. O baixo valor do ponto de fusão é atribuído à baixa eficiência de empacotamento dos íons assimétricos, e os líquidos iônicos baseados em imidazóis sofrem grande influência em seu ponto de fusão conforme o tamanho da cadeia, quanto maior a cadeia carbônica, maior o ponto de fusão (WANG, ZHU, LI, 2015). Geralmente, quanto maior o tamanho do cátion e do ânion, menor o ponto de fusão, bem como interações de dipolo induzido que interagem com as ligações de hidrogênio e podem aumentar o ponto de fusão (SILVA, 2004). Quanto a densidade e viscosidade, o tipo do cátion e do ânion apresentam influência, podendo apresentar ligações de hidrogênio e interações de van der Waals, determinantes para estas propriedades. De forma geral, a densidade é afetada pelo tamanho do cátion, onde menores densidades estão relacionadas a cátions mais volumosos. E a viscosidade está relacionada às interações eletrostáticas entre cátion e ânion, onde ligações de hidrogênio e van der Waals aumentam a viscosidade, bem como o tamanho da cadeia carbônica, que confere maior viscosidade para maiores cadeias (SILVA, 2004; WANG, ZHU, LI, 2015).

O líquido iônico é considerado solvente verde, com mínima toxicidade para os seres humanos e para o meio ambiente, gases tóxicos ou explosivos não são formados, criando uma química limpa e sustentável, além de ser considerado um “*design solvent*” pois possibilita combinar diferentes ânions e cátions com propriedades definidas, podendo ser desenvolvido para aplicações específicas (LIU *et al.*, 2012; MEENATCHI, RENUGA, MANIKANDAN, 2017; ZHANG *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2017). Somado à essa característica, a capacidade de dissolução da celulose em biomassa lignocelulósica, tornam os líquidos iônicos poderosos solventes, facilitando uma posterior hidrólise enzimática (PEREIRA, 2015), pois a celulose regenerada apresenta um grau de cristalinidade menor que a celulose *in natura*, melhorando a acessibilidade da enzima celulase às cadeias polissacarídeas (LEE *et al.*, 2009), além de ser mais amorfa e porosa (SWATLOSKI *et al.*, 2002).

Conforme Behera *et al.* (2014) o mecanismo de dissolução da celulose pelo líquido iônico envolve grupamentos hidroxila da celulose e forma complexos doadores e receptores de elétrons. Liu *et al.* (2011) propuseram um mecanismo do processo de interação entre o líquido iônico [BMIM][Cl] e as cadeias celulósicas (Figura 4), onde o

ânion Cl interage com a hidroxila protonada enquanto o cátion imidazólico [BMIM] interage com os átomos de oxigênio, além disso quebram as ligações β -1,4-glicosídicas causando a degradação de celulose, com um grau de polimerização menor para a celulose regenerada.

Figura 4 - Mecanismo de dissolução de celulose pelo líquido iônico [BMIM][Cl].



Fonte: LIU *et al.* (2011).

A celulose dissolvida pode ser regenerada, ou precipitada, quando adicionando um anti-solvente, como água, metanol, acetona ou etanol, mantendo a lignina e outros componentes dissolvidos, sendo que o anti-solvente pode ser separado do LI não volátil por destilação flash, recuperando o líquido iônico para ser reutilizado (DADI *et al.*, 2007; HAYES, 2009). O líquido iônico deve ser completamente separado da celulose regenerada, pois ele apresenta-se como um inibidor na etapa da hidrólise enzimática, desativando a enzima celulase (ZHAO *et al.*, 2009; NINOMIYA *et al.*, 2015).

A reciclagem e reutilização do LI são etapas chave para sua aplicação em larga escala, pois o líquido iônico apresenta um alto custo, necessitando assim que esse

processo seja eficiente para seu uso industrial (PRADO *et al.*, 2016; MAI *et al.*, 2014; ELGHARBAWY *et al.*, 2016). A facilidade de recuperação e reutilização auxilia na resolução de problemas ambientais como toxicidade e biodegradabilidade no descarte (MAI *et al.*, 2014), sendo que durante o processo, os desafios, conforme Badgujar e Bhanage (2015), são obter a completa recuperação e regeneração do produto, eliminar impurezas ou sub-produtos e manter a pureza e estabilidade do líquido iônico, onde vários processos, como destilação, adição de sais, mudanças de temperatura, adsorção, utilização de membranas e outros têm sido estudados (MAI *et al.*, 2014).

Quando aplicado na dissolução de materiais lignocelulósicos, verificou-se que os líquidos iônicos podem ser reutilizados diversas vezes, como descrito por Auxenfans *et al.* (2014), que reutilizaram 7 vezes o [C₂MIM][OAc] na solubilização de serragem sem qualquer alteração no pré-tratamento. Wu *et al.* (2011) verificaram que o rendimento na sacarificação de palha de milho não foi alterado após reutilizar 10 vezes o [EMIM][Ac], já Nguyen *et al.* (2010) conseguiram reciclar 20 vezes este mesmo líquido iônico na conversão de palha de arroz em glicose. O LI recuperado da celulose regenerada apresenta acúmulo de lignina solubilizada, que pode ser aplicada na produção de materiais poliméricos (VANCOV *et al.*, 2012).

Diversos pesquisadores têm descrito a dissolução de diferentes materiais lignocelulósicos utilizando líquidos iônicos, sendo alguns apresentados no Quadro 1.

Quadro 1 - Aplicação de Líquidos Iônicos na dissolução de material lignocelulósico.

(continua)

Biomassa	Líquido Iônico	Condições de Operação	Principais resultados	Referência
Palha de Trigo	[EMIM][Ac] em meio aquoso	1,5g biomassa, 50% LI, 150°C, 90 min.	Rendimento de açúcares após a hidrólise enzimática de 81%.	FU, MAZZA, 2011
Polpa de algodão	[EMIM][Ac] [BMIM][Cl]	15 g de LI, 90°C, 7 horas.	[BMIM][Cl] dissolveu em torno de 13% da biomassa, e [EMIM][Ac] apresentou solubilidade de 16%, porém Ac-pode formar derivados de celulose.	LIU <i>et al.</i> , 2011
Bagaço de cana de açúcar	[Cho][OAc]/cosolvente (DMSO)	1,5 g bagaço, 4,5 g LI+ cosolvente (1:1 w/w), 130°C, 180 min.	Taxa de sacarificação de 91% quando aplicado o LI puro, e 97,4% quando empregado LI e DMSO (1:1 w/w), diminuindo em 50% a quantia de LI.	ASAKAWA <i>et al.</i> , 2016
Palha de arroz	[EMIM][OAc], [BMIM][TFB] e [MOcIM][Cl]	0,2 g biomassa, 5 mL LI, 50-150°C, 4-12 h.	[EMIM][OAc] apresentou-se como sendo o melhor, com 46% de dissolução a 150°C e 12 horas, apresentando menor Crl. Emprego de nanofiltração para recuperação do LI.	GOGOI, HAZARIKA, 2017

Quadro 2 - Aplicação de Líquidos Iônicos na dissolução de material lignocelulósico.

(continuação)

Casca de soja	[BMIM][Ac]	12,5% carga de sólido (biomassa), 57% fração mássica de LI, 75°C, 165 min.	Obtenção de glicose de 92% após hidrólise enzimática.	CUNHA-PEREIRA, RECH, AYUB, 2016.
Talos de algodão, linho e acácia	[EMIM][OAc] e [EMIM][Cl]	4% w/w LI, 2 h, 80 e 120°C.	[EMIM][OAc] foi mais eficiente na remoção de lignina e hemicelulose, temperatura mais elevada favorece a eficiência da hidrólise.	KIM, AHN, KWAK, 2016.
Avicel	[BMIM][Cl]	50 mg de celulose e 950 mg de LI (5% w/w), 130 – 150 °C, 10 – 180 min. Regeneração com diferentes solventes.	Hidrólise enzimática da celulose regenerada foi 50 vezes maior que a celulose não tratada, metanol apresentou melhor resultado na regeneração, temperatura não influenciou o rendimento.	DADI, VARANASI, SCHALL, 2006.
Bagaço em pó	[Ch][OAc] e [EMIM][OAc]	0,5g de bagaço em pó, 5 g de LI, sonicado por 30 min, 25°C, 1-10 lavagens com água deionizada.	Com 5 lavagens após o pré-tratamento, foi obtido 82% de sacarificação da celulose e 59% da hemicelulose quando utilizado [Ch][OAc],	NINOMIYA <i>et al.</i> , 2015.

Quadro 3 - Aplicação de Líquidos Iônicos na dissolução de material lignocelulósico.

(continuação)

			apresentando-se melhor comparado com [EMIM][OAc].	
Serragem de abeto e carvalho	[EMIM][OAc]	2% w/v de serragem em LI, 110°C e 40 min. Reciclagem do LI por destilação em evaporador rotativo.	Biomassas apresentaram diminuição do conteúdo de lignina, capacidade de reciclagem e reutilização do LI acima de 7 vezes.	AUXEFANS <i>et al.</i> , 2014.
Casca de arroz	[BMIM][Cl], [EMIM][OAc] e [EMIM][DEP]	Razão 1,5% (w/v) de casca de arroz e líquido iônico, 100°C e 10 horas.	Celulose regenerada mais amorfa, menos cristalina, com grande ruptura da estrutura. [BMIM][Cl] e [EMIM][DEP] apresentaram maior deslignificação, mas [EMIM][OAc] possui maior rendimento de açúcares redutores.	ANG <i>et al.</i> , 2012.
Palha de soja e milho	[HMIM][Cl] e [AMIM][Cl]	0,2 g de biomassa, 5 g LI, 15/1 (w/w) H ₂ O/ biomassa, 70 °C e 3 condições de operação: (1) 180 min em ultrassom; (2) 180 min em	Emprego de [HMIM][Cl] assistida por ultrassom foi mais eficiente, sendo a melhor condição uma razão de 5 (w/w) água/amostra, 25 (w/w)	HU <i>et al.</i> , 2013.

Quadro 4 - Aplicação de Líquidos Iônicos na dissolução de material lignocelulósico.

(continuação)

		banho de óleo; (3) 60 min ultrassom e 120 min banho de óleo.	LI/amostra, 70 °C e 120 min em ultrassom, com rendimento de açúcares redutores de 53,27 mg para casca de soja e 50,03 mg para casca de milho.	
Palha de arroz	NMMO e [BMIM][OAc]	1g de biomassa, 19g de LI, 120°C e 1, 3 e 5 horas.	Após a hidrólise foi obtida uma conversão completa em glicose quando empregado [BMIM][OAc], e 96% de conversão para NMMO, sendo observada redução de cristalinidade. A sacarificação e fermentação simultânea resultaram em 93,3% e 79,7% de etanol para a palha tratada com [BMIM][OAc] e NMMO, respectivamente.	POORNEJAD, KARIMI, BEHZAD, 2013.
Palha de arroz	[EMIM][OAc]	5% biomassa em LI, 120°C e 5 horas.	75% de conversão de glicose, biomassa pré-tratada mais aberta e acessível, menos cristalina e com menores	POORNEJAD, KARIMI, BEHZAD, 2014.

Quadro 5 - Aplicação de Líquidos Iônicos na dissolução de material lignocelulósico.

(conclusão)

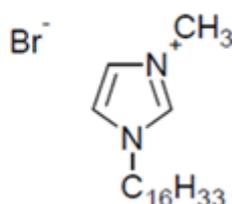
			concentrações de lignina e hemicelulose.	
Casca de arroz	[Ch][OH]	2 g de casca de arroz, 5 g de LI e 45 g de água deionizada, 60°C e 180 min e ultrassom.	43,5% de conversão em açúcares redutores em apenas 3 horas de hidrólise. Estrutura mais acessível, remoção de lignina, sílica e cinzas.	YANG, FANG, 2015.
Folha de Palmeira	[BMIM][Cl]	2-10 wt% de biomassa, 60-100°C e 15-60 min.	Recuperação de 100% de glicose em 15 min, 80°C e 10% de carga de sólido.	TAN, LEE, MOHAMED, 2011.
Casca de arroz	[EMIM][Ac], [HMIM][Cl] e [AMIM][Cl]	1 g de biomassa, 10 g de LI, 4 e 8 horas, 90-110°C.	Dissolução com [EMIM][Ac] a 110°C e 8 horas removeu toda a lignina presente na biomassa utilizando etanol para precipitação; [HMIM][Cl] a 110°C e 8 horas precipitou 20% de celulose utilizando água como co-solvente e 60% de hemicelulose precipitou com etanol.	LYNAM <i>et al.</i> , 2012.

