



UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
PROCESSOS E TECNOLOGIAS

FERMENTAÇÃO DE AÇÚCARES LIBERADOS DE BIOMASSAS
LIGNOCELULÓSICAS PRÉ-TRATADAS COM LÍQUIDOS
IÔNICOS PARA PRODUÇÃO DE ETANOL

Ândria Tura

Ândria Tura

**FERMENTAÇÃO DE AÇÚCARES LIBERADOS DE BIOMASSAS
LIGNOCELULÓSICAS PRÉ-TRATADAS COM LÍQUIDOS IÔNICOS
PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL**

Dissertação apresentada no Programa de Pós Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção de grau de mestre em Engenharia de Processos, orientado por **Profa. Dra. Marli Camassola** e co-orientado por **Prof. Dr. Aldo J. P. Dillon**.

Caxias do Sul, 2014.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
UCS - BICE - Processamento Técnico

T929f Tura, Ândria

Fermentação de açúcares liberados de biomassas lignocelulósicas pré-tratadas com líquidos iônicos para a produção de etanol / Ândria Tura. - 2014.

72 f. : il. ; 30 cm

Apresenta bibliografia.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias. 2014.

Orientação: Prof.^a Dr.^a Marli Camassola, co-orientação: Prof. Dr. Aldo J. P. Dillon.

1. Etanol. 2. Fermentação. 3. Hidrólise enzimática. 4. Engenharia de processos. I. Título.

CDU 2.ed. : 661.722

Índice para o catálogo sistemático:

1. Etanol	661.722
2. Fermentação	667.49
3. Hidrólise enzimática	66.094.941
4. Engenharia de processos	658.5

Catalogação na fonte elaborada pela bibliotecária
Carolina Machado Quadros – CRB 10/2236.

**"FERMENTAÇÃO DE AÇÚCARES LIBERADOS DE BIOMASSAS LIGNOCELULÓSICAS PRÉ-
TRATADAS COM LÍQUIDOS IÔNICOS PARA PRODUÇÃO DE ETANOL."**

Ândria Tura

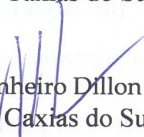
Dissertação de Mestrado submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias da Universidade de Caxias do Sul, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Processos e Tecnologias, Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos e Produtos Industriais.

Caxias do Sul, 14 de maio de 2014.

Banca Examinadora:




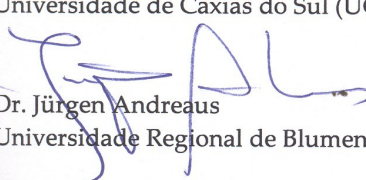
Dra. Marli Camassola (orientadora)
Universidade de Caxias do Sul (UCS)


Dr. Aldo José Pinheiro Dillon (coorientador)
Universidade de Caxias do Sul (UCS)


Dra. Aline Dettmer
Universidade de Caxias Sul (UCS)


Dra. Eloane Malvessi
Universidade de Caxias do Sul (UCS)


Pós-doutoranda. Fernanda Bettin
Universidade de Caxias do Sul (UCS)


Dr. Jürgen Andreaus
Universidade Regional de Blumenau (FURB)

AGRADECIMENTOS

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

- a Deus;
- aos meus orientadores Dra. Marli Camassola e Dr. Aldo J. P. Dillon, pelo conhecimento compartilhado e pela atenção prestada;
- a Roselei C. Fontana, técnica do laboratório, por toda a ajuda prestada;
- aos professores da banca de acompanhamento Profa. Dra. Aline Dettmer, Profa. Dra. Eloane Malvessi, e a Dra. Fernanda Bettin.
- aos professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias;
- aos colegas do Laboratório de Enzimas e Biomassas, pela convivência e pelos momentos de descontração;
- aos meus pais Alceu e Ledilse, pelo incentivo, carinho e confiança depositados em mim;
- ao meu namorado Paulo, pelo companheirismo, incentivo, apoio e carinho;
- ao apoio estrutural e financeiro da UCS, FAPERGS, FINEP e CNPq.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE QUADROS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	3
2.1 Objetivo Geral	3
2.2 Objetivos Específicos	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 Cenário atual do etanol.....	4
3.2 Biomassa lignocelulósica	5
3.3 Composição da biomassa lignocelulósica	8
3.3.1 Celulose.....	8
3.3.2 Hemicelulose.....	9
3.3.3 Lignina	11
3.4 Fontes de biomassa lignocelulósica.....	12
3.4.1 <i>Pinus</i> sp.	12
3.4.2 <i>Eucalyptus</i> sp.....	13
3.4.3 Bagaço de cana-de-açúcar	13
3.4.4 Capim-elefante	14
3.5 Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica.....	15
3.5.1 Pré-tratamento com Líquidos Iônicos	17
3.5 Hidrólise enzimática	18
3.6 Fermentação.....	20
4 METODOLOGIA.....	24
4.1 Microrganismos	24
4.2 Enzimas	24
4.3 Substratos lignocelulósicos	24
4.4 Líquidos iônicos	25
4.5 Preparo e pré-tratamento de substratos.....	25

4.6. Determinação da composição da biomassa	26
4.6.1 Determinação do teor de cinzas em materiais celulósicos	26
4.6.2 Extraíveis.....	26
4.6.3 Análise química dos substratos celulósicos	26
4.6.4 Determinação de nitrogênio total e proteínas.....	27
4.7 Hidrólise enzimática e fermentação	28
4.8 Determinação de açúcares redutores (ARs).....	28
4.9 Determinações de açúcares e etanol	29
4.10 Análise Estatística	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1 Avaliação do número de lavagens das biomassas pré-tratadas com líquidos iônicos	30
5.2 Avaliação de perda de massa.....	33
5.3 Avaliação do consumo de açúcares redutores (ARs) durante as fermentações.....	36
5.4.1 Bagaço de cana-de-açúcar	42
5.4.2 Capim-elefante	47
5.4.3 Serragens de <i>Eucalyptus</i> sp. e <i>Pinus</i> sp.....	50
6 CONCLUSÕES	58
7 PERSPECTIVAS	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Perda de massa das biomassas pré-tratadas com os líquidos iônicos	35
Tabela 2. Composição química da biomassa lignocelulósicas.	36
Tabela 3. Concentração de açúcares redutores no início e após 48 h de fermentação por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e a eficiência no consumo de ARs.....	40
Tabela 4. Concentração de açúcares redutores no início e após 48 h de fermentação por <i>Schizosaccharomyces pombe</i> e a eficiência no consumo de ARs.	41
Tabela 5. Concentração de açúcares redutores no início e após 48 h de fermentação por <i>Geobacillus thermoglucosidasius</i> .e a eficiência no consumo de ARs.	41
Tabela 6. Concentração de açúcares redutores em 12 h e após 48 h de fermentação por <i>Geobacillus thermoglucosidasius</i> .e a eficiência no consumo de ARs.	41
Tabela 7. Concentrações de glicose e rendimento em etanol para o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com os líquidos iônicos [C ₂ mim][OAc] (A) e [C ₄ mim][OAc] (B) antes da fermentação (Início - 0 horas) e depois (48 horas) para as leveduras <i>S. cerevisiae</i> e <i>S. pombe</i> , e a bactéria <i>G. thermoglucosidasius</i>	43
Tabela 8. Concentrações de glicose e rendimento em etanol para o capim-elefante pré-tratado com os líquidos iônicos [C ₂ mim][OAc] (A) e [C ₄ mim][OAc] (B) antes da fermentação (Início - 0 horas) e depois (48 horas) para as leveduras <i>S. cerevisiae</i> e <i>S. pombe</i> , e a bactéria <i>G. thermoglucosidasius</i>	48
Tabela 9. Concentrações de glicose e rendimento em etanol para a serragem de <i>Pinus</i> sp. pré-tratado com os líquidos iônicos [C ₂ mim][OAc] (A) e [C ₄ mim][OAc] (B) antes da fermentação (Início - 0 horas) e depois (48 horas) para as leveduras <i>S. cerevisiae</i> e <i>S. pombe</i> , e a bactéria <i>G. thermoglucosidasius</i>	51
Tabela 10. Concentrações de glicose e rendimento em etanol para a serragem de <i>Eucalyptus</i> sp. pré-tratada com os líquidos iônicos [C ₂ mim][OAc] (A) e [C ₄ mim][OAc] (B) antes da fermentação (Início - 0 horas) e depois (48 horas) para as leveduras <i>S. cerevisiae</i> e <i>S. pombe</i> , e a bactéria <i>G. thermoglucosidasius</i>	53

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Materiais lignocelulósicos e suas suas aplicações (Howard <i>et al.</i> , 2004).....	6
Quadro 2. Sumário das vantagens e desvantagens de diferentes métodos de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica. Adaptado de Odega & Petri (2010).....	16
Quadro 3. Estrutura molecular e propriedades físicas dos solventes de celulose, 1-butil-3-metilimidazólio acetato e 1-etil-3-metilimidazólio acetato, que foram utilizados no pré-tratamento (Shafiei <i>et al.</i> , 2013).....	17