Apesar de alguns autores descreverem que os líquidos iônicos não são tolerantes à umidade, pois a água reduziria a solubilidade da celulose e a efetividade do pré-tratamento (HOU, LI, ZONG, 2013a), e também competiria com os ânions do LI para formar ligações de hidrogênio com a celulose promovendo apenas dissolução parcial da lignocelulose (LOPES *et al.*, 2013), muitos estudos tem apresentado que a adição de água ao líquido iônico acarreta na diminuição dos custos, já que este normalmente apresenta custo elevado (ELGHARBAWY *et al.*, 2016; HOU, LI, ZONG, 2013b). Além de reduzir a viscosidade, facilitando seu manuseio e sua reciclagem pois não requer separação da água, o que também reduz a quantidade de energia necessária envolvendo esse processo de reciclagem (FU, MAZZA, 2011; SHI *et al.*, 2014), além de eliminar a formação de gel durante o pré-tratamento.

2.2.1.4.1.1 Brometo de 1-hexadecil-3-metilimidazol [C₁₆MIM][Br]

O líquido iônico brometo de 1-hexadecil-3-metilimidazol [C₁₆MIM][Br], empregado neste estudo, apresenta-se como um sólido branco em temperatura ambiente, cuja estrutura está representada na Figura 5, de massa molar equivalente a 387,45 g.mol⁻¹ (ZHANG *et al.*, 2006), temperatura do ponto de fusão em 337,06 K, entalpia de fusão (ΔH_m) de 152,563 J/g e capacidade térmica de 2,314 J/g K a 370,15 K (ZHU *et al.*, 2009).

Figura 5 - Estrutura líquido iônico [C₁₆MIM][Br].



Fonte: ANCHIETA, 2019.

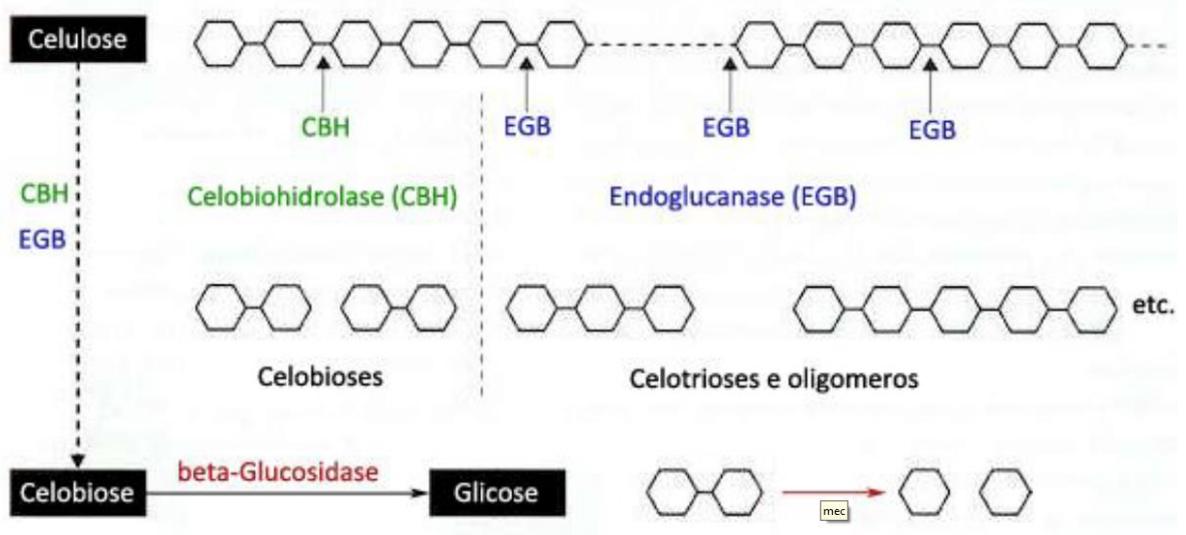
Este líquido iônico tem sido vastamente descrito para aplicação como surfactante (PINO *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2008, ADAK *et al.*, 2015) e também apresenta atividade antifúngica (PEREZ, ARCO, 2014). Entretanto, na literatura

nenhum trabalho até o momento tem sido descrito com sua aplicação no pré-tratamento de biomassa lignocelulósica para obtenção de açúcares fermentescíveis.

2.3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Após o pré-tratamento, a biomassa lignocelulósica necessita de uma etapa de hidrólise para obtenção dos açúcares fermentescíveis. A hidrólise enzimática tem sido muito aplicada nesse sentido, pois faz a conversão destes açúcares em condições mais brandas de processo, comparada com outras etapas de hidrólise, como a hidrólise ácida. A hidrólise enzimática envolve a quebra dos polímeros de celulose e hemicelulose por celulasas, convertendo a biomassa lignocelulósica em açúcares fermentescíveis (BINOD *et al.*, 2010; SRIARIYANUN *et al.*, 2015). As celulasas atuam diretamente sobre a celulose, convertendo-a em glicose, operando em condições moderadas, com temperatura variando entre 30 e 70°C (HAYES, 2009). Elas são um complexo enzimático composto por três enzimas: exoglucanase ou celobiohidrolase, endoglucanase ou carboximetilcelulase, e celobiose ou β -glucosidase, que podem ser obtidas de vários micro-organismos, como bactérias e fungos, e atuam em sinergia quebrando em pequenas moléculas e açúcares monoméricos (SRIARIYANUN *et al.*, 2016; HAYES, 2009), este efeito está representado na Figura 6.

Figura 6 - Representação esquemática da ação da enzima sobre a celulose gerando glicose.



Fonte: OGEDA (2011).

As endoglucanases, carboximetilcelulases ou endo-1,4- β -D-glucanases são responsáveis pela clivagem das ligações glicosídicas da estrutura amorfa da celulose, iniciando a hidrólise, onde oligossacarídeos com diferentes graus de polimerização são liberados, apresentando terminais redutores e não redutores. Essa fragmentação leva a uma rápida solubilização, pois há diminuição no grau de polimerização do complexo celulósico (VÁSQUEZ, 2007; HAYES, 2009). Já as exoglucanases ou celobiohidrolases degradam as cadeias redutoras ou não redutoras da região cristalina da celulose, liberando celobiose (HAYES, 2009). Por fim, as β -glucosidades ou celobiase hidrolisam a celobiose e também os oligossacarídeos solúveis em glicose. Tanto as celobiohidrolases como as celobiasas podem sofrer inibição por seus produtos, porém o efeito sinérgico resulta em um rendimento maior quando comparado à soma dos rendimentos individuais de cada enzima (VÁSQUEZ, 2007).

O rendimento da hidrólise enzimática pode ser afetado por diversos fatores, dentre eles: a temperatura, o tempo de reação, o tamanho da partícula, a relação sólido/líquido, o grau de polimerização e a configuração da cadeia da celulose, além da sua associação com outras estruturas poliméricas, como lignina, pectina, hemicelulose, proteínas e elementos minerais. A cristalinidade da celulose e o conteúdo de hemicelulose também são fatores que influenciam no resultado da hidrólise, além disso, as enzimas apresentam sensibilidade a contaminantes, como sílica (BINOD *et al.*, 2010; HAYES, 2009).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

A casca de arroz foi obtida em uma indústria da região central do Rio Grande do Sul (Santa Maria). Esta biomassa foi moída em moinho de sapatas (Marconi – modelo MA 880) e peneirada em partículas de tamanho menor que 150 µm antes do uso e armazenada em temperatura ambiente.

3.2 LÍQUIDO IÔNICO

O líquido iônico (LI) brometo de 1-hexadecil-3-metilimidazol ($[C_{16}MIM][Br]$) utilizado no pré-tratamento da biomassa foi preparado através da quaternização entre brometo de hexadecil (1-bromohexadecano) (Sigma-Aldrich) e o correspondente imidazólio (metilimidazol) (Sigma-Aldrich). O líquido iônico foi obtido misturando 0,139 mol do metilimidazol com 0,139 mol do brometo de alquila, ao qual foi adicionado um volume de acetato de etila correspondendo a 10% do volume total de reagentes. As reações foram conduzidas em autoclave de Teflon com camisa de aço inoxidável, sob condições isotérmicas estáticas e injeção de gás nitrogênio por 3 minutos antes do fechamento da autoclave. O rendimento máximo de quaternização ocorreu após 48 horas a 50°C. Após arrefecimento da autoclave, o produto da reação foi colocado em um evaporador rotativo durante 1 hora para remoção do acetato de etila. Quando eliminado o solvente, o produto sólido foi recristalizado de uma a três vezes com acetato de etila. A formação do líquido iônico foi confirmada por análise elementar (CHN) e ^{13}C MAS-NMR pelo espectrômetro Bruker DPX-400 (100,62 MHz) utilizando DMSO como solvente (ANCHIETA, 2019).

3.3 PRÉ-TRATAMENTO COM LÍQUIDO IÔNICO

3.3.1 Ensaios preliminares

Os ensaios preliminares foram realizados baseados na literatura (ANG *et al.*, 2011), utilizando shaker orbital durante 14 horas e uma variação de temperatura de

40°C a 70°C. Além disso, foram realizados testes em banho de óleo com agitação magnética (LYNAM *et al.*, 2012), utilizando temperaturas de 80°C a 120°C por 5 horas.

Por fim, foram realizados testes utilizando autoclaves de Teflon com camisa de aço inoxidável inseridas em estufa (DADI *et al.*, 2006) durante 12 a 24 horas, com temperaturas variando de 120°C a 160°C.

Diferentes concentrações de líquido iônico foram avaliadas e diferentes cargas de biomassa, variando de 1:1 a 1:30 e 4 a 10%, respectivamente.

3.3.2 Pré-tratamento com Líquido Iônico utilizando Planejamento Experimental

O pré-tratamento da casca de arroz foi realizada em autoclaves. 0,1g da casca de arroz foi misturada em diferentes concentrações do líquido iônico dissolvido em água (1g do líquido iônico foi dissolvida em diferentes volumes de água deionizada), os quais foram incubados em forno durante 12 horas em diferentes temperaturas, conforme planejamento experimental. As variáveis independentes avaliadas foram razão líquido iônico:água e temperatura, o rendimento de açúcares redutores foi a resposta. Os efeitos das variáveis sobre a resposta foram avaliados utilizando o software Statistica ® 7.0 (Stat Soft Ink, Tulsa, OK, EUA), considerando um nível de significância de 90%.

A carga de casca de arroz foi fixada em 10% no intuito de realizar o pré-tratamento de uma maior fração de biomassa em relação a uma menor quantidade de líquido iônico, pois este representa um alto custo nesta etapa (TAN, LEE, MOHAMED, 2011; LIU *et al.*, 2012; SHI *et al.*, 2014). Além disso, o tempo de pré-tratamento foi definido em 12 horas com base em experimentos prévios, onde maiores tempos de reação não apresentaram maior influência sobre a biomassa.

A escolha da faixa de temperatura (80 – 160°C) foi realizada conforme os ensaios preliminares, já a variação líquido iônico:água (1:5 – 1:30 g/mL) deu-se em virtude do líquido iônico estudado apresentar-se no estado sólido em temperatura ambiente, e ao ser atingido seu ponto de fusão ele apresenta alta viscosidade, sendo optado por dissolvê-lo em água deionizada a fim de facilitar seu manuseio, como já havia sido realizado por Fu e Mazza (2011), apresentando melhor interação com a biomassa e facilitando na separação e recuperação do mesmo.

Nos ensaios foram adicionados 10 mL de água deionizada a fim de regenerar a celulose dissolvida na reação e a mistura foi centrifugada a 4000 rpm durante 15 minutos em uma centrífuga Eppendorf (modelo 5804 R). O sobrenadante, contendo o líquido iônico dissolvido em água, foi separado da fração sólida, a qual corresponde à biomassa pré-tratada. As etapas de lavagem e centrifugação foram repetidas 4 vezes. Ao final, a casca de arroz (biomassa) pré-tratada foi seca em estufa a 60°C por 24 horas sendo caracterizada, conforme item 3.6.

3.4 REUTILIZAÇÃO DO LÍQUIDO IÔNICO

A reutilização do líquido iônico foi avaliada através da evaporação da água, a 50°C, após o líquido iônico ter sido separado da biomassa na primeira utilização no pré-tratamento. Primeiramente foi avaliada a aplicação direta do líquido iônico sem água. E também após a água ter sido evaporada, o líquido iônico seco foi lavado com 10 mL de acetato de etila e filtrado em funil de büchner. Este procedimento foi repetido 4 vezes a fim de obter uma maior separação de materiais lignocelulósicos extraídos juntamente com o líquido iônico após o pré-tratamento da biomassa, sendo então deixado em dessecador por 24 horas. Com o líquido iônico lavado e seco, a etapa de pré-tratamento foi realizada novamente nas condições de validação, sendo o líquido iônico pesado, dissolvido em água e misturado juntamente com a biomassa.

3.5 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

A hidrólise enzimática foi baseada na metodologia descrita por Nguyen *et al.*, (2010) com pequenas modificações. A atividade da enzima celulase Celluclast 1.5L® fornecida pela Novozyme (Denmark) foi determinada utilizando o procedimento de Ghose (1987). 0,1 g de biomassa pré-tratada foi adicionada em 0,215 mL de Celluclast (Novozymes) (atividade inicial de 8 UI, correspondente à soma de endo e exocelulase) e 1 mL de água deionizada sendo incubados em um agitador orbital (shaker) a 50°C por 72 horas e sob agitação de 120 rpm. Ao final, a quantidade de açúcares redutores obtida foi determinada pelo método ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959) e o rendimento de açúcares redutores (%) provenientes da hidrólise enzimática foi obtido pela razão entre a quantidade de açúcares redutores liberados após a hidrólise

enzimática e a quantidade de biomassa pré-tratada que foi hidrolisada, multiplicado por 100.

3.6 CARACTERIZAÇÃO DA CASCA DE ARROZ

3.6.1 Análise de Composição

A casca de arroz foi caracterizada antes e após o pré-tratamento conforme metodologia do National Renewable Energy Laboratory (NREL) com algumas adaptações, através do conteúdo de celulose, hemicelulose, lignina, cinzas e extrativos.

3.6.2 Características Morfológicas e Estruturais

As características morfológicas e estruturais da biomassa foram analisadas por de microscopia eletrônica de varredura (MEV), poder de difração de raio X (DRX), análise de espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e análise termogravimétrica (TGA).

3.6.2.1 Difração de Raio-X (DRX)

A cristalinidade da biomassa *in natura* e pré-tratada foi verificada na difração de raio X (DRX) (Rigaku Miniflex® 300), com radiação de Cu e $K\alpha$ ($\lambda = 1,54051 \text{ \AA}$) a 30 kV e 10 mA. A amostra foi escaneada em uma variação de 5 a 100° (2θ) com um scan step de $0,03^\circ$ e velocidade de escaneamento de 0,5 s. O índice de cristalinidade das amostras foi calculado conforme a Equação (1):

$$CrI(\%) = \frac{I_{002} - I_{am}}{I_{002}} \times 100 \quad (1)$$

Onde I_{002} é a intensidade máxima para a porção cristalina na amostra de casca de arroz em aproximadamente $2\theta = 22,6^\circ$, e I_{am} é a intensidade atribuída à porção amorfa da amostra de casca de arroz em $2\theta = \sim 18,7^\circ$.

3.6.2.2 Espectrometria do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A análise da estrutura química da biomassa foi realizada utilizando espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) empregando espectrômetro Shimadzu (modelo IR Prestige 21), com o método de pastilhas de KBr de transmitância direta. O número de scans foi de 45, a faixa de leitura das amostras foi de 400 a 4500 cm^{-1} com uma resolução de 2 cm^{-1} .

3.6.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As mudanças na estrutura morfológica da casca de arroz foram analisadas pelo microscópio eletrônico de varredura (Sigma 300VP), com FEG (Field Emission Gun) da Schotky (com filamento de tungstênio revestido com óxido de zircônio) equipado com uma coluna Gemini.

3.6.2.4 Degradação térmica (TGA)

Além disso, foi realizada uma análise da degradação térmica (TGA) das amostras de biomassa através da Termogravimetria Derivada (DTG) e Análise Térmica Diferencial (DTA) utilizando o equipamento da Shimadzu Modelo DTG-60H, com aquecimento da temperatura ambiente até 1000°C com uma taxa de 10°C min^{-1} sob atmosfera oxidativa (ar sintético inserido a 40 mL min^{-1}). Os dados da análise térmica foram registrados utilizando alumina como material de referência inerte.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

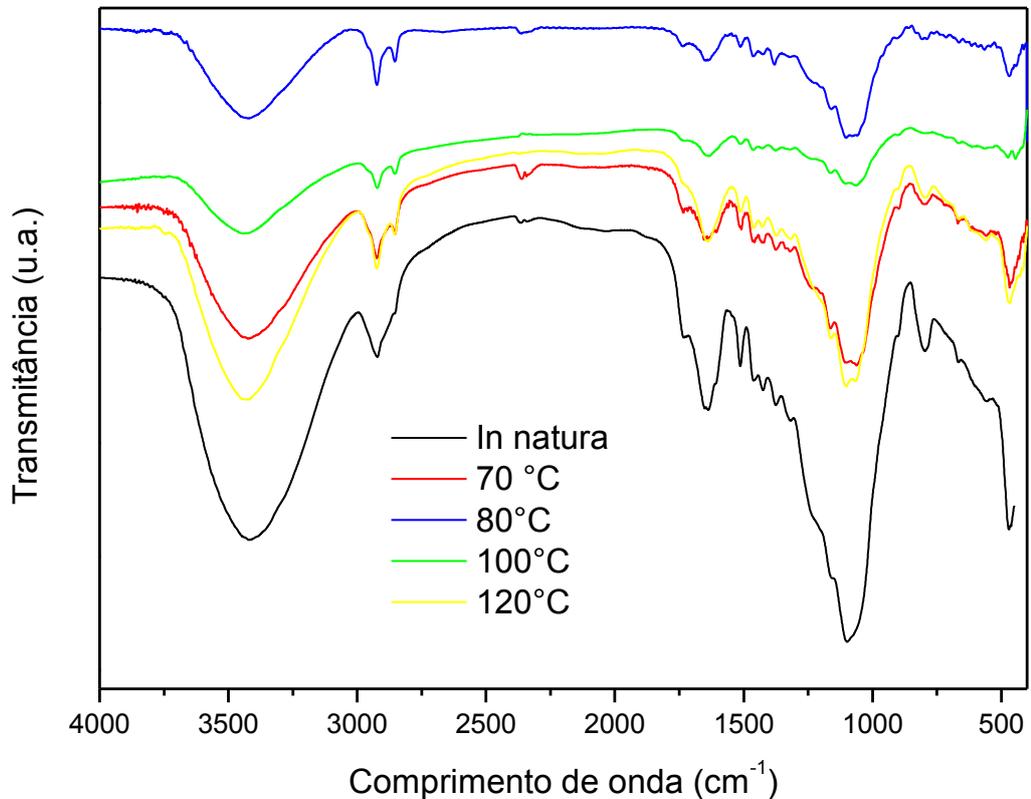
4.1 ENSAIOS PRELIMINARES

Os primeiros ensaios foram realizados utilizando 1 g de líquido iônico e 4% de biomassa e também a proporção de 1:1 (1 g de LI e 1 g de biomassa), inseridos em autoclave de teflon encamisada, durante 12 e 16 horas a 80°C, sendo observado que o líquido iônico apresenta uma alta viscosidade, formando um gel quando atingido seu ponto de fusão, acarretando na formação de duas fases distintas: o líquido iônico gelatinizado e a biomassa, não ocorrendo uma interação entre as duas fases. Além disso, quando adicionado água como anti-solvente com o intuito de realizar a separação das fases e regeneração da celulose, não foi possível realizar sua solubilização. Por este motivo o ensaio seguinte foi realizado utilizando o líquido iônico dissolvido em água deionizada, com uma carga de biomassa de 10% a fim de maximizar a quantidade de biomassa pré-tratada (TAN, LEE, MOHAMED, 2011), em agitador orbital com agitação de 100 rpm a 40°C por 14 horas, sendo a amostra lavada com 10 mL de água deionizada para separação do líquido iônico da biomassa e após separado, a biomassa foi seca e analisada por FTIR, não sendo observada nenhuma alteração nas bandas do espectro.

Em outro teste, 1 g do líquido iônico foi dissolvido em 10 mL de água deionizada e 10% de biomassa foram incubados em agitador orbital com rotação de 120 rpm a 70°C por 4h, após foi realizada a lavagem com 10 mL de água e filtração com funil de buchner e secagem da biomassa, na análise de FTIR foi observada uma alteração nas bandas em torno de 1100 cm^{-1} . Em seguida, elevou-se a temperatura para 80°C e o tempo para 24 horas com as mesmas concentrações de líquido iônico, água e biomassa, verificando-se novamente as alterações de forma mais acentuada.

Além disso, as mesmas condições foram testadas em banho de óleo sob agitação magnética e também elevando a temperatura para 100 e 120°C utilizando condensador de refluxo, sendo observada também alteração nas bandas do espectro infravermelho, conforme Figura 7. As principais bandas que sofreram alteração foram em torno de 1100 cm^{-1} , correspondente à lignina, celulose e hemicelulose, em 1457 cm^{-1} relacionada ao esqueleto aromático da lignina, em 790 cm^{-1} , onde são representadas as ligações de sílica, e em 1637 cm^{-1} onde são representadas as moléculas de água adsorvidas na biomassa.

Figura 7 – Ensaios preliminares do FTIR.



Como a análise do FTIR não é uma análise quantitativa, foi utilizada apenas para ter uma ideia a respeito das possíveis alterações na biomassa após o pré-tratamento. A etapa de hidrólise enzimática foi realizada após o pré-tratamento para quantificar os açúcares provenientes da biomassa após o pré-tratamento.

As reações de pré-tratamento foram testadas também em autoclave de teflon encamisada inserida em estufa, nas mesmas condições testadas em banho de óleo, sendo obtidos resultados da quantificação de açúcares após a hidrólise melhores quando comparados com os resultados da hidrólise da biomassa não tratada, confirmando assim que o pré-tratamento era efetivo. Com esta confirmação, foram avaliados diferentes tempos de pré-tratamento para a condição de 1 g de LI dissolvido em 10 mL de água deionizada, 10 % de biomassa, 120°C durante 6, 12, 18 e 24 horas. Através dos resultados obtidos, onde para 12 horas de reação foi obtido um rendimento de 8,3% e para 24 horas 9,2%, sendo verificado que tempos superiores a 12 horas não apresentaram aumento significativo na quantidade de açúcares redutores obtidos após a hidrólise.

A lavagem e separação do LI da biomassa foi avaliada por centrifugação, verificando-se uma menor perda de biomassa nesta etapa em relação à separação da biomassa do líquido iônico por filtração em funil de büchner.

A partir destes ensaios, foi então fixado o tempo de pré-tratamento em 12 horas. Para verificar a melhor condição do pré-tratamento, decidiu-se realizar um planejamento experimental, onde a faixa de temperatura foi definida com base nos ensaios realizados anteriormente e a razão líquido iônico:água deionizada foi baseada em testes de dissolução, onde foi verificada uma solução mínima utilizando 5 mL de água deionizada para 1 g de líquido iônico, sendo definida desta forma a faixa de 1:5 até 1:30 (g/mL).

4.2 EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM LI

4.2.1 Planejamento Experimental

Os dados experimentais do rendimento de açúcares redutores estão demonstrados na matriz apresentada na Tabela 2, na qual é possível verificar que o maior rendimento de açúcares redutores foi obtido para o Ensaio 8, onde a biomassa foi pré-tratada com uma razão líquido iônico:água de 1:20 (g/mL) a 160°C, resultando em 28,95% de açúcares. Já a menor quantidade de açúcares (7,99%) se deu na condição referente ao Ensaio 6, onde a razão líquido iônico:água era de 1:30 (g/mL) a 120°C. Quando comparado com o rendimento de açúcares redutores obtido para a biomassa não tratada, onde o rendimento corresponde à 0,18%, é possível visualizar que o pré-tratamento foi efetivo em relação à recuperação de açúcares a partir da biomassa, onde todos os ensaios obtiveram um resultado para o rendimento de açúcares redutores de no mínimo 44 vezes maior que o valor da biomassa *in natura*.