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Rotas tecnológicas para a produção de etanol.	5
Figura 2. Organização da parede celular e distribuição da celulose, hemicelulose e lignina, adaptado de Menon & Rao (2012).	7
Figura 4. Moléculas que fazem parte da estrutura da hemicelulose, adaptada de Morais <i>et al.</i> , 2005 e Ferreira <i>et al.</i> , 2009.	9
Figura 3. Estrutura da celulose com representação das regiões cristalinas e amorfas. Reproduzida de Dillon (2004).	9
Figura 5. Representação esquemática das estruturas das três maiores hemiceluloses. A. Xilana. B. Xiloglicana. C. Galactomanana. Adaptado de Souza (2013).	10
Figura 6. Estrutura da lignina, adaptada de Ferreira <i>et al.</i> , 2009.	11
Figura 7. Alterações estruturais do complexo celulose-hemicelulose-lignina determinadas pelo pré-tratamento, adaptado de Mosier <i>et al.</i> , 2004.	15
Figura 8. Sequência das reações enzimáticas na fermentação alcoólica de carboidratos endógenos (glicogênio e trealose) e exógenos (sacarose e maltose), conduzida por <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
Figura 9. Consumo de açúcares redutores durante a fermentação de capim-elefante pré-tratado com os LIs [C ₂ mim][OAc] e [C ₄ mim][OAc] após realização de cinco (A, B e C), dez (D, E e F) e quinze (G, H e I) lavagens. As fermentações foram realizadas por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (A, D e G), <i>Schizosaccharomyces pombe</i> (B, E e H) e <i>Geobacillus thermoglucosidasius</i> (C, F e I). Utilizou-se como controle biomassa não submetida à pré-tratamento. Os tratamentos com a mesma letra, para cada LI avaliado entre as diferentes quantidades de lavagens, não diferem estatisticamente em nível de 5% (< 0,05).	32
Figura 10. Consumo de açúcares redutores durante a fermentação dos açúcares liberados da hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar (A, B e C), capim-elefante (D, E e F), serragem de <i>Pinus</i> sp. (G, H e I) e serragem de <i>Eucalyptus</i> sp. (J, K e L) pré-tratadas com os líquidos iônicos e sem pré-tratamento (Controle). As fermentações foram realizadas empregando as leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (A, D, G e J) e <i>Schizosaccharomyces pombe</i> (B, E, H e K) e pela bactéria <i>Geobacillus thermoglucosidasius</i> (C, F, I e L).	39
Figura 11. Concentrações da glicose, xilose e etanol para o bagaço de cana-de-açúcar, pré-tratado com os líquidos iônicos [C ₂ mim][OAc] (A) e [C ₄ mim][OAc] (B) antes da fermentação (Início - 0 horas) e depois (48 horas) para as leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Schizosaccharomyces pombe</i> e para a bactéria <i>Geobacillus thermoglucosidasius</i>	44
Figura 12. Concentrações de arabinose, xilitol, glicerol, ácido acético e celobiose para o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com os líquidos iônicos [C ₂ mim][OAc] (A) e [C ₄ mim][OAc] (B) antes da fermentação (Início - 0 horas) e depois (48 horas) para as leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Schizosaccharomyces pombe</i> e a para bactéria <i>Geobacillus thermoglucosidasius</i>	47
Figura 13. Concentrações da glicose, xilose e etanol para o capim-elefante, pré-tratado com os líquidos iônicos [C ₂ mim][OAc] (A) e [C ₄ mim][OAc] (B) antes da fermentação (Início - 0 horas) e depois (48 horas) para as leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Schizosaccharomyces pombe</i> e para a bactéria <i>Geobacillus thermoglucosidasius</i>	49

Figura 14. Concentrações de arabinose, xilitol, glicerol, ácido acético e celbiose presente nas amostras de capim-elefante pré-tratado com os líquidos iônicos [C₂mim][OAc] (A) e [C₄mim][OAc] (B) e hidrolisado por enzimas de *Penicillium echinulatum*, antes da fermentação (Início - 0 horas) e depois (48 horas) para *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* e *Geobacillus thermoglucosidasius*.50

Figura 15. Concentrações da glicose, xilose e etanol nas amostras de *Pinus* sp. pré-tratado com os líquidos iônicos [C₂mim][OAc] (A) e [C₄mim][OAc] (B) e hidrolisadas com enzimas de *Penicillium echinulatum*, antes da fermentação (Início - 0 horas) e depois (48 horas) para *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* e *Geobacillus thermoglucosidasius*.52

Figura 16. Concentrações de glicose, xilose e etanol para a serragem de *Eucalyptus* sp. pré-tratado com os líquidos iônicos [C₂mim][OAc] (A) e [C₄mim][OAc] (B) antes da fermentação (Início - 0 horas) e depois (48 horas) para *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe* e *Geobacillus thermoglucosidasius*.54

Figura 17. Concentrações de arabiose, xilitol, glicerol, ácido acético e celbiose para a serragem de *Pinus* sp. pré-tratada com os líquidos iônicos [C₂mim][OAc] (A) e [C₄mim][OAc] (B) antes da fermentação (Início - 0 horas) e depois (48 horas) para as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe*, e a bactéria *Geobacillus thermoglucosidasius*.56

Figura 18. Concentrações de arabiose, xilitol, glicerol, ácido acético e celbiose para a serragem de *Eucalyptus* sp., pré-tratada com os líquidos iônicos [C₂mim][OAc] (A) e [C₄mim][OAc] (B) antes da fermentação (Início - 0 horas) e depois (48 horas) para as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe*, e a bactéria *Geobacillus thermoglucosidasius*.57

RESUMO

Atualmente os combustíveis fósseis derivados do petróleo, tais como, gasolina, diesel e carvão são as principais fontes de energia. No entanto, essas fontes tendem ao esgotamento nos próximos 40 a 50 anos, além de sua utilização provocar problemas que vão desde a emissão de gases responsáveis pelo efeito estufa ao aumento nos preços desses combustíveis. Uma alternativa que vem sendo bastante utilizada é o etanol de primeira geração obtido principalmente do milho e da cana-de-açúcar. Apesar do etanol ser considerado uma energia limpa, por não emitir gases poluentes e auxiliar no sequestro de carbono, apresenta um problema relacionado à diminuição da oferta de alimentos e o consequente aumento de preços dos produtos que o utilizam como matéria-prima. Devido a esses fatores, vem crescendo os estudos por fontes de energias renováveis, como a obtenção do etanol de segunda geração, no qual, utiliza resíduos lignocelulósicos como matéria-prima. Nesse contexto, este trabalho objetivou avaliar a produção de etanol de segunda geração, tendo com matérias-primas os seguintes resíduos lignocelulósicos: bagaço de cana-de-açúcar, capim-elefante, serragens de *Pinus* sp. e *Eucalyptus* sp, pré-tratados com os líquidos iônicos 1-etil-3-metilimidazólio acetato e 1-butil-3-metilimidazólio acetato, separadamente. Após o pré-tratamento efetuou-se a hidrólise das biomassas lignocelulósicas com as enzimas produzidas pelo fungo *Penicillium echinulatum*, prosseguindo para a fermentação dos açúcares liberados na hidrólise, empregando as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe* Y 698, e a bactéria *Geobacillus thermoglucosidasius*. As maiores concentrações de açúcares redutores obtidas após as hidrólises enzimáticas foram 681,89 mg.g⁻¹ para bagaço de cana-de-açúcar, 474,30 mg.g⁻¹ para capim-elefante, 237,84 mg.g⁻¹ para serragem de *Eucalyptus* sp. e 233,62 mg.g⁻¹ para serragem de *Pinus* sp., sendo todos os pré-tratamentos com o líquido iônico 1-etil-3-metilimidazólio acetato. O microrganismo que apresentou maior eficiência no consumo de açúcares redutores foi *S. cerevisiae*. Porém, o maior rendimento em etanol, cerca de 96 mg.g⁻¹, foi obtido para o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com 1-butil-3-metilimidazólio acetato na fermentação com *S. pombe*. *G. thermoglucosidasius* apresentou potencial para consumo de xilose e glicose simultaneamente, porém a produção de etanol foi reduzida (21 mg.g⁻¹ para bagaço de cana-de-açúcar). Este dados contribuem para ampliar os conhecimentos sobre os efeitos do pré-tratamento com líquidos iônicos na produção de etanol de segunda geração.

Palavras-chave: etanol, hidrólise enzimática, líquidos iônicos e resíduos lignocelulósicos.

ABSTRACT

Fossil fuels, such as gasoline, diesel and coal, are the main sources of energy nowadays. In addition to generate problems, from the emission of greenhouse gases to the increase in fuel prices, these energy sources are likely to be depleted in the next 40 to 50 years. A widely used alternative to fossil fuels is first-generation ethanol, produced mainly from corn and sugarcane. Although ethanol is considered a clean source of energy because it does not emit polluting gases and helps in carbon sequestration, it is linked to a decrease in food supply and the consequent rise in food prices. Therefore, new studies on renewable energy sources, such as second-generation ethanol from feedstock and other lignocellulosic residues, are commonly found in the literature. In this context, this study aimed to evaluate the production of second-generation ethanol from the following lignocellulosic residues: sugarcane bagasse, elephant grass, *Pinus* sp. sawdust and *Eucalyptus* sp. sawdust, pretreated separately with the ionic liquids 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate and 1-butyl-3-methylimidazolium acetate. Hydrolysis of lignocellulosic biomass with enzymes from *Penicillium echinulatum* was carried out after the pretreatment. *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* Y 698 and the bacterium *Geobacillus thermoglucosidasius* were used for the fermentation of sugars released during hydrolysis. The highest concentrations of reducing sugars obtained after enzymatic hydrolysis were 681.89 mg.g⁻¹ for sugarcane bagasse, 474.30 mg.g⁻¹ for elephant grass, 237.84 mg.g⁻¹ for *Eucalyptus* sp. sawdust and 233.62 mg.g⁻¹ for *Pinus* sp. sawdust, all pretreated with 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate. *S. cerevisiae* was the microorganism with the highest efficiency in the consumption of reducing sugars. However, the highest ethanol yield (96 mg.g⁻¹) was obtained for sugarcane bagasse pretreated with 1-butyl-3-methylimidazolium acetate and fermented by *S. pombe*. *G. thermoglucosidasius* showed potential for the simultaneous consumption of xylose and glucose, but ethanol production was low (21 mg.g⁻¹ for sugarcane bagasse). These data contribute to expand the knowledge about the effects of ionic liquid pretreatments for the production of second-generation ethanol.

Keywords: ethanol, enzymatic hydrolysis, ionic liquids and lignocellulosic residues.

1 INTRODUÇÃO

No Brasil e no mundo, o desenvolvimento econômico está diretamente ligado ao sistema energético dependente, principalmente, de fontes não renováveis, como o petróleo. Essa dependência de combustíveis fósseis apresenta inúmeros problemas econômicos, sociais e ambientais, dentre eles, a gradativa exaustão de suas reservas, os problemas climáticos associados ao aquecimento global, devido à liberação de gás carbônico por meio da combustão, além da necessidade de obter fontes alternativas para a produção de combustíveis.

A alternativa encontrada por diversos países para a substituição dos combustíveis fósseis é a obtenção de combustíveis de fontes renováveis, empregando biomassa lignocelulósica. Diversas biomassas lignocelulósicas apresentam potencial para produção de etanol de segunda geração, dentre as quais estão o bagaço de cana-de-açúcar, o capim-elefante e as serragens de *Pinus* sp. e *Eucalyptus* sp. Estas culturas destacam-se por apresentarem elevada produção de biomassa. A produção de biomassa de cana-de-açúcar é de 22 t/ha/ano (massa seca), de *Eucalyptus* sp. é de 9 t/ha/ano (massa seca) e de *Pinus* sp. é de 7 t/ha/ano (massa seca), enquanto que o capim-elefante apresenta 40 t/ha/ano (massa seca) de produtividade.

Todavia, para a utilização do material lignocelulósico, é necessário submeter este material a um pré-tratamento para alterar a estrutura da biomassa celulósica, permitindo que a lignocelulose fique mais acessível às enzimas que convertem os polissacarídeos a açúcares. Diversos pré-tratamentos vêm sendo estudados para tratar biomassa lignocelulósica, dentre os quais destacam-se os pré-tratamentos com líquidos iônicos. Os líquidos iônicos são formados por cátions orgânicos e ânions inorgânicos, o que lhes conferem a propriedade de interagir com os átomos de oxigênio presentes na hidroxila da celulose, rompendo as ligações intermoleculares e intramoleculares de hidrogênio da celulose, promovendo assim a sua dissolução. Existem diversos líquidos iônicos que já foram avaliados para a realização de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica e que demonstraram-se eficientes. Entre estes destacam-se, o 1-butil-3-metilimidazólio cloreto, o 1-etil-3-metilimidazólio acetato, o 1-alil-3-metilimidazólio cloreto e o 1-butil-3-metilimidazólio acetato.

Assim como o pré-tratamento, a hidrólise enzimática é importante para a obtenção dos açúcares redutores, que serão posteriormente fermentados para a obtenção do etanol de segunda geração. Para a hidrólise enzimática, é necessária a utilização de enzimas principalmente celulasas e xilanases. Estas enzimas devem ser termoestáveis, tais como as enzimas produzidas pelo fungo *Penicillium echinulatum*. Na literatura há diversos relatos de

que os líquidos iônicos interferem negativamente sobre a atividade de celulases. No entanto, não há relatos sobre a hidrólise de biomassa pré-tratada com líquidos iônicos hidrolisados por enzimas de *P. echinulatum* para a produção de etanol, e nem de sua interferência na etapa de fermentação alcoólica.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de etanol a partir de açúcares liberados de biomassas lignocelulósicas - bagaço de cana-de-açúcar, capim-elefante, serragem de *Pinus* sp. e *Eucalyptus* sp.- pré-tratadas com os líquidos iônicos 1-etil-3-metilimidazólio acetato [C₂mim][OAc] e 1-butil-3-metilimidazólio acetato [C₄mim][OAc] e hidrolisadas com enzimas de *P. echinulatum*. As fermentações foram realizadas empregando as leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, microrganismo fermentador de hexoses, e *Schizosaccharomyces pombe* Y 698, linhagem com potencial para fermentar pentoses. Também avaliou-se *Geobacillus thermoglucosidasius* B-14521, bactéria com potencial para fermentar pentoses e hexoses.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a hidrólise enzimática e fermentação dos açúcares liberados de biomassas lignocelulósicas pré-tratadas com líquidos iônicos, visando à produção de etanol.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os caldos enzimáticos brutos de *P. echinulatum* para liberação de açúcares redutores de resíduos lignocelulósicos pré-tratados com os líquidos iônicos 1-etil-3-metilimidazólio acetato [C₂mim][OAc] e 1-butil-3-metilimidazólio acetato [C₄mim][OAc];

- realizar ensaios de fermentação dos açúcares liberados a partir das hidrólises enzimáticas das biomassas lignocelulósicas pré-tratadas com líquidos iônicos, empregando linhagens das leveduras *S. cerevisiae* e *S. pombe* Y-698, e a bactéria termófila *G. thermoglucosidasius* B-14521;

- avaliar o consumo de açúcares durante a fermentação e a produção de etanol.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Cenário atual do etanol

Atualmente os Estados Unidos e o Brasil detêm quase 90% da produção mundial de etanol, utilizando como matéria-prima principal o milho e a cana-de-açúcar, respectivamente. Porém, os Estados Unidos, maior produtor mundial de etanol, vem enfrentando problemas com a grande demanda de milho, o que causou baixa do estoque e a sua conseqüente valorização, provocando o aumento dos preços do cereal e de produtos alimentícios (Chagas, 2012).

O etanol apresenta algumas diferenças importantes em relação aos combustíveis convencionais, derivados de petróleo, a principal delas é o elevado teor de oxigênio, cerca de 35% em massa do etanol, que possibilita uma combustão mais limpa e com melhor desempenho dos motores, o que contribui para reduzir as emissões poluidoras (Silva, 2010).

De acordo com o Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES), o Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (CGEE), a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) e a Comissão Econômica para a América Latina e o Caribe (CEPAL) (2008), a produção de etanol é efetuada em bases comerciais por duas rotas tecnológicas. Uma utilizando matérias-primas diretamente fermentáveis, como a cana-de-açúcar e a beterraba açucareira. A outra rota emprega matérias-primas amiláceas, como o milho e o trigo, cujo amido deve ser convertido em açúcares (sacarificado) antes da fermentação. Uma terceira rota, que de acordo com a União dos Produtores de Bioenergia (UDOP) deverá estar disponível em escala comercial em 2014 no Brasil, utiliza a biomassa disponível em materiais como o bagaço e a palha, sendo hidrolisadas as cadeias celulósicas para produzir uma solução fermentável de açúcares. Esta rota vem apresentando grande interesse devido ao baixo custo da matéria-prima. Na Figura 1, é apresentado um esquema indicando as principais etapas das três rotas de produção de etanol.

A utilização de 30% do bagaço de cana-de-açúcar disponível e metade da palha, quando convertidas a etanol podem produzir 400 litros por tonelada de biomassa celulósica seca (BNDES, CGEE, FAO e CEPAL, 2008).

O desenvolvimento de alternativas energéticas que visem à produção de etanol a partir de biomassas lignocelulósicas apresentam inúmeras vantagens, tanto do ponto de vista energético como ambiental. Os biocombustíveis produzidos a partir de recursos renováveis

podem ajudar a minimizar a queima de combustíveis fósseis e a produção de gás carbônico. Além disso, a biomassa lignocelulósica é uma matéria-prima de baixo custo, sustentável, renovável e abundante (Naik *et al.*, 2010; Balat, 2011; Menon & Rao, 2012).

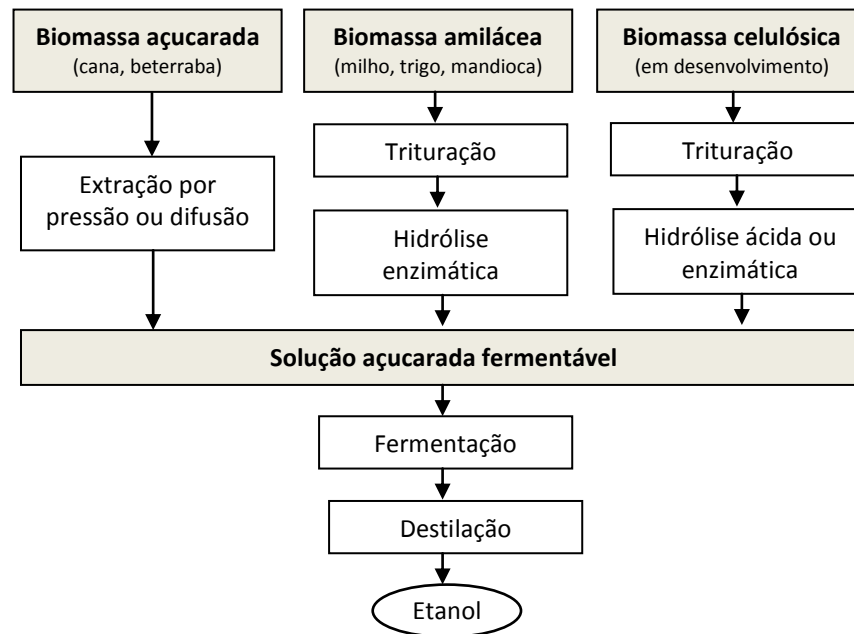


Figura 1. Rotas tecnológicas para a produção de etanol.
Fonte: BNDES, CGEE, FAO e CEPAL (2008).