Tabela 2 - Delineamento composto central rotacional (DCCR), valores reais e codificados (entre parêntesis) para avaliação do pré-tratamento de casca de arroz.

Experimento	Razão Líquido Iônico:água (w/v)	Temperatura (°C)	Açúcares Redutores (%)
1	1:9,36 (-1)	92 (-1)	8,29
2	1:27,09 (+1)	92 (-1)	9,61
3	1:9,36 (-1)	148 (+1)	25,06
4	1:27,09 (+1)	148 (+1)	22,24
5	1:5 (-1,41)	120 (0)	15,51
6	1:30 (+1,41)	120 (0)	7,99
7	1:20 (0)	80 (-1,41)	8,37
8	1:20 (0)	160 (+1,41)	28,95
9	1:20 (0)	120 (0)	13,59
10	1:20 (0)	120 (0)	15,48
11	1:20 (0)	120 (0)	16,02
<i>In Natura</i>	-	-	0,18

Os dados da Tabela 2 foram usados para estimar os coeficientes de regressão da equação de segunda ordem utilizada para descrever a influência da razão de líquido iônico:água e da temperatura sobre o rendimento de açúcares redutores após o pré-tratamento e hidrólise da casca de arroz, sendo o modelo apresentado na Equação (2):

$$\text{Rendimento de açúcares redutores (\%)} = 15,025 - 1,516 * C - 1,37 * C^2 + 7,325 * T + 2,103 * T^2 - 1,035 * C * T \quad (2)$$

Onde C é a variável codificada para a razão líquido iônico:água e T representa a temperatura.

A análise de variância (ANOVA) está demonstrada na Tabela 3, a qual foi utilizada para avaliar a adequação do modelo aos dados obtidos.

Tabela 3 - Análise de Variância (ANOVA).

	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média dos Quadrados	F
Regressão	499,458	5	99,8916	30,9818
Resíduo	16,1210	5	3,2242	
Total	515,5790	10		

$$R^2 = 0,97$$

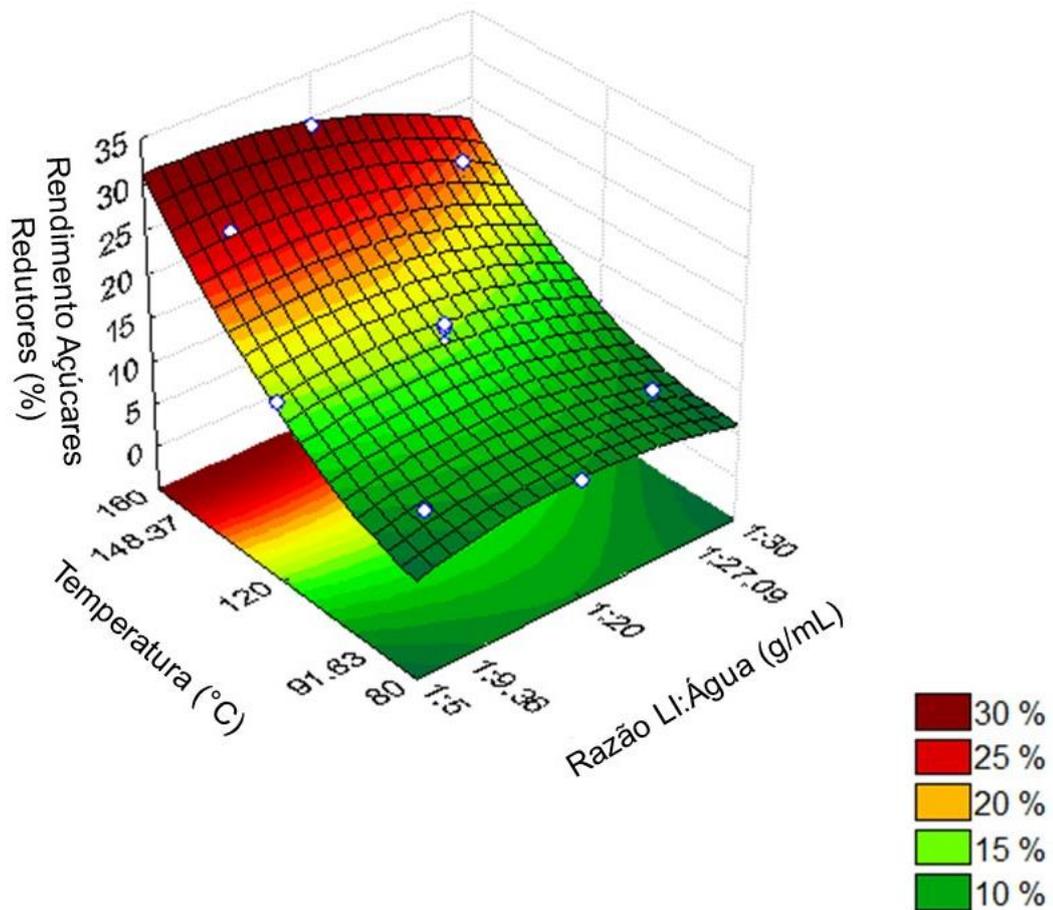
$$F_{0,1;5;5} = 3,45$$

O valor do R^2 fornece uma medida de quanto o modelo pode prever e explicar a variabilidade na resposta observada, onde o coeficiente de determinação obtido foi de 0,97, mostrando que o modelo desenvolvido foi significativo e o valor calculado de F ($F_{\text{calc}} = 30,98$) foi aproximadamente 9 vezes maior que o valor de F tabelado ($F_{\text{tab}} = 3,45$) mostrando assim que o modelo é preditivo. Além disso, a reprodutibilidade dos ensaios pôde ser demonstrada, pois os ensaios referentes ao ponto central (Ensaio 9, 10 e 11) apresentaram um desvio de 1%.

A equação do modelo codificada (Eq. 2) foi utilizada na geração da superfície de resposta para analisar o efeito da temperatura e da razão líquido iônico:água sobre o rendimento de açúcares redutores, a qual está apresentada na Figura 8. A figura demonstra que maiores temperaturas melhoram o rendimento de açúcares redutores, por outro lado, a razão de líquido iônico:água não apresentou influência significativa sobre a liberação destes açúcares. Isso pode ser observado nos ensaios 3 e 4, onde uma alta temperatura (148 °C) foi fixada em diferentes razões LI:água resultando em maiores rendimentos de açúcares redutores.

Na literatura há uma controvérsia no que diz respeito à utilização do líquido iônico dissolvido em água, pois Swatloski *et al.* (2002) descrevem que a presença de água juntamente com o líquido iônico [BMIM][Cl] diminuiu a dissolução de celulose, explicando que há uma possível competição nas ligações de hidrogênio com a celulose, inibindo a sua dissolução, além de formar HCl. Por outro lado, Fu e Mazza (2011) apresentaram uma melhora no rendimento de açúcares fermentáveis (81%) quando pré-trataram biomassa lignocelulósica com o líquido iônico [EMIM][Ac] diluído em água, comparado com o pré-tratamento da biomassa nas mesmas condições utilizando o líquido iônico puro (67%). Com isso, é possível verificar que a utilização de água juntamente do líquido iônico na etapa de pré-tratamento varia conforme as características de cada líquido iônico.

Figura 8 - Superfície de resposta dos efeitos da temperatura e da razão líquido iônico:água sobre o rendimento de açúcares redutores.



Pela Figura 8, é possível observar as condições ótimas para obtenção de açúcares redutores, portanto, foram realizados ensaios de validação aumentando a temperatura para 180°C, devido ao seu efeito positivo na resposta, e mantendo a razão LI:água em 1:20, correspondente ao ponto central, já que não apresentou efeito na faixa avaliada no planejamento. O rendimento de açúcares redutores foi de 38,04 ± 2,1%, o que está de acordo com o valor predito pelo modelo para esta condição (39,93%). Na condição de validação foram obtidos valores superiores aos obtidos no planejamento de experimentos, o que era esperado devido às condições ensaiadas.

A temperatura apresentou uma grande influência sobre o rendimento de açúcares redutores. Alguns autores também observaram o aumento no rendimento de açúcares pela influência da alta temperatura no pré-tratamento de palha de arroz, como Sriatyanun *et al.* (2015) que obtiveram 68,26% de açúcares com 50% de [AMIM][Cl] a 150°C, e ainda Cheenkachorn *et al.* (2016) com 90% de rendimento de

glicose no pré-tratamento de palha de arroz com [EMIM][Ac] a 128,4°C. Ang *et al.* (2013) pré-trataram casca de arroz com diferentes reagentes, obtendo um comportamento similar: melhora nos açúcares obtidos quando utilizado ácido clorídrico a alta temperatura (125°C), com 0,5 % (g/mL) de HCl em 1,5 h obtendo 22,3 mg de açúcares redutores totais. O aumento da temperatura associado com o aumento do processo de deslignificação e o acesso enzimático à biomassa pode ser explicado pela desestabilização das ligações de hidrogênio na estrutura da celulose (HOU *et al.*, 2012; GOGOI, HAZARIKA, 2017; CUNHA-PEREIRA, RECH, AYUB, 2016).

Até o presente momento, não foi encontrada nenhuma informação descrevendo o pré-tratamento da casca de arroz utilizando o LI [C₁₆MIM][Br], entretanto diversos autores descreveram o pré-tratamento da casca de arroz utilizando outros líquidos iônicos. Poornejad, Karimi, Behzad (2013) pré-trataram palha de arroz com NMMO e [BMIM][OAc] a 120°C e 5 horas, sendo que a completa conversão de glicose foi obtida com 5% de biomassa utilizando [BMIM][OAc] e 96% de rendimento da hidrólise com NMMO. Os mesmos autores descreveram o tratamento utilizando [EMIM][OAc] a 120°C e 5 horas, resultando em 75% de rendimento de glicose (POORNEJAD, KARIMI, BEHZAD, 2014).

Ang *et al.* (2012) comparou três líquidos iônicos [BMIM][Cl], [EMIM][OAc] e [EMIM][DEP] no pré-tratamento de casca de arroz (razão de 1,5% (w/v) de casca de arroz:líquido iônico) a 100°C durante 10 horas, obtendo 42,1% de rendimento de açúcares redutores para [EMIM][OAc], 39,9% para [EMIM][DEP] e 28,6% para [BMIM][Cl]. Além disso, Lynam *et al.* (2012) removeram completamente lignina da casca de arroz a 110°C em 8 horas utilizando 10 g de [EMIM][Ac] para 1 g de casca.

Outros estudos combinando líquido iônico com diferentes pré-tratamentos também obtiveram melhoras na obtenção de açúcares redutores, como na combinação de [AMIM][Cl], explosão de vapor e branqueamento de celulose isolada e também na combinação de líquido iônico com prensa de parafuso (SRIARIYANUN *et al.*, 2015; JIANG *et al.*, 2011).

4.2.2 Dissolução da biomassa no pré-tratamento

Na Tabela 4 estão apresentadas informações a respeito da dissolução da biomassa após o pré-tratamento com o líquido iônico [C₁₆MIM][Br].

Tabela 4 - Dissolução de biomassa após o pré-tratamento com LI.

Ensaio	Temperatura (°C)	Dissolução de biomassa (%)
1	91,63	10,09
2	91,63	11,72
3	148,37	45,91
4	148,37	41,23
5	120	33,76
6	120	19,55
7	80	11,85
8	160	48,50
9	120	22,87
10	120	23,26
11	120	25,03

Alta dissolução de biomassa está relacionada com maiores temperaturas (140 a 160°C), sendo que a maior temperatura de pré-tratamento (Ensaio 8) resultou em uma dissolução da biomassa de 48,5%, já em temperaturas mais baixas, entre 80 e 90°C as dissoluções de biomassa após o pré-tratamento com o líquido iônico foram em torno de 11%. No ponto de validação, com temperatura de 180°C, a dissolução correspondeu a aproximadamente 60%. Hou *et al.* (2012) também observaram um comportamento similar, que associaram as temperaturas mais elevadas à remoção de polissacarídeos da palha de arroz.

Esta dissolução da biomassa também pode ser associada com altos rendimentos de açúcares redutores, sendo que isso pode ser explicado porque o líquido iônico remove alguns componentes da biomassa, ao mesmo tempo que certa quantia de celulose e hemicelulose já é hidrolisada a açúcares. E ainda, estes açúcares que foram hidrolisados possivelmente são arrastados junto com o líquido iônico após o pré-tratamento, quando este é separado da casca de arroz, antes da hidrólise enzimática.