O processo de conversão da biomassa lignocelulósica envolve cinco etapas principais: escolha de biomassa adequada, pré-tratamento eficaz, produção de enzimas como celulasas e hemicelulasas, hidrólise, fermentação de hexoses e pentoses (Menon & Rao, 2012). Vários métodos de pré-tratamento têm sido explorados para aumentar a acessibilidade de substratos lignocelulósicos, sendo a etapa de pré-tratamento fundamental para a se obter uma redução nos custos de produção de bioetanol (Kuhad *et al.*, 2011).

3.2 Biomassa lignocelulósica

Os materiais lignocelulósicos são os recursos renováveis mais abundantes na superfície da Terra, o que os tornam matérias-primas atrativas para a produção de etanol e outros combustíveis alternativos (Kansonh *et al.*, 1999; Szengyel, 2000; Kalogeris *et al.*, 2003; Adsul *et al.*, 2004). O uso de resíduos agrícolas de fonte lignocelulósica, apresenta o benefício de evitar o acúmulo desses resíduos, além de não contribuir para a redução na oferta de alimentos e o conseqüente aumento de preços, como ocorre com etanol de primeira geração produzido principalmente com milho (Gonzalez *et al.*, 2012; Mood *et al.*, 2013).

A composição dos materiais lignocelulósicos é bastante variável (Saha, 2003). Celulose, hemicelulose e lignina são os três maiores constituintes das paredes celulares dos vegetais; no entanto, outros compostos poliméricos, como amido, pectina e extratos estão presentes em menores quantidades (Martín *et al.*, 2007).

Uma grande variedade de recursos de biomassa vegetal está disponível no planeta e apresentam potencial ou já são utilizados para conversão em bioprodutos (Howard *et al.*, 2004), conforme o Quadro 1.

Biomassa vegetal	Resíduos	Utilização atual	Referências
Trigo, arroz, milho, soja, cevada e aveia	Palha, espigas de milho, talos, cascas, águas residuais e farelo	Alimentação animal, queimado como combustível, composto condicionador do solo	Talebna <i>et al.</i> , 2010; Xu <i>et al.</i> , 2011; Weerachanchai <i>et al.</i> , 2013; Fan <i>et al.</i> , 2013; Haykir & Bakir, 2013; Poornejad <i>et al.</i> , 2013; Sun <i>et al.</i> , 2013
Cana-de-açúcar	Bagaço e palha	Produção de combustível	Alves <i>et al.</i> , 2010; Silva <i>et al.</i> , 2011; Moraes <i>et al.</i> , 2011; Uju, <i>et al.</i> , 2012; Andrade & Colodette, 2014; Bizzo <i>et al.</i> , 2014; Moreira <i>et al.</i> , 2014.
<i>Eucalyptus</i> sp. (Resíduos de fábricas de celulose e papel)	Resíduos de fibra, licor de sulfito, jornais velhos, papel, papelão	Reutilizado na indústria de celulose, painéis, e com potencial para combustíveis	Alves <i>et al.</i> , 2010; Cheng <i>et al.</i> , 2011; McIntosh <i>et al.</i> , 2012; Uju, <i>et al.</i> , 2012; Romaní <i>et al.</i> , 2013
Madeiras de diferentes espécies	Placas antigas, móveis em desuso, serragens	Pequeno percentual reciclado, outros queimados	Brandt <i>et al.</i> , 2010; Yamashita <i>et al.</i> , 2010; Cheng <i>et al.</i> , 2011; Gonzalez <i>et al.</i> , 2012.
Gramíneas	Caule, folhas	Fonte de energia através da queimada	Digman <i>et al.</i> , 2010; Xu <i>et al.</i> , 2011; Cardona <i>et al.</i> , 2014; Fontoura <i>et al.</i> , 2014

Quadro 1. Materiais lignocelulósicos e seus suas aplicações

Na Figura 2, é apresentado um diagrama representativo da biomassa lignocelulósica, através da organização da parede celular e da distribuição dos seus principais constituintes, a celulose, hemicelulose e lignina.

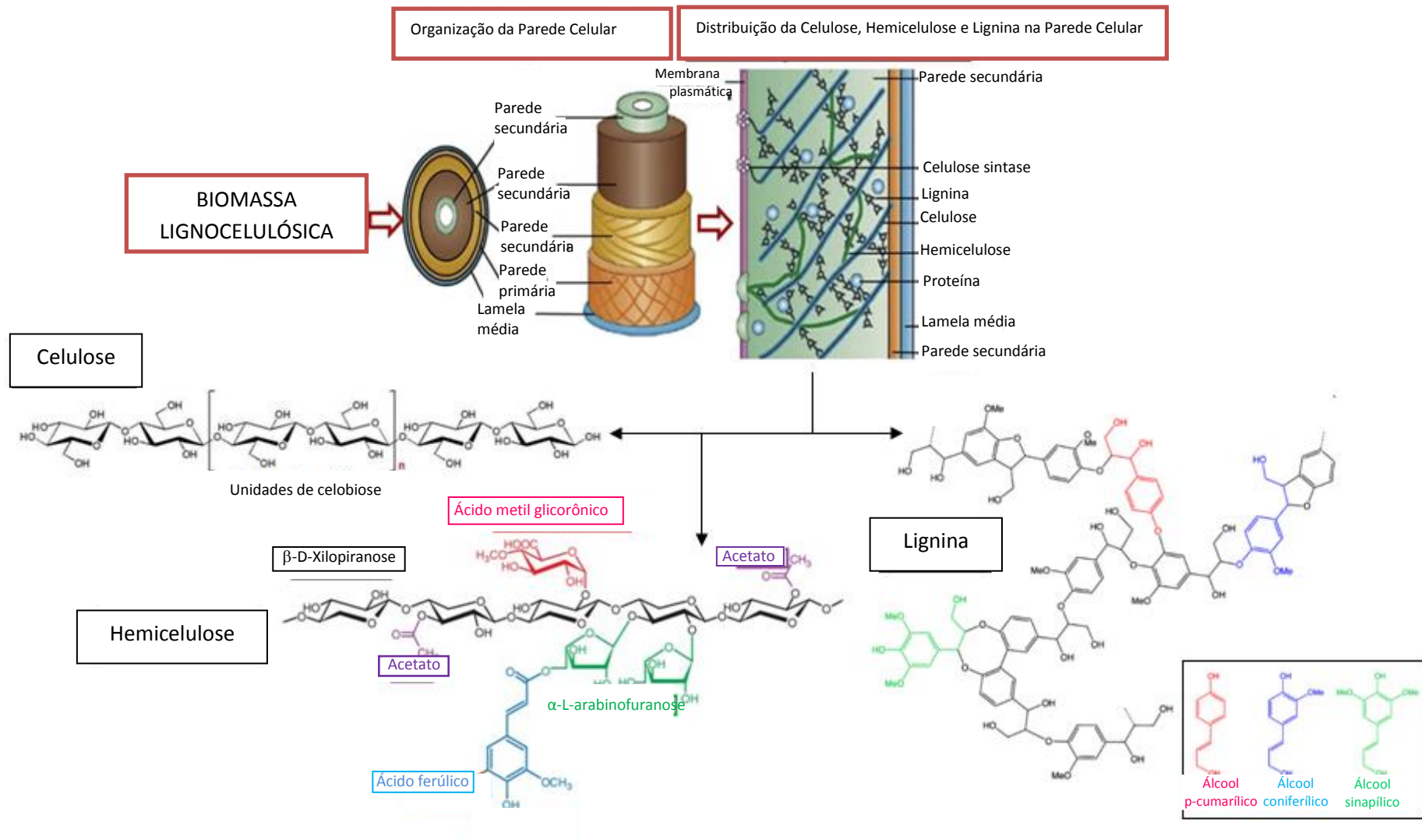


Figura 2. Organização da parede celular e distribuição da celulose, hemicelulose e lignina, adaptado de Menon & Rao (2012).

3.3 Composição da biomassa lignocelulósica

Os materiais lignocelulósicos são compostos de polímeros de carboidratos (celulose e hemicelulose), lignina e, em menor quantidade, extrativos e minerais em uma estrutura intrínseca, que é recalcitrante à desconstrução. A celulose e a hemicelulose normalmente compreendem até dois terços dos lignocelulósicos e são os substratos que potencialmente serão utilizados para a produção de etanol de segunda geração (Gírio, 2010).

Os três maiores componentes poliméricos (celulose, hemicelulose e lignina) constituem 97-99% da massa seca dos lignocelulósicos (Mosier *et al.*, 2005). Entretanto, as proporções podem ser distintas em diferentes materiais lignocelulósicos.

3.3.1 Celulose

A celulose é um homopolissacarídeo linear formado de resíduos de glicose unidos por ligações do tipo β (1-4) (Galdeano, 2001). Duas unidades adjacentes formam uma ligação glicosídica através da eliminação de uma molécula de água, que envolve os grupos hidroxílicos dos carbonos 1 e 4. Essa estrutura dissacarídica chama-se celobiose (Fengel & Wegener, 1989).

De acordo com Zheng *et al.* (2009), a celulose é geralmente organizada em microfibrilas, cada uma medindo cerca de 3-6 nm de diâmetro e contendo até 36 cadeias de glicano, com milhares de resíduos de glicose.

Segundo Medve (1997), a celulose é o composto orgânico mais abundante da Terra e a maior parte da celulose utilizada na indústria provém da madeira - 40% a 50% de celulose - e das fibras do algodão - 98% de celulose.

As cadeias de celulose agregam-se formando fibrilas e apresentam ligações de hidrogênio entre os grupamentos hidroxila intra e intercadeias, o que resulta na cristalinidade da celulose. Essas regiões cristalinas, nas quais as cadeias estão ordenadas paralelamente, são separadas por regiões menos ordenadas, conhecidas como amorfas (Galdeano, 2001). As regiões de celulose amorfa exibem baixa resistência, constituindo-se em pontos para ataques químicos e biológicos (Fan *et al.*, 1980) (Figura 3).

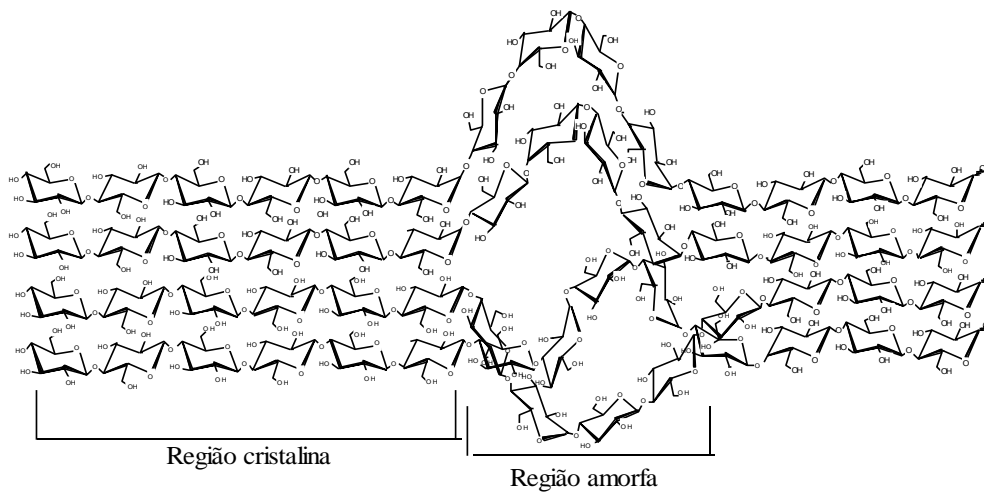


Figura 3. Estrutura da celulose com representação das regiões cristalinas e amorfas. Reproduzida de Dillon (2004).

3.3.2 Hemicelulose

Saha (2003) define a hemicelulose como um heteropolímero de pentoses (xilose, arabinose), hexoses (manose, glicose, galactose) e ácidos (Figura 4 e 5). As xilanas são as hemiceluloses mais abundantes e se constituem em heteropolissacarídeos formados por unidades de β -D-xilopiranoses unidas por ligações do tipo β -1,4 e, ocasionalmente, por ligações do tipo β -1,3. Além de xilose, a xilana pode conter arabinose, ácido glicurônico e seu 4- σ -metil-éter e grupo acetil. Todos os monômeros da hemicelulose são unidos por ligações facilmente hidrolisáveis, diferentemente da celulose (Pérez *et al.*, 2002).

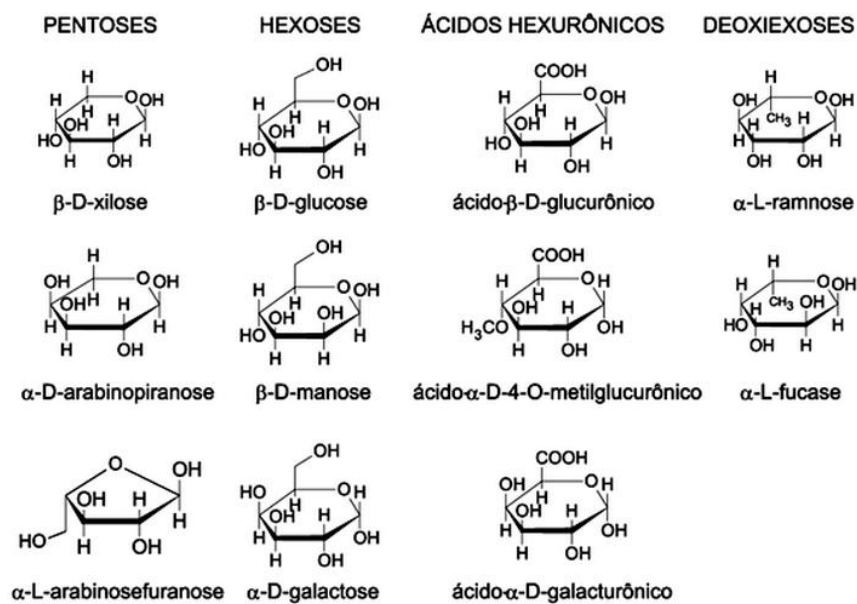


Figura 4. Moléculas que fazem parte da estrutura da hemicelulose, adaptada de Morais *et al.*, 2005 e Ferreira *et al.*, 2009.

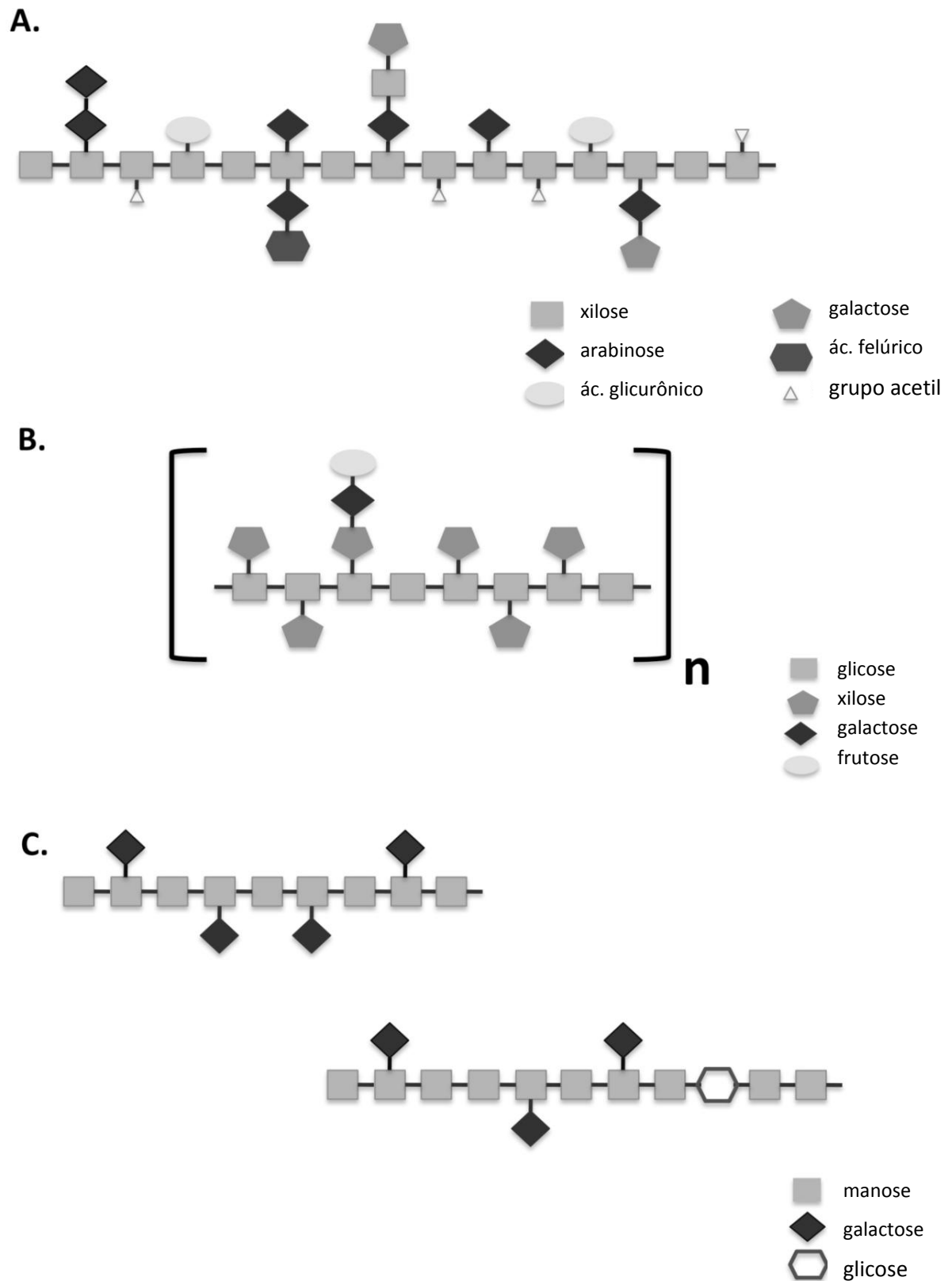


Figura 5. Representação esquemática das estruturas das três maiores hemiceluloses. A. Xilana. B. Xiliciana. C. Galactomanana. Adaptado de Souza (2013).

As hemiceluloses são estruturalmente mais parecidas com a celulose do que com a lignina e são depositadas na parede celular em um estágio anterior à lignificação. Sua estrutura apresenta ramificações e cadeias laterais que interagem facilmente com a celulose, dando estabilidade e flexibilidade ao agregado (Ramos, 2003).