4.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA E ESTRUTURAL

A caracterização das amostras foi realizada antes e após a hidrólise enzimática, na condição de validação do planejamento de experimentos.

4.3.1 Composição Química

A composição da casca de arroz antes e após o pré-tratamento está demonstrada na Tabela 5. Os resultados indicam uma redução em ambos conteúdos de celulose, hemicelulose e lignina na casca de arroz após o pré-tratamento, que pode estar associado à interação entre o líquido iônico empregado ($[C_{16}MIM][Br]$) e a biomassa (LYNAM *et al.*, 2012; YANG, FANG, 2015). É importante notar que este líquido iônico não havia sido empregado no pré-tratamento de biomassa até o momento, e apresenta propriedades diferentes de outros líquidos iônicos já estudados, como sua estrutura química, viscosidade e ponto de fusão.

Tabela 5 - Composição Química da biomassa de acordo com a metodologia NREL.

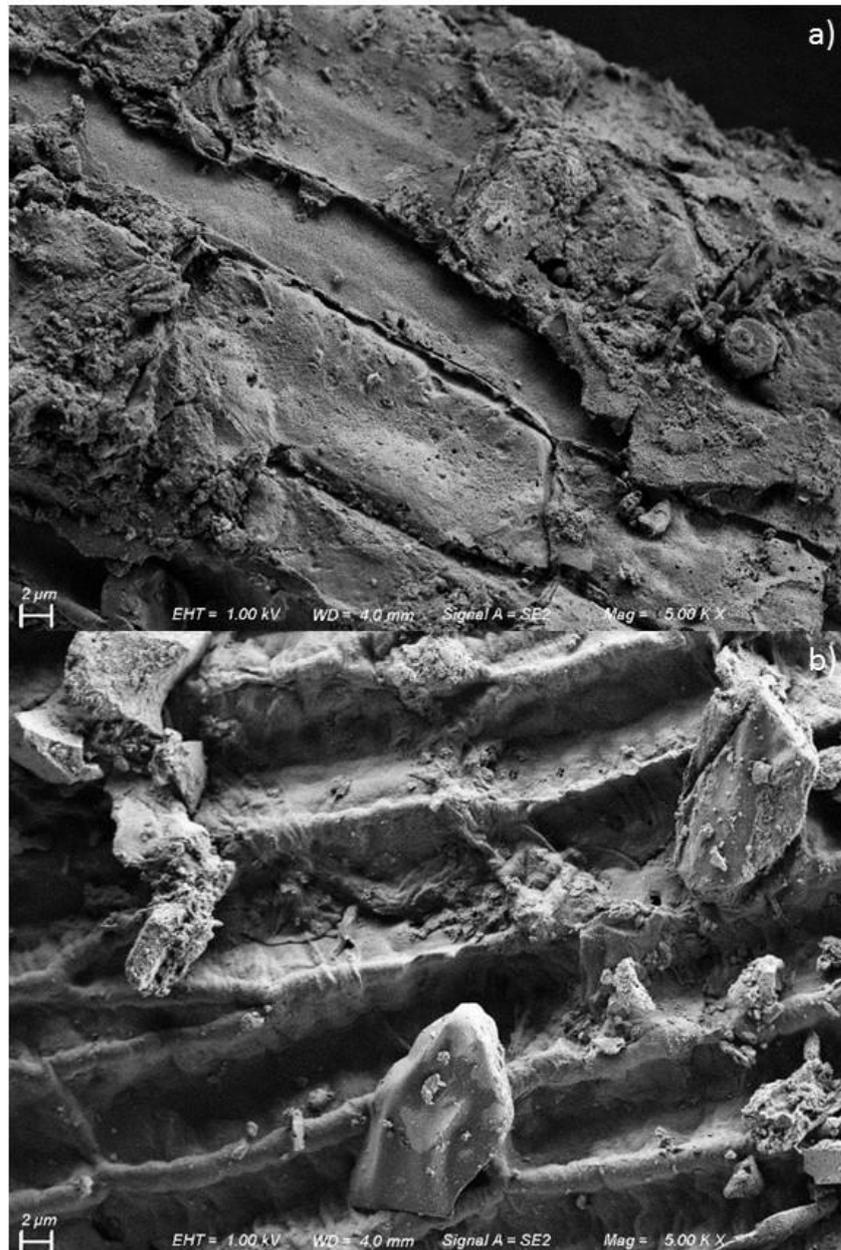
Composição Química	Casca de arroz não tratada (wt%)	Casca de arroz pré-tratada com líquido iônico (wt%)
Celulose	38,56	21,05 ± 2,38
Hemicelulose	13,7	0,6 ± 0,55
Lignina	21,08	12,26 ± 0,15

4.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

A estrutura morfológica da casca de arroz antes e após o pré-tratamento com líquido iônico através de microscopia eletrônica de varredura são mostradas na Figura 9. A casca de arroz que não foi tratada (Figura 9a) apresenta uma morfologia empacotada, rígida, ordenada e não porosa, a qual dificulta o acesso enzimático, principalmente por causa da complexa estrutura da lignina (POORNEJAD, KARIMI, BEHZAD, 2013; EBRAHIMI *et al.*, 2017). As modificações na morfologia da casca de arroz são apresentadas na Figura 9b, onde a estrutura compacta foi convertida em uma estrutura mais acessível e desordenada após o pré-tratamento, podendo estar

associado à remoção de compostos presentes na casca de arroz, como lignina e sílica, o que pode auxiliar na etapa da hidrólise enzimática, facilitando o acesso da enzima à celulose.

Figura 9 - Imagens MEV da casca de arroz não tratada (a) e pré-tratada (b)

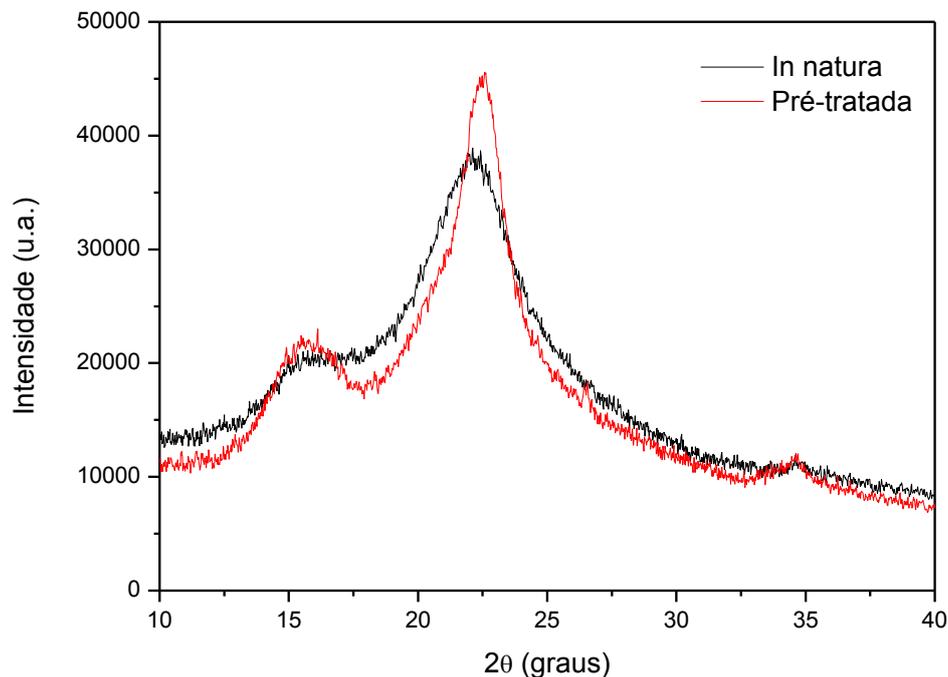


4.3.3 Difração de Raio-X

A estrutura cristalina da casca de arroz foi analisada por difração de raio x (DRX), possibilitando também calcular seu índice de cristalinidade a partir da intensidade de picos específicos. Normalmente uma melhora na hidrólise enzimática

está associada a baixos valores do índice de cristalinidade, o que significa uma área superficial mais acessível para as enzimas (YOON *et al.*, 2012; GOGOI, HAZARIKA, 2017). A Figura 10 mostra um aumento no grau de cristalinidade após o pré-tratamento com líquido iônico, o qual é evidenciado pelo pico mais intenso em $2\theta = 22^\circ$, que corresponde à celulose tipo I, e também um aumento no índice de cristalinidade (CrI) de 40,6% da biomassa não tratada (*in natura*) para 59,5% após o pré-tratamento da biomassa. Este alto índice de cristalinidade é devido à remoção de regiões amorfas, como a lignina e hemicelulose presentes na biomassa (KIM, LEE, KIM, 2016). Alguns estudos anteriores apresentaram um comportamento similar para a cristalinidade que também foi associado à alta temperatura de pré-tratamento e a clivagem hidrolítica das ligações glicosídicas (ANG *et al.*, 2012; JOHAR *et al.*, 2012; HOU *et al.*, 2012; ANG *et al.*, 2013; YANG, FANG, 2015; GAO *et al.*, 2019).

Figura 10 - DRX da casca de arroz não tratada e pré-tratada.

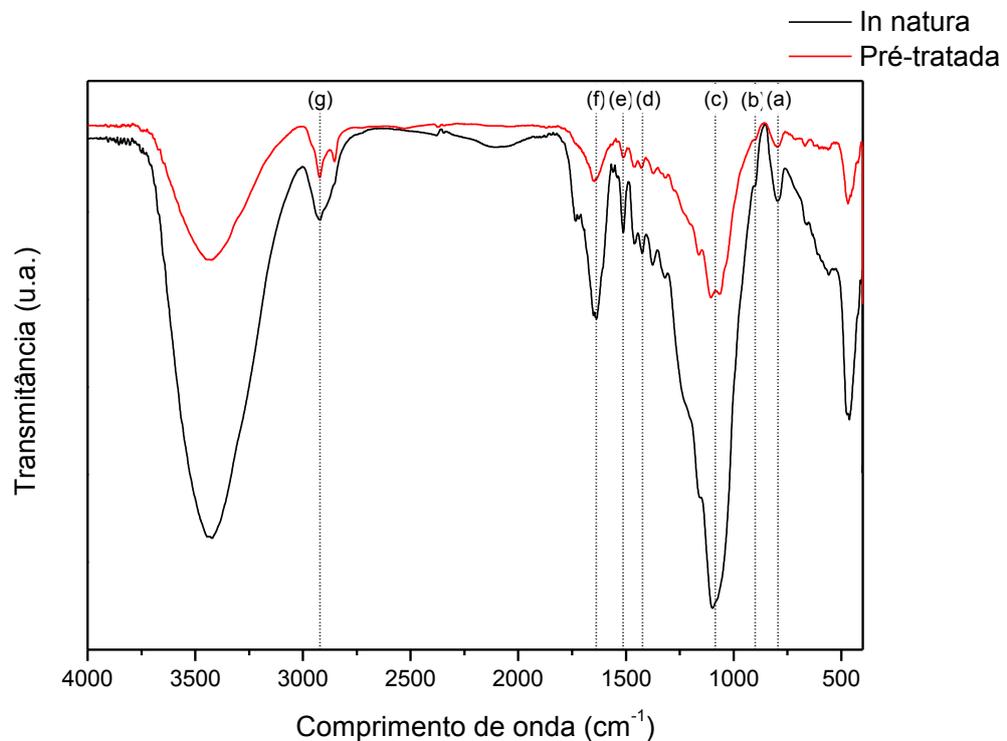


Como foi verificado na imagem MEV (Figura 9b), grande quantidade de material orgânico foi removido da superfície do material pré-tratado, podendo ser relacionado à redução de material amorfo.

4.3.4 Espetrometro Infravermelho com Transformada de Fourier

Os grupos funcionais da casca de arroz antes e após o pré-tratamento com líquido iônico foram analisadas por espectrometria infravermelha com transformada de Fourier (FTIR), e o espectro está apresentado na Figura 11. Ambos os perfis são similares e as principais bandas de absorção associadas ao espectro da casca de arroz nativa são 790, 898, 1085, 1423, 1511, 1637 e 2919 cm^{-1} .

Figura 11 - Espectro FTIR da casca de arroz não tratada (in natura) e pré-tratada. O comprimento de onda (cm^{-1}) do FTIR: (a) 790; (b) 898; (c) 1085; (d) 1423; (e) 1511; (f) 1637; (g) 2919.