3.3.3 Lignina

É uma macromolécula tridimensional amorfa encontrada na parede celular vegetal. A lignina é formada pela polimerização dos álcoois cumarílico, coniferílico e sinapílico (Figura 2). Devido à sua composição química, a lignina é hidrofóbica e extremamente resistente à decomposição. Constitui-se em uma estrutura de suporte, impermeável e resistente ao ataque microbiano, sendo a segunda macromolécula mais abundante na Terra e apresenta uma estrutura molecular bastante complexa (Pérez *et al.*, 2002), conforme a ilustrado na Figura 6.

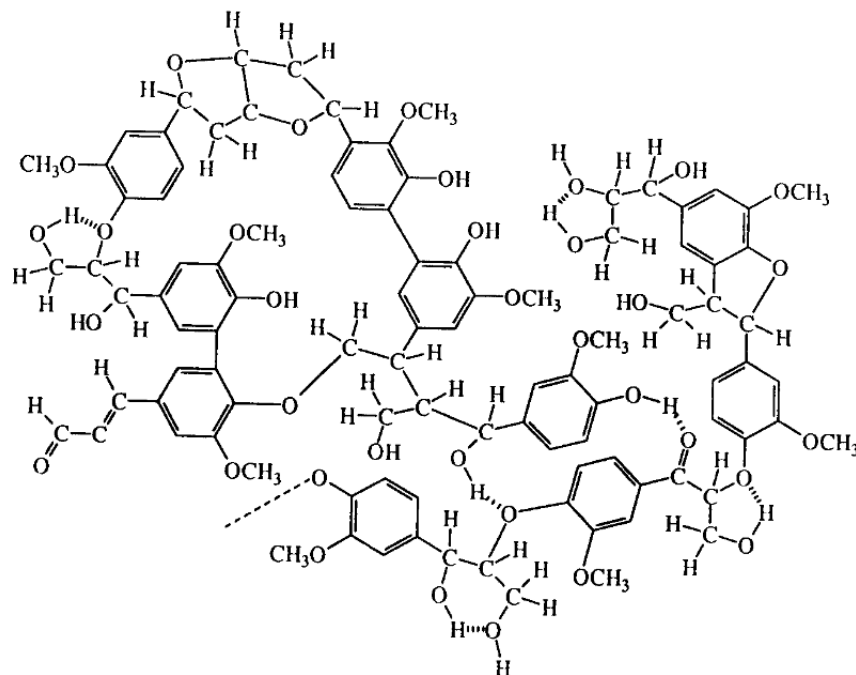


Figura 6. Estrutura da lignina, adaptada de Ferreira *et al.*, 2009.

Conforme Eggert *et al.* (1996), a lignina associa-se covalentemente com a hemicelulose, prevenindo, assim, o acesso de agentes hidrolíticos à celulose. Dessa forma, estudos da biodegradação da lignina são de grande importância para possibilitar aplicações biotecnológicas, visto que estas macromoléculas constituem o maior obstáculo para a

eficiente utilização de materiais lignocelulósicos em uma ampla faixa de processos industriais.

Além de lignina, celulose e hemicelulose, outros compostos minoritários estão presentes nos materiais lignocelulósicos. Estes representados por resinas, ácidos graxos, ceras, terpenos e compostos fenólicos (Fengel & Wegener, 1989).

3.4 Fontes de biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica vem sendo amplamente estudada como matéria-prima para a obtenção de etanol de segunda geração, além de possuir uma grande variedade de fontes lignocelulósicas que podem ser utilizadas, como por exemplo: pedaços de madeira (Shafiei *et al.*, 2013), sabugo de milho (Sun *et al.*, 2013), haste de algodão (Haykir *et al.*, 2013), palha de arroz (Pornejad *et al.*, 2013), bagaço de cana-de-açúcar (Silva *et al.*, 2011 e Uju *et al.*, 2012), folhas de palmeira de óleo (Tan & Lee, 2012), *Eucalyptus* sp. (Uju *et al.*, 2012), palha de milho (Ouellet *et al.*, 2011), choupo e gramíneas (Barr *et al.*, 2012) e *Pinus* sp. (Brandt *et al.*, 2010), entre outras espécies.

A seguir são relatadas as principais características de quatro biomassas – *Pinus* sp., *Eucalyptus* sp., bagaço de cana-de-açúcar e capim-elefante – que apresentam potencial para a obtenção de açúcares fermentáveis.

3.4.1 *Pinus* sp.

O gênero *Pinus*, apresenta várias espécies, tais como, *Pinus caribaea* var. *caribaea*, *Pinus caribaea* var. *hondurensis*, *Pinus caribaea* var. *bahamensis*, *Pinus kesiya*, *Pinus 12átula*, *Pinus oocarpa*, *Pinus tecunumanii*, *Pinus strobus* e *Pinus maximinoi*, *Pinus taeda*, e o *Pinus elliotti*, no qual apresenta maior destaque devido a facilidade nos tratamentos culturais, rápido crescimento e reprodução intensa no Sul e Sudeste do Brasil, sendo uma espécie de pinheiro, originário da Oceania.

A madeira de *Pinus* sp. apresenta em sua composição 25 a 30% de lignina, 68% de holocelulose e 55,5% de celulose (Balloni, 2009), sendo tolerante a baixas temperaturas e ao plantio em solos rasos e pouco produtivos para agricultura. Dele se origina a celulose de fibra longa, muito resistente e ideal para a fabricação de papéis para embalagens e papéis de imprensa, além da produção de madeira para chapas e MDF, para serrarias, resinas e resíduos

que vem sendo utilizados como biomassa ou substrato orgânico (Bracelpa, 2012). Atualmente a cerca de 2 milhões de hectares de *Pinus* plantados no Brasil, sendo sua produtividade anual de 35 m³ de madeira por hectare (Bracelpa, 2010).

No entanto, a serragem, originada da operação das serras, pode chegar a 12% do volume total de matéria-prima (Cassilha *et al.*, 2003), sendo geradas anualmente, no Brasil, 620 mil toneladas de serragem que em sua imensa maioria são queimados a céu aberto, descartados no ambiente ou removidas para aterros inadequados, provocando danos ao meio ambiente, principalmente em córregos, rios e mananciais (Silva, 2004).

3.4.2 *Eucalyptus* sp.

O *Eucalyptus* sp. é, atualmente, uma das principais fontes de matéria-prima para produção de papel. Pertence ao gênero *Eucalyptus*, que reúne mais de 600 diferentes espécies. Em território brasileiro, o *Eucalyptus* sp. encontrou ótimas condições de clima e solo para se desenvolver, com crescimento mais rápido que nos demais países e alto índice de produtividade, cerca de 41 m³ de madeira/hectare/ano (Bracelpa 2010), além de ser utilizado na produção de celulose, também é empregado como fonte de carvão vegetal para gerar energia, como madeira sólida usada em móveis, pisos, revestimentos e outras aplicações na construção civil (Bracelpa, 2012).

Eucalyptus globulus apresenta um maior percentual de celulose (46,3%) e de hemicelulose (17,1%) quando comparado a *Eucalyptus grandis*, que apresenta 40,2 % de celulose e 15,7% de hemicelulose. Além disso, o *E. globulus* apresenta 22,9% de lignina, enquanto que *E. grandis* apresenta 26,9% (Pereira Jr. *et al.*, 2008).

De acordo com Couto (2009), estima-se que uma serraria de porte médio destinada a produzir cerca de 2.000 m³ de madeira serrada de *Eucalyptus* por mês, gera, aproximadamente, 78 toneladas de serragem e 132 toneladas de casca.

3.4.3 Bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar é o resíduo obtido pela moagem da cana de açúcar utilizada na fabricação do açúcar e etanol de primeira geração. Este bagaço é constituído por celulose (40,2%), hemicelulose (26,4%) e lignina (25,2%) (Pereira Jr. *et al.*, 2008).

Devido à presença de celulose e de hemicelulose, tem potencial para ser utilizado na produção de etanol de segunda geração (Camassola & Dillon, 2010).

O bagaço de cana-de-açúcar contém aproximadamente um terço de energia da cana-de-açúcar. Os outros dois terços estão na sacarose e no topo e folha da planta (Goldemberg, 2008).

A produção de etanol no Brasil é realizada somente com a sacarose, mas se o bagaço resultante do processo fosse aproveitado, seria possível gerar um adicional de 3.700 a 4.000 L/ha de etanol, reduzindo o uso da terra em 33 a 38% (Souza *et al.*, 2011).

Atualmente mais de 400 usinas estão em operação no Brasil. Estas moem cerca de 660 milhões de toneladas de cana-de-açúcar por ano (CONAB, 2013). Conhecendo-se que para cada tonelada de cana moída há produção de cerca de 260 kg de bagaço com 50% de umidade, são gerados anualmente cerca de 170 milhões de toneladas de bagaço de cana-de-açúcar somente no Brasil (Camassola, 2007).

Existe na literatura uma vasta quantidade de trabalhos que empregam bagaço de cana-de-açúcar para a obtenção de açúcares fermentáveis (Gámez *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2011; Macrelli *et al.*, 2012; Qiu & Aita, 2013), mas todos estes trabalhos indicam a necessidade de pré-tratamentos para a realização de hidrólise desta biomassa lignocelulósica.

3.4.4 Capim-elefante

O capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) é uma biomassa vegetal que apresenta aproximadamente 42% de carbono, base de matéria seca, como também um rápido crescimento e alta produção de biomassa vegetal, com um alto potencial para uso como fonte alternativa de energia. Apresenta em sua composição cerca de 20% de lignina, 36% de celulose e 22% de hemicelulose (Menegol *et al.*, 2014).

A produção pode variar de 45 a 60 t/ha/ano, o que é muito maior do que a produtividade obtida pelas florestas de *Eucalyptus* sp. (Boddey & Urquiaga *et al.*, 2006).

Segundo Fontoura *et al.* (2014), o capim-elefante é uma gramínea perene, que não necessita de replantio após cada colheita e atinge 9-16 metros de altura com 2 cm de diâmetro dentro de 180 dias. Seu uso está associado com a pastagem, especialmente na alimentação de gado leiteiro, além disso, o Brasil apresenta cerca de 30 milhões de hectares com pastagens degradadas e com baixa produtividade para a alimentação animal que poderiam ser utilizados na produção de capim-elefante para a obtenção de biocombustíveis.

O capim-elefante contribui para o aumento do conteúdo de matéria orgânica e para o sequestro de carbono no solo, devido ao seu sistema radicular bem desenvolvido. Outras vantagens dessa biomassa em comparação com as demais é a grande produtividade, em menor

extensão de área para produção, menor ciclo produtivo, melhor fluxo de caixa, possibilidade de mecanização total, energia renovável e maior assimilação de carbono (Menegol, 2012).

3.5 Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica

O pré-tratamento é uma etapa realizada antes da hidrólise enzimática, tendo como funções melhorar a acessibilidade da enzima e reduzir a recalcitrância da lignocelulose (Figura 7). A recalcitrância cria uma barreira à conversão de polissacarídeos em açúcares monoméricos devido, em grande parte, à inacessibilidade de celulose.

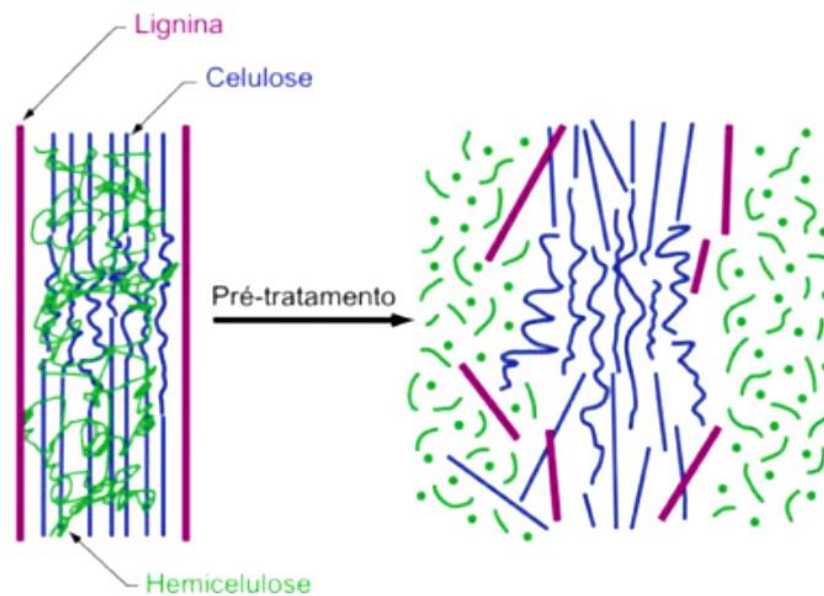


Figura 7. Alterações estruturais do complexo celulose-hemicelulose-lignina determinadas pelo pré-tratamento, adaptado de Mosier *et al.*, 2004.

Um pré-tratamento para ser eficiente deve apresentar as seguintes características: resultar em uma elevada recuperação de todos carboidratos; elevar a digestibilidade da celulose na hidrólise enzimática; aumentar a concentração de sólidos, bem como a concentração de açúcares livres na fração líquida; requerer baixa demanda de energia; evitar subprodutos; e requerer baixo investimento e custo operacional (Santos *et al.*, 2012).

Para isso, existem diversos tipos de pré-tratamentos definidos na literatura, podendo os métodos serem biológicos, físicos, químicos e físico-químicos (Qiu *et al.*, 2012), proporcionando, diferentes rendimentos e efeitos sobre a biomassa (Brandt *et al.*, 2011). O Quadro 2 apresenta as técnicas de pré-tratamento disponíveis para biomassas lignocelulósicas com ênfase na produção de etanol.

Pré-tratamento	Vantagens	Desvantagens	Referências
Trituração mecânica	- reduz a cristalinidade da celulose - não forma inibidores	- consumo de energia geralmente maior do que a energia de biomassa inerente	Alvira <i>et al.</i> , 2010; Balat, 2011; Menon & Rao, 2012; Mood <i>et al.</i> , 2013;
Explosão a vapor	- provoca a degradação da hemicelulose e transformação da lignina - possui baixo custo	- provoca a destruição de uma parte da fração de xilano - ruptura incompleta da matriz lignina-carboidrato - geração de compostos inibidores para microrganismos	Alvira <i>et al.</i> , 2010; Balat, 2011; Menon & Rao, 2012; Mood <i>et al.</i> , 2013;
AFEX	- aumenta a área de superfície acessível - remove a lignina e a hemicelulose - não produz inibidores para os processos	- não é eficiente para a biomassa com alto teor de lignina - alto custo devido a grande quantidade de amônia necessária	Alvira <i>et al.</i> , 2010; Balat, 2011; Menon & Rao, 2012; Mood <i>et al.</i> , 2013
Explosão com CO₂	- aumenta a área de superfície acessível - possui baixo custo - não provoca formação de compostos inibitórios	- não modifica a lignina e a hemicelulose - requer elevada pressão	Alvira <i>et al.</i> , 2010; Balat, 2011; Menon & Rao, 2012; Mood <i>et al.</i> , 2013
Ozonólise	- reduz o teor de lignina e hemicelulose - provoca a descristalização da celulose - não produz resíduos tóxicos	- é necessária grande quantidade de ozônio - possui alto custo	Alvira <i>et al.</i> , 2010; Balat, 2011; Menon & Rao, 2012; Mood <i>et al.</i> , 2013
Ácido concentrado	- hidrolisa hemicelulose a xilose e outros açúcares - altera a estrutura da lignina	- alto custo - equipamentos com corrosão - formação de substâncias tóxicas	Alvira <i>et al.</i> , 2010; Balat, 2011; Mood <i>et al.</i> , 2013
Ácido diluído	- menos problemas de corrosão do que com o ácido concentrado - menos formação de inibidores	- geração de produtos de degradação - baixa concentração de açúcares na corrente de saída	Alvira <i>et al.</i> , 2010
Alcalino	- remoção da lignina e hemicelulose - aumenta a área de superfície acessível	- longo tempo de residência - são formados sais incorporados à biomassa irrecuperáveis	Balat, 2011; Menon & Rao, 2012; Mood <i>et al.</i> , 2013
Solventes orgânicos	- hidrolisa a lignina e a hemicelulose	- os solventes devem ser drenados a partir do reator evaporados, condensados e reciclados - alto custo	Alvira <i>et al.</i> , 2010; Balat, 2011; Menon & Rao, 2012; Mood <i>et al.</i> , 2013
Pirólise	- produz produtos líquidos e gasosos	- alta temperatura - produção de cinzas	Balat, 2011; Mood <i>et al.</i> , 2013
Campo elétrico pulsado	- condições ambientais - rompe as células de plantas	- processo precisa de mais investigação	Balat, 2011; Mood <i>et al.</i> , 2013
Biológico	- equipamentos simples - degrada a lignina e a hemicelulose - requer baixa energia	- taxa de hidrólise é muito baixa	Balat, 2011; Mood <i>et al.</i> , 2013
Líquidos iônicos	- dissolução da celulose - aumento da receptividade a celulase	- ainda em estágios iniciais - alto custo do líquido iônico	Menon & Rao, 2012; Mood <i>et al.</i> , 2013

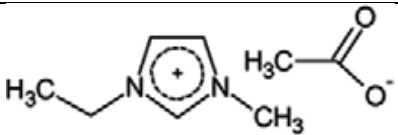
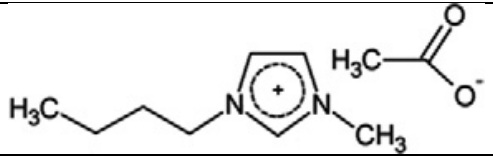
Quadro 2. Sumário das vantagens e desvantagens de diferentes métodos de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica. Adaptado de Odega & Petri (2011).

3.5.1 Pré-tratamento com Líquidos Iônicos

Os líquidos iônicos (LIs) são sais, compostos de grandes cátions orgânicos e pequenos ânions inorgânicos, que geralmente se encontram no estado líquido à temperatura ambiente. As suas propriedades de solventes podem ser variadas, ajustando-se o ânion e os constituintes do cátion alquila. Dentre estas propriedades, pode-se citar: baixas pressões de vapor, estabilidade química e térmica, não inflamável e tendência a manter-se líquido em uma ampla faixa de temperatura (Hayes, 2009), podendo também serem reutilizados com elevados rendimentos por evaporação rápida (Silva *et al.*, 2011).

A utilização de líquidos iônicos é bastante eficaz na remoção parcial da lignina e da hemicelulose e também na redução da cristalinidade da celulose (Dadi *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2009). Além disso, podem ser aplicados para dissolver uma grande variedade de biomassas lignocelulósicas, tais como, como folhas de palmeira de óleo (Tan & Lee, 2012), bagaço-de-cana, *Eucalyptus* (Uju, *et al.*, 2012), palha de milho (Ouellet, *et al.*, 2011), choupo e gramíneas (Barr, *et al.*, 2012) e Pinus (Brandt, *et al.*, 2010).

Os líquidos iônicos 1-butil-3-metilimidazólio acetato e 1-etil-3-metilimidazólio acetato (Quadro 3) apresentaram resultados promissores na dissolução da biomassa em temperaturas acima de 100°C (Brandt *et al.*, 2010; Shafiei *et al.*, 2013), além de diminuir o tempo necessário para a hidrólise enzimática e aumentar o seu rendimento (Silva *et al.*, 2011).

Líquido iônico		1-etil-3-metilimidazólio acetato	1-butil-3-metilimidazólio acetato
Estrutura molecular			
Propriedades físicas	Pureza	90%	95%
	Densidade (g/cm ³ a 25 °C)	1,027	1,055
	Ponto de ebulição (°C)	164	153
	Ponto de fusão (°C)	- 20	- 20

Quadro 3. Estrutura molecular e propriedades físicas dos solventes de celulose, 1-butil-3-metilimidazólio acetato e 1-etil-3-metilimidazólio acetato, que foram utilizados no pré-tratamento (Shafiei *et al.*, 2013).

Nos líquidos iônicos, estão presentes não somente interações, mas também interações do tipo π - π e ligações de hidrogênio (Anderson *et al.*, 2002; Weingartner, 2008). Portanto, os líquidos iônicos podem competir com os componentes de lignocelulose para ligações de hidrogênio, desestruturando assim a sua rede tridimensional (Moulthrop *et al.*, 2005). Isto é atribuído a ânions, especialmente a ânions cloreto (Swatloski *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2005; Remsing *et al.*, 2006; Dadi *et al.*, 2007; Kilpelainen *et al.*, 2007). Entretanto é proposto que cátions também interajam com a celulose, especialmente com os átomos de oxigênio de hidroxilas (Zhang *et al.*, 2005; Dadi *et al.*, 2006a, Dadi *et al.*, 2007b).

De acordo com o dados obtidos por Zavrel *et al.* (2009) o líquido iônico cloreto de 1-alil-3-metilimidazólio, capaz de dissolver diversos tipos de madeiras, especialmente madeiras com elevadas concentrações de lignina, apresenta π -elétrons, não só no seu anel de imidazólio, mas também na sua cadeia lateral.

Adicionalmente os líquidos iônicos reduzem a cristalinidade e o conteúdo de lignina, aumentando a área de superfície e, por conseguinte, de superfície para hidrólise enzimática (Chandra *et al.*, 2007).

3.5 Hidrólise enzimática

Após a realização de pré-tratamentos, a etapa seguinte consiste na hidrólise dos polissacarídeos da biomassa, gerando açúcares fermentáveis. O processo de hidrólise da celulose gera glicose, que pode ser convertida em inúmeras substâncias químicas e bioquímicas, tal como o etanol; já o produto de hidrólise da hemicelulose é uma mistura de açúcares com predominância, na maioria dos casos, de xilose (Pereira Jr. *et al.*, 2008).

Para a hidrólise de polissacarídeos, como a celulose, são empregadas enzimas produzidas por microrganismos celulotíticos. As enzimas celulolíticas incluem endoglicanases individuais, atuantes sobre as regiões amorfas de celulose e em pontos aleatórios ao longo da cadeia de glicano, produzindo glicano-oligômeros; exoglicanases, que hidrolisam a celulose cristalina em cadeias de celobiose a partir da redução ou não redução das extremidades, produzindo um dímero de glicose (celobiose) e alguns trímeros de glicose; e β -glicosidades, que atuam sobre oligômeros de glicanos solúveis e na celobiose, para produzir monômeros de glicose (Samayam & Schall *et al.*, 2010).

Entre outros microrganismos, as celulasas são produzidas por diferentes fungos filamentosos, sendo os maiores produtores os pertencentes às espécies *Trichoderma*, *Penicillium* e *Aspergillus* (Pereira Jr. *et al.*, 2008).

A hidrólise enzimática ocorre em três etapas: primeiramente, as enzimas adsorvem sobre a superfície da celulose, depois promovem a hidrólise da ligação glicosídica e, por fim, desorvem da superfície retornando à solução (Odega, 2011). A capacidade das celulasas de adsorver na superfície da celulose é uma importante característica, pois, para que ocorra a hidrólise da celulose, é necessária a interação efetiva entre o substrato insolúvel e a enzima solúvel. A adsorção ocorre nas regiões NH₂ e COOH terminal da enzima, estando separado do domínio catalítico por segmentos ricos em prolina, treonina e serina (Linder & Teerei, 1997; Wilson, 2011). A remoção do módulo de ligação ao carboidrato (CBM) reduz sua eficiência hidrolítica sobre a celulose cristalina, mas não afeta a sua atividade sobre a celulose amorfa (Gray *et al.*, 2006).

Estudos vêm sendo realizados na busca de preparações enzimáticas capazes de hidrolisar a celulose de maneira cada vez mais efetiva, seja pela combinação de enzimas para a obtenção de complexos celulásicos mais eficientes ou pelo melhoramento destes complexos por métodos de engenharia genética (Kadam *et al.*, 2004; Imai *et al.*, 2004; Jørgensen *et al.*, 2005; Camassola & Dillon 2010).

Vários fatores podem influenciar a hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos e estes podem ser associados à característica do substrato e ao comportamento das enzimas durante a sacarificação. Dentre os fatores relacionados ao substrato, vale citar alterações em sua porosidade e área superficial durante a hidrólise (Sun *et al.*, 2009), o acúmulo de lignina no meio reacional (para substratos ricos em lignina) (Pan *et al.*, 2004) e mudanças no grau de polimerização e na cristalinidade da celulose (Martín *et al.*, 2007). Já os fatores associados às enzimas correspondem à inibição retroativa devida ao acúmulo dos produtos de hidrólise (glucose e celobiose) no meio reacional (Kadam *et al.*, 2004; Cantarella *et al.*, 2004), à desnaturação térmica das enzimas em reações usualmente muito longas e o efeito da agitação mecânica (cisalhamento) sobre a atividade enzimática (Laureano-Perez *et al.*, 2005) e à adsorção irreversível das enzimas sobre a lignina e/ou complexos lignina-carboidrato (Lu *et al.*, 2002; Palonen *et al.*, 2004).

As enzimas podem se ligar à superfície dos substratos por interações específicas ou não-específicas. Estas interações não são covalentes e ocorrem por ligações de hidrogênio, por atração eletrostática ou por interação hidrofóbica (Palonen, 1995). Por outro lado, a hidrofilicidade da superfície tem um efeito considerável sobre o mecanismo e a taxa de adsorção: geralmente, quanto mais hidrofóbica for a superfície, maior será o grau de adsorção. No entanto, a presença destes grupos hidrofóbicos pode intensificar interações não-específicas com a lignina, diminuindo a disponibilidade destas para a sacarificação da celulose ou

eventualmente ocasionando a sua inativação (Palonen *et al.*, 2004). Ainda, existem problemas adicionais a este processo, como o custo e a geração de passivos ambientes, principalmente pelo consumo de água e produção de efluentes que necessitam de tratamento. A deslignificação também pode ser realizada utilizando enzimas como lignina peroxidases, manganês peroxidases e lacases, que podem ser encontradas em fungos (Rodrigues *et al.*, 2008; Schilling *et al.*, 2009). A principal desvantagem da deslignificação biológica é o tempo necessário para que ocorra a total remoção da lignina (10-14 dias) (Chandra *et al.*, 2007).

3.6 Fermentação

A fermentação é um processo de obtenção de energia utilizado por algumas bactérias e outros organismos. Ele ocorre com a quebra da glicose (ou outros substratos como o amido) em piruvato, que depois é transformado em algum outro produto, como o álcool etílico e lactato, definindo fermentação alcoólica e láctica (a fermentação também pode ser butírica, oxálica, acética). Este tipo de obtenção de energia não necessita do oxigênio comoceptor final de elétrons. Por isso, ocorre em anaerobiose. Porém, ele é dezoito vezes menos eficiente em termos de energia, gerando apenas dois ATPs por molécula de glicose (Lehninger *et al.*, 2000).

A fermentação alcoólica inicia-se com a glicólise, também conhecida como via de *Embden-Meyerhof-Parnas*, seguido pela conversão de piruvato em etanol. Um dos três destinos do piruvato produzido na glicólise depende do tipo de microrganismo e das rotas metabólicas. No caso da levedura, o piruvato é convertido em etanol e gás carbônico em um processo de dois passos. Na primeira reação, o piruvato sofre a descarboxilação em uma reação irreversível catalisada pela enzima piruvato descarboxilase. Na segunda reação, devido a ação da enzima álcool desidrogenase, o acetaldeído é reduzido a etanol, na presença do NADH. O NADH é um transportador de elétrons hidrossolúveis que se associam reversivelmente com as desidrogenases. Portanto, a levedura transforma glicose em etanol e gás carbônico, e não em lactato (Lehninger *et al.*, 2000).

Fermentação alcoólica é um processo anaeróbico catalisado por enzimas. Este processo é realizado principalmente por leveduras, em nível citoplasmático, com o objetivo de produzir energia, a qual será empregada na realização de suas atividades fisiológicas, e ainda para seu crescimento e reprodução, sendo, o etanol, tão somente