A vibração de alongamento C-O correspondente a ambos celulose/hemicelulose e lignina em aproximadamente 1035 cm^{-1} têm sido proposta como uma ligação associada com a presença da matriz lignina-carboidrato na biomassa. Estas bandas exibiram uma redução na absorbância após o pré-tratamento, que pode ter resultado da dissolução de celulose-hemicelulose durante o aquecimento (GUO *et al.*, 2008; ANG *et al.*, 2012; YANG, FANG, 2015). As bandas em torno de 898 cm^{-1} , que correspondem ao alongamento C-O e a vibração C-H na celulose, e em aproximadamente 2929 cm^{-1} , que representa, as vibrações ou alongamento C-H do material rico em celulose, não apresentaram alterações

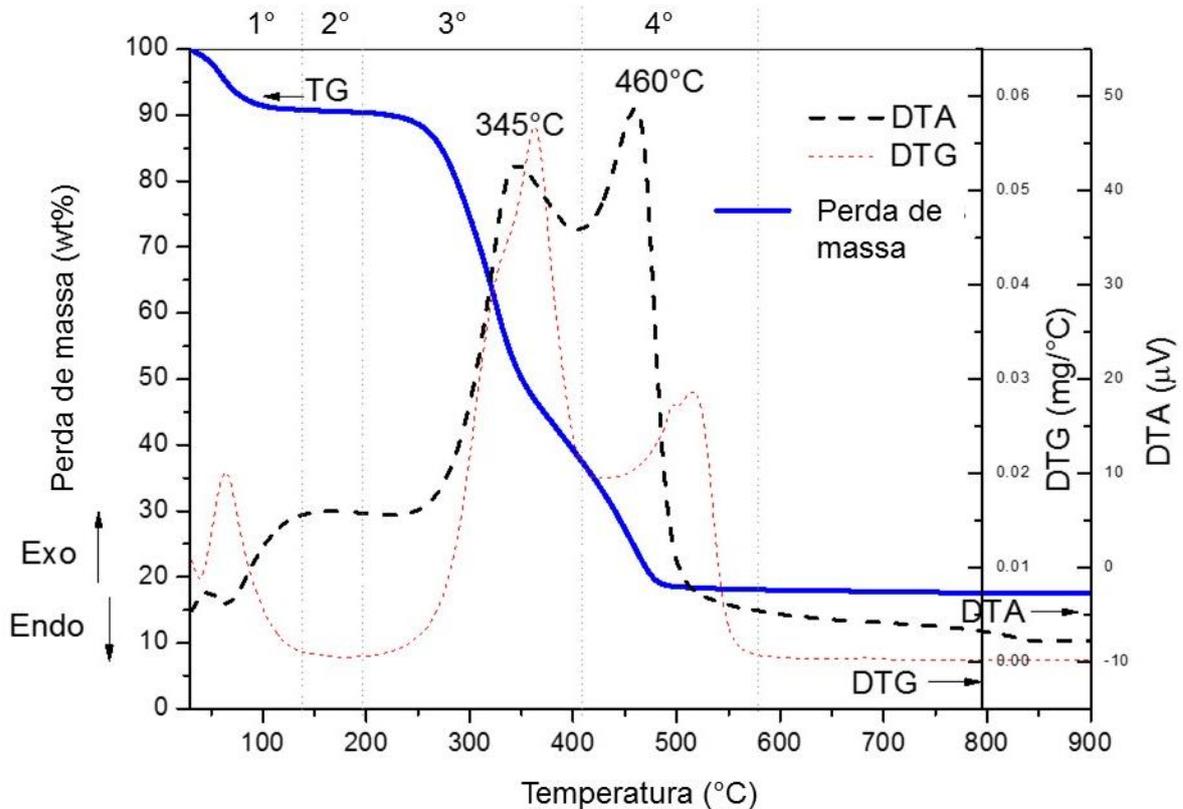
significativas após o pré-tratamento, indicando que as características da celulose na casca de arroz foram mantidas mesmo após o pré-tratamento. Entretanto, as ligações de sílica representadas na banda de 790 cm^{-1} , vibração de alongamento C-O na celulose/hemicelulose em 1085 cm^{-1} e os alongamentos do esqueleto aromático da lignina em 1423 e 1511 cm^{-1} foram reduzidos após o pré-tratamento com o líquido iônico, sugerindo a remoção de sílica e lignina e também pode ser relacionada à destruição da sua estrutura rígida (YANG, FANG, 2015). Além disso, a redução da absorção em 1637 cm^{-1} está associada à água adsorvida na biomassa, desde que a biomassa nativa tem uma afinidade maior com a água quando comparada com a biomassa pré-tratada (JIANG *et al.*, 2011).

4.3.5 Análise Termogravimétrica

A análise termogravimétrica (TGA) foi utilizada para quantificação de hemicelulose, celulose e lignina na casca de arroz antes do pré-tratamento. O material lignocelulósico apresentou uma mistura de aproximadamente 53 wt% de hemicelulose e celulose e 19% de lignina, sendo que estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos durante a caracterização da biomassa que foram apresentados na Tabela 6.

A análise termogravimétrica em atmosfera O_2 foi ativada para avaliar a decomposição da biomassa. A Figura 12 mostra os perfis para o TGA, análise térmica diferencial (DTA) e termogravimetria derivativa (DTG) em atmosfera oxidante da casca de arroz antes do pré-tratamento.

Figura 12 - TGA/DTA/DTG da casca de arroz antes do pré-tratamento com líquido iônico.



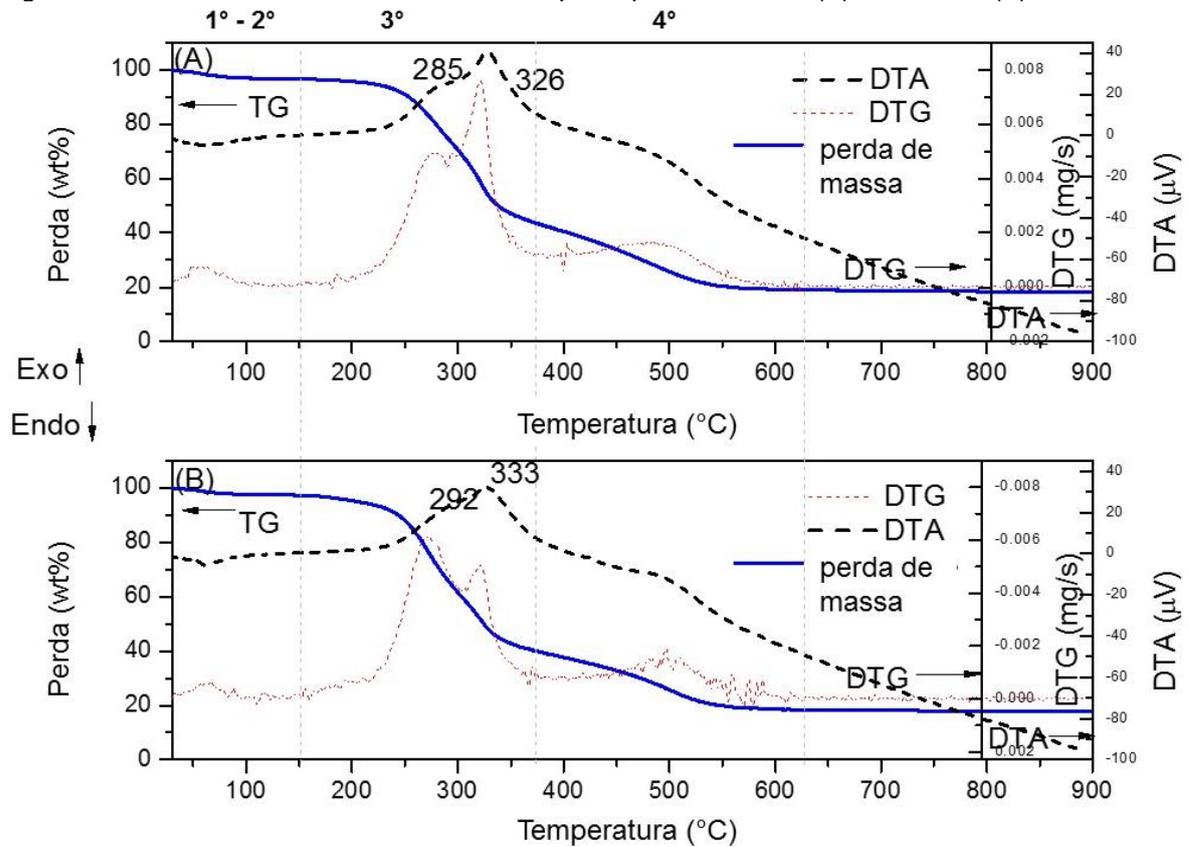
Quatro estágios de perda de massa podem ser vistos no TGA (linha azul). O primeiro estágio refere-se ao conteúdo de umidade, aproximadamente 9,20%, que ocorre em uma faixa de temperatura de 30 – 137°C e um pico endotérmico pode ser visto na curva de DTA nesta faixa, com um máximo de 70°C. O segundo estágio é relativamente constante na faixa de temperatura de 137 a 181°C e se refere à água quimio-absorvida. O terceiro (≈ 53 wt%) e quarto (≈ 19 wt%) estágios envolvem a decomposição de hemicelulose, celulose e lignina, que inicia em 181°C e termina em 578°C com as máximas perdas de massa em 360°C e 515°C. A curva DTA mostra dois picos exotérmicos com uma máxima em 345°C e 460°C, sendo estes picos relacionados à decomposição de compostos orgânicos: celulose, hemicelulose e lignina. Os resultados estão sumarizados na Tabela 6 e estão de acordo com estudos prévios que reportaram as mesmas características (YANG *et al.*, 2006; CARRIER *et al.*, 2011; PIJARN *et al.*, 2010).

Tabela 6 - TGA/DTA da casca de arroz antes do pré-tratamento com líquido iônico.

Estágio	Temperatura TGA (°C)	Perda de massa (%)	Pico máximo de temperatura DTA (°C)	Característica do Pico	Decomposição
1	30 – 137	9,2	70	Endotérmico	Umidade
2	137 – 181	0,8	-	-	Água quimio-absorvida
3	181 – 408	53,44	345	Exotérmico	Celulose, hemicelulose
4	408 – 578	18,87	460	Exotérmico	Lignina

Após o pré-tratamento da biomassa (Figura 13; Ensaio 1 e 5) quatro estágios de perda de massa podem ser observados no TGA. Entretanto, o primeiro e o segundo estágios são quase constantes. Estes resultados podem ser esperados devido ao processo de secagem, o conteúdo de umidade e água quimio-absorvida são de aproximadamente 3%, ocorrendo em uma faixa de temperatura de 30 a 150°C e um baixo pico endotérmico pode ser observado na curva de DTA nesta faixa, com um máximo em 70°C. O terceiro estágio (equivalente a aproximadamente 53 wt%) envolve a decomposição da hemicelulose e da celulose, que iniciam a uma baixa temperatura quando comparado com a casca de arroz *in natura* (Figura 12), a 150°C. Os perfis de DTG mostram que a temperatura e o pré-tratamento com LI quebram a celulose, hemicelulose e lignina e separam elas em frações com diferentes composições químicas, alterando o perfil do DTG, sendo que resultados similares foram demonstrados por Zhang *et al.* (2014) que utilizaram um líquido iônico diferente. As curvas DTA mostraram dois picos exotérmicos em uma faixa de 240 a 390°C, estes picos estão em uma temperatura menor comparada com os apresentados para a biomassa sem o pré-tratamento, confirmando que alterações morfológicas e estruturais afetaram a decomposição dos compostos orgânicos mesmo em temperaturas mais baixas (Ensaio 1) e baixas temperaturas de pré-tratamento (Ensaio 5). Nenhum pico exotérmico foi detectado no perfil de DTA na faixa de temperatura de decomposição da lignina.

Figura 13 - TGA/DTA/DTG da casca de arroz após o pré-tratamento (A) Ensaio 1 e (B) Ensaio 5.



4.4 REUTILIZAÇÃO DO LÍQUIDO IÔNICO

O líquido iônico utilizado no pré-tratamento da casca de arroz foi separado desta antes da etapa da hidrólise. Este líquido iônico dissolvido em água contendo alguns extrativos da biomassa passou por um processo de secagem a 50°C para que a água presente fosse evaporada.

Os primeiros ensaios realizados para avaliar a reutilização do líquido iônico foram através da aplicação direta do LI seco no pré-tratamento da casca de arroz na condição de validação (180°C, razão líquido iônico:água de 1:20, 12 horas e 10% de biomassa), sendo verificada uma redução de 30,4% no rendimento de açúcares redutores e após o segundo reciclo do líquido iônico uma redução de 43,8% nos açúcares redutores foi observada.

Com isso, antes de realizar a reutilização do líquido iônico no pré-tratamento, foram realizadas lavagens com acetato de etila, que é empregado na síntese, para retirada de impurezas. Após, a etapa de lavagem e secagem, o líquido iônico foi reutilizado no processo de pré-tratamento, sendo observado redução de apenas 1%

no rendimento de açúcares redutores obtidos, porém, houve uma perda de cerca de 50% do líquido iônico, inviabilizando assim, uma nova reutilização. A reutilização do líquido iônico é uma etapa importante na viabilidade da aplicação destes líquidos iônicos no pré-tratamento de biomassa lignocelulósica. Entretanto, de acordo com os resultados obtidos até o momento, não foi possível definir uma etapa de reutilização, sendo necessário maiores estudos nesse sentido. Novos processos para recuperação e reutilização devem ser avaliados, onde o processo de lavagem e recuperação do líquido iônico empregando outros solventes, como por exemplo etanol e metanol, e até mesmo um aprimoramento na técnica utilizando a lavagem com acetato de etila podem ser estudados, tornando possível avaliar a viabilidade da sua aplicação em maior escala para fins de produção de etanol de segunda geração.

5. CONCLUSÃO

O líquido iônico brometo de 1-hexadecil-3-metilimidazol ($[C_{16}MIM][Br]$) foi a primeira vez reportado no pré-tratamento de biomassa lignocelulósica. A utilização deste líquido iônico no pré-tratamento de casca de arroz possibilita a sua aplicação como fonte de matéria-prima para a produção de etanol de segunda geração.

Através da metodologia de planejamento de experimentos foi possível avaliar o efeito da temperatura e da razão líquido iônico:água sobre o pré-tratamento da casca de arroz avaliando o rendimento de açúcares redutores obtidos. Os principais resultados demonstram que a razão de líquido iônico:água não apresentou influência significativa, mas que a temperatura tem influência sobre o pré-tratamento da casca de arroz. Esta influência positiva da temperatura foi confirmada através do ensaio de validação onde, a uma temperatura de 180°C e razão LI:água de 1:20 (g/mL), obteve-se o maior rendimento de açúcares de 38,04% (g/g).

Além disso, foi verificada uma grande dissolução da biomassa durante o pré-tratamento, demonstrando que boa parte dos componentes da casca de arroz foram removidos durante o processo, o que foi evidenciado através das imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV), que mostraram uma superfície mais exposta e acessível. O índice de cristalinidade obtido através da difração de raio-x (DRX) apresentou um aumento após o pré-tratamento (de 40,6% para 59,5%), que pode estar relacionado à remoção de componentes amorfos, como a lignina, o que também foi evidenciado pelo espectrômetro infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), que demonstrou um decréscimo na intensidade das bandas deste componente, além de certa diminuição de bandas referentes à sílica, e pela análise termogravimétrica (TGA), que não apresentou picos exotérmicos para a biomassa após o pré-tratamento.

Estas alterações estruturais e morfológicas, combinado com um maior rendimento de açúcares redutores evidenciaram que o pré-tratamento da casca de arroz utilizando o líquido iônico $[C_{16}MIM][Br]$ foi efetivo, porém estudos complementares a respeito da interação do líquido iônico com a água são necessários para compreender como ocorre a interação líquido iônico:água:biomassa. Além disso, uma etapa de recuperação e reutilização deste líquido iônico deve ser definida com o intuito de sua aplicação em maiores escalas.

6. REFERÊNCIAS

- ADAK, S. et al. Role of spacer length in interaction between novel gemini imidazolium surfactants and *Rhizopus oryzae* lipase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 560-567, 2015.
- AID, T. et al. Saccharification of lignocellulosic biomass via ionic liquid pretreatment. **Industrial Crops and Products**, v. 92, p. 336-341, 2016.
- ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4851-4861, 2010.
- AMOAHA, J. et al. Development and evaluation of consolidated bioprocessing yeast for ethanol production from ionic liquid-pretreated bagasse. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 1413-1420, 2017.
- ANCHIETA, C. G. **Catalisadores de Ni suportados em óxidos sintetizados com líquido iônico: Atividade catalítica na tri-reforma do metano**. 2019. 187 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química)-Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2019.
- ANG, T. N. Efficiency of ionic liquids in the dissolution of rice husk. **Bioresources**, v. 6, n. 4, p. 4790-4800, 2011.
- ANG, T. N. et al. Elucidation of the effect of ionic liquid pretreatment on rice husk via structural analyses. **Biotechnology for Biofuels**, v.67, n. 5, p. 1-10, 2012.
- ANG, T. N. et al. Comparative study of various pretreatment reagents on rice husk and structural changes assessment of the optimized pretreated rice husk. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 116-119, 2013.
- ASAKAWA, A. et al. Cholinium ionic liquid/cosolvent pretreatment for enhancing enzymatic saccharification of sugarcane bagasse. **Industrial Crops and Products**, v. 86, p. 113-119, 2016.
- AUXENFANS, T. et al. Enzymatic saccharification and structural properties of industrial wood sawdust: Recycled ionic liquids pretreatments. **Energy Conversion and Management**, v. 88, p. 1094-1103, 2014.
- BADGUJAR, K. C.; BHANAGE, B. M. Factors governing dissolution process of lignocellulosic biomass in ionic liquid: Current status, overview and challenges. **Bioresource Technology**, v. 178, p. 2-18, 2015.
- BANERJEE, S. et al. Evaluation of wet air oxidation as a pretreatment strategy for bioethanol production from rice husk and process optimization. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, p. 1680-1686, 2009.

BEHERA, S. et al. Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 36, p. 91-106, 2014.

BINOD, P. et al. Bioethanol production from rice straw: An overview. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4767-4774, 2010.

BONNER, I. J. et al. Impact of sequential Ammonia Fiber Expansion (AFEX) pretreatment and palletization on the moisture sorption properties of corn stover. **Drying Technology**, v. 33, p. 1768-1778, 2015.

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

BRASIL, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Safras 2018. **BRASIL**. Disponível em: <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/19942-em-janeiro-ibge-preve-safra-6-0-inferior-a-de-2017>> Acesso em: 18 de jan. 2019.

CARRIER, M. et al. Thermogravimetric analysis as a new method to determine the lignocellulosic composition of biomass. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 298-307, 2011.

CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; GÍRIO, F. M. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. **Journal of Science and Industrial Research**, v. 67, p. 849-864, 2008.

CHEENKACHORN, K. et al. Enzymatic saccharification of rice straw under influence of recycled ionic liquid pretreatments. **Energy Procedia**, v. 100, p. 160-165, 2016.

CHEN, H. et al. A review on the pretreatment of lignocellulose for high-value chemicals. **Fuel Processing Technology**, v. 160, p. 196-206, 2017.

CUNHA-PEREIRA, F. et al. Liberation of fermentable sugars from soybean hull biomass using ionic liquid 1-Butyl-3-Methylimidazolium Acetate and their bioconversion to ethanol. **Biotechnology Progress**, v. 32, n. 2, p. 312-320, 2016.

DADI, A. P.; VARANASI, S.; SCHALL, C. A. Enhancement of Cellulose Saccharification Kinetics Using an Ionic Liquid Pretreatment Step. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 95, n. 5, p. 904-910, 2006.

DADI, A. P. et al. Mitigation of cellulose recalcitrance to enzymatic hydrolysis by ionic liquid pretreatment. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 136-140, n. 7, p. 407-422, 2007.

DÍAZ, A. B. et al. An effective process for pretreating rice husk to enhance enzyme hydrolysis. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 53, p. 10870-10875, 2014.

EBRAHIMI, M. et al. Effect of ammonium carbonate pretreatment on the enzymatic digestibility, structural characteristics of rice husk and bioethanol production via simultaneous saccharification and fermentation process with *Saccharomyces cerevisiae Hansen 2055*. **Industrial Crops and Products**, v. 101, p. 84-91, 2017.

ELGHARBAWY, A. A. et al. Ionic liquid pretreatment as emerging approaches for enhanced enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Biochemical Engineering Journal**, v. 109, p. 252-267, 2016.

FAN, L. T.; GHARPURAY, M. M.; LEE, Y. H. Cellulose hydrolysis biotechnology monographs. [Berlin]: Springer, 1987, p. 57.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Value of Agricultural Productions. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QV>> Acesso em: 18 de jan. 2019.

FERNÁNDEZ-BOLAÑOS, J. et al. Steam-explosion of olive stones: hemicellulose solubilization and enhancement of enzymatic hydrolysis of cellulose. **Bioresource Technology**, v. 79, p. 53-61, 2001.

FU, D.; MAZZA, G. Aqueous ionic liquid pretreatment of straw. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 7008-7011, 2011.

GAO, J. et al. Effect of ionic liquid/inorganic salt/water pretreatment on the composition, structure and enzymatic hydrolysis of rice straw. **Bioresource Technology Reports**, v. 5, p. 355-358, 2019.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemical**, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

GOGOI, G.; HAZARIKA, S. Coupling of ionic liquid treatment and membrane filtration for recovery of lignin from lignocellulosic biomass. **Separation and Purification Technology**, v. 173, p. 113-120, 2017.

GUO, G-L. et al. Characterization of dilute acid pretreatment of silvergrass for ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 6046-6053, 2008.

HAHN-HÄGERDAL, B. et al. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 549-556, 2006.

HAYES, D. J. An examination of biorefining processes, catalysts and challenges. **Catalysis Today**, v. 145, p. 138-151, 2009.

HETTINGA, W. G. et al. Understanding the reductions in US corn ethanol production costs: An experience curve approach. **Energy Policy**, v. 37, p. 190-203, 2009.

HIRA, A.; OLIVEIRA, L. G. No substitute for oil? How Brazil developed its ethanol industry. **Energy Policy**, v.37, p. 2450-2456, 2009.

HOU, X-D. et al. Novel Renewable Ionic Liquids as Highly Effective Solvents for Pretreatment of Rice Straw Biomass by Selective Removal of Lignin. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 10, p. 2484-2493, 2012.

HOU, X-D.; LI, N.; ZONG, M-H. Significantly enhancing enzymatic hydrolysis of rice straw after pretreatment using renewable ionic liquid-water mixtures. **Bioresource Technology**, v. 136, p. 469-474, 2013a.

HOU, X-D.; LI, N.; ZONG, M-H. Renewable bio ionic liquids-water mixtures-mediated selective removal of lignin from rice straw: visualization of changes in composition and cell wall structure. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 110, n. 7, p. 1895-1902, 2013b.

HU, X. et al. Functional ionic liquids for hydrolysis of lignocellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 97, p. 172-176, 2013.

IBRAHIM, F. et al. Dissolution of cellulose with ionic liquid in pressurized cell. **Journal of Molecular Liquids**, v. 211, p. 370-372, 2015.

IRGA. Divisão de Assistência Técnica e Extensão Rural. **Boletim de Resultados da Lavoura de Arroz Safra 2017/18**. Porto Alegre, 2018.

JIANG, M. et al. Isolation of cellulose with ionic liquid from steam exploded rice straw. **Industrial Crops and Products**, v. 33, p. 734-738, 2011.

JOHAR, N. et al. Extraction, preparation and characterization of cellulose fibres and nanocrystals from rice husk. **Industrial Crops and Products**, v. 37, p. 93-99, 2012.

KADAM, K. L.; FORREST, L. H.; JACOBSON, W. A. Rice straw as a lignocellulosic resource: collection, processing, transportation, and environmental aspects. **Biomass and Bioenergy**, v. 18, p. 369-389, 2000.

KIM, H.; AHN, Y.; KWAK, S-Y. Comparing the influence of acetate and chloride anions on the structure of ionic liquid pretreated lignocellulosic biomass. **Biomass and Bioenergy**, v. 93, p. 243-253, 2016.

KIM, H-S. et al. Thermogravimetric analysis of rice husk flour filled thermoplastic polymer composites. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 76, p. 395-404, 2004.

KIM, J. S.; LEE, Y. Y.; KIM, T. H. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 42-48, 2016.

KOPPRAM, R. et al. Lignocellulosic ethanol production at high-gravity: challenges and perspectives. **Trends in Biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 46-53, 2014.

KUMAR, P. et al. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 48, p. 3713-3729, 2009.

KUMARI, D.; SINGH, R. Pretreatment of lignocellulosic wastes for biofuel production: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 90, p. 877-891, 2018.

LAUREANO-PEREZ, L. et al. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121-124, n. 5, p. 1081-1100, 2005.

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

LI, Q. et al. Improving enzymatic hydrolysis of wheat straw using ionic liquid 1-ethyl-3-methylimidazolium diethyl phosphate pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 3570-3575, 2009.

LIU, C-H. et al. Ionic liquids for biofuel production: Opportunities and challenges. **Applied Energy**, v. 92, p. 406-414, 2012.

LIU, Z. et al. Characterization of the regenerated cellulose films in ionic liquids and rheological properties of the solutions. **Materials Chemistry and Physics**, v. 128, p. 220-227, 2011.

LOPES, A. M. C. et al. Ionic liquids as a tool for lignocellulosic biomass fractionation. **Sustainable Chemical Processes**, v. 3, n. 1, p. 1-31, 2013.

LYNAM, J. G. et al. Pretreatment of rice hulls by ionic liquid dissolution. **Bioresource Technology**, v. 114, p. 629-636, 2012.

MAACHE-REZZOUG, Z. et al. Optimizing thermomechanical pretreatment conditions to enhance enzymatic hydrolysis of wheat straw by response surface methodology. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 3129-3138, 2011.

MAI, N. L. et al. Methods for recovery of ionic liquids – A review. **Process Biochemistry**, v. 49, p. 872-881, 2014.

MÄKI-ARVELA, P. et al. Dissolution of lignocellulosic materials and its constituents using ionic liquids – A review. **Industrial Crops and Products**, v. 32, p. 175-201, 2010.

MEENATCHI, B.; RENUGA, V.; MANIKANDAN, A. Cellulose dissolution and regeneration using various imidazolium based protic ionic liquids. **Journal of Molecular Liquids**, v. 238, p. 582-588, 2017.

MICHEL JR, R. J. S. et al. Enzymatic saccharification and fermentation of rice processing residue for ethanol production at constant temperature. **Biosystems Engineering**, v. 142, p. 110-116, 2016.

MILANEZ, A. Y. et al. De promessa a realidade: como o etanol celulósico pode revolucionar a indústria da cana-de-açúcar – uma avaliação do potencial competitivo e sugestões de política pública. **BNDES Setorial**. Departamento de Biocombustíveis. v. 41, p. 237-294, 2015.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugars. **Analytical Chemistry**, p. 426-428, 1959.

MOOD, S. H. et al. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 77-93, 2013.

NDAZI, B. S. et al. Chemical and physical modifications of rice husks for use as composite panels. **Composites: Part A: applied science and manufacturing**, v. 38, p. 925-935, 2007.

NGUYEN, T-A. D. et al. Pretreatment of rice straw with ammonia and ionic liquid for lignocellulose conversion to fermentable sugars. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7432-7438, 2010.

NINOMIYA, K. et al. Effect of post-pretreatment washing on saccharification and co-fermentation from bagasse pretreated with biocompatible cholinium ionic liquid. **Biochemical Engineering Journal**, v. 103, p. 198-204, 2015.

OGEDA, T. L. **Hidrólise Enzimática de Celuloses Pré-tratadas**. 2011. 110 p. Dissertação (Mestrado em Química)-Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2011.

ONU. Departamento de Assuntos Econômicos e Sociais. **World Population Prospects – The 2017 Revision**. Nova Iorque, 2017.

PACHECO, T. F. Produção de Etanol: Primeira ou Segunda Geração? **EMBRAPA**. Circular Técnica 04, Brasília, 2011.

PAPATHEOFANOUS, M. G. et al. Two-stage acid-catalyzed fractionation of lignocellulosic biomass in aqueous ethanol systems at low temperatures. **Bioresource Technology**, v. 54, p. 305-310, 1995.

PEREIRA, F. C. **Bioconversão de açúcares provenientes de biomassas hidrolisadas a etanol e pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos com líquido iônico**. 2015. 168 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2015.

PEREZ, J. L. P.; ARCO, S. D. Solvent-Free Sonochemical Synthesis and Antifungal Activity of 1-Alkyl-3-Methylimidazolium Bromide [RMIM]Br Ionic Liquids. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 61, p. 935-939, 2014.

PIJARN, N. et al. Synthesis and characterization of nanosized-silica gels formed under controlled conditions. **Powder Technology**, v. 203, p. 462-468, 2010.

PINO, V. et al. The ionic liquid 1-hexadecyl-3-methylimidazolium bromide as novel extracting system for polycyclic aromatic hydrocarbons contained in sediments using focused microwave-assisted extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1182, p. 145-152, 2008.

PONNUSAMY, V. K. et al. A review on lignin structure, pretreatments, fermentation reactions and biorefinery potential. **Bioresource Technology**, v. 271, p. 462-472, 2019.

POORNEJAD, N.; KARIMI, K.; BEHZAD, T. Improvement of saccharification and ethanol production from rice straw by NMMO and [BMIM][OAc] pretreatments. **Industrial Crops and Products**, v. 41, p. 408-413, 2013.

POORNEJAD, N.; KARIMI, K.; BEHZAD, T. Ionic liquid pretreatment of rice straw to enhance saccharification and bioethanol production. **Journal of Biomass to Biofuels**, v. 1, p. 8-15, 2014.

PRADO, R. et al. Study of the influence of reutilization ionic liquid on lignin extraction. **Journal of Cleaner Production**, v. 111, p. 125-132, 2016.

RAJ, T. et al. Ionic liquid pretreatment of biomass for sugars production: Driving factors with a plausible mechanism for higher enzymatic digestibility. **Carbohydrates Polymers**, v.149, p. 369-381, 2016.

REDDY, P. A critical review of ionic liquids for the pretreatment of lignocellulosic biomass. **South African Journal of Science**, v. 111, n. 11/12, p. 1-9, 2015.

ROUCHES, E. et al. White-Rot Fungi pretreatment of lignocellulosic biomass for anaerobic digestion: Impact of glucose supplementation. **Process Biochemistry**, v. 51, p. 1784-1792, 2016.

SAHA, B. C.; COTTA, M. A. Lime pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of rice hulls to ethanol. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, p. 971-977, 2008.

SHI, J. et al. Understanding the role of water during ionic liquid pretreatment of lignocellulose: co-solvent or anti-solvent? **Green Chemistry**, v. 16, p. 3830-3840, 2014.

SHIRKAVAND, E. et al. Combination of fungal and physicochemical processes for lignocellulosic biomass pretreatment – A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 54, p. 271-234, 2016.

SILVA, T. B. **Líquidos iônicos – alguns aspectos sobre as propriedades, preparação e aplicações**. 2004. 49 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química)-Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, 2004.

SIMS, R. E. H. et al. An overview of second generation biofuel technologies. **Bioresource Technology**, v.101, p. 1570-1580, 2010.

SINGH, G.; KUMAR, A. Ionic liquids: Physico-chemical, solvent properties and their applications in chemical processes. **Indian Journal of Chemistry**, v. 47, p. 495-503, 2008.

SINGH, R. et al. A review on delignification of lignocellulosic biomass for enhancement of ethanol production potential. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 32, p. 713-728, 2014.

SOARES, J. F. **Avaliação de diferentes processos de extração na obtenção de óleo de farelo de arroz**. 2015. 82 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2015.

SRIARIYANUN, M. et al. Efficient pretreatment of rice straw by combination of screw-press and ionic liquid to enhance enzymatic hydrolysis. **Kasetsart Journal**, v.49, n. 1, p. 146-154, 2015.

SRIARIYANUN, M. et al. Production, purification and characterization of an ionic liquid tolerant cellulase from *Bacillus* sp. isolated from rice paddy field soil. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 19, p. 23-28, 2016.

SUNDARAM, V.; MUTHUKUMARAPPAN, K. Influence of AFEX™ pretreated corn stover and switchgrass blending on the compaction characteristics and sugar yield of the pellets. **Industrial Crops and Products**, v. 83, p. 537-544, 2016.

SWATLOSKI, R. P. et al. Dissolution of cellulose with ionic liquids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 18, p. 4974-4975, 2002.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, p. 1621-1651, 2008.

TAN, H. T.; LEE, K. T.; MOHAMED, A. R. Pretreatment of lignocellulosic palm biomass using a solvent-ionic liquid [BMIM][Cl] for glucose recovery: An optimization study using response surface methodology. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 1862-1868, 2011.

TEYMOURI, F. et al. Optimization of the ammonia fiber explosion (AFEX) treatment parameters for enzymatic hydrolysis of corn stover. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 2014-2018, 2005.

TYE, Y. Y. et al. The world availability of non-wood lignocellulosic biomass for the production of cellulosic ethanol and potential pretreatments for the enhancement of enzymatic saccharification. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 60, p. 155-172, 2016.

VANCOV, T. et al. Use of ionic liquids in converting lignocellulosic material to biofuels. **Renewable Energy**, v. 45, p. 1-6, 2012.

VÁSQUEZ, M. P. **Desenvolvimento de processo de hidrólise enzimática e fermentação simultâneas para a produção de etanol a partir de bagaço de cana-**

de-açúcar. 2007. 205 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos)-Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2007.

WALTER, M.; MARCHEZAN, E.; AVILA, L. A. Arroz: composição e características nutricionais. **Ciência Rural**, v.38, n. 4, p. 1184-1192, 2008.

WANG, G. et al. Dissolution and regeneration of hide powder/cellulose composite in Gemini imidazolium ionic liquid. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 76, p. 70-79, 2015.

WANG, J.; ZHU, A.; LI, L. Sustainable Catalysis Systems Based on Ionic Liquids. **Sustainable Catalytic Processes**. 1 ed. [S.l.]: Elsevier, 2015, cap. 3, p. 61-98.

WU, H. et al. Facile pretreatment of lignocellulosic biomass at high loadings in room temperature ionic liquids. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, n. 12, p. 2865-2875, 2011.

WU, M. et al. Application of new expansion pretreatment method on agricultural waste. Part I: Influence of pretreatment on the properties of lignin. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 887-895, 2013.

XU, J. et al. An ionic liquid tolerant cellulase derived from chemically polluted microhabitats and its application in in situ saccharification of rice straw. **Bioresource Technology**, v. 157, p. 166-173, 2014.

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

YANG, C-Y.; FANG, T. J. Kinetics for enzymatic hydrolysis of rice hulls by the ultrasonic pretreatment with a bio-based basic ionic liquid. **Biochemical Engineering Journal**, v. 100, p. 23-29, 2015.

YANG, H. et al. In-Depth Investigation of Biomass Pyrolysis based on three major components: hemicellulose, cellulose and lignin. **Energy and Fuels**, v. 20, p. 388-393, 2006.

YOKOO, T.; MIYAFUJI, H. Reaction behavior of wood in an ionic liquid, 1-ethylpyridinium bromide. **Journal Wood Sci**, v. 60, p. 339-345, 2014.

YOON, L. W. et al. Regression analysis on ionic liquid pretreatment of sugarcane bagasse and assessment of structural changes. **Biomass and Bioenergy**, v. 36, p. 160-169, 2012.

ZHANG, J. et al. Lyotropic liquid crystalline phases formed in ternary mixtures of 1-cetyl-3-methylimidazolium bromide/*p*-xylene/water: A SAXS, POM, and rheology study. **Colloid and Interface Science**, v. 321, p. 159-165, 2008.

ZHANG, J. et al. Thermogravimetric analysis of lignocellulosic biomass with ionic liquid pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 153, p. 379-382, 2014.

ZHANG, S. et al. Physical properties of ionic liquids: Databased and evaluation. **Journal of Physical and Chemical Reference Data**, v. 35, n. 4, p. 1475-1517, 2006.

ZHAO, H. et al. Regenerating cellulose from ionic liquids for an accelerated enzymatic hydrolysis. **Journal of Biotechnology**, v. 139, p. 47-54, 2009.

ZHU, J. et al. Thermodynamical properties of phase change materials based on ionic liquids. **Chemical Engineering Journal**, v. 147, p. 58-62, 2009.

ZHU, S. et al. Dissolution of cellulose with ionic liquids and its application: a mini-review. **Green Chemistry**, v. 8, p. 325-327, 2006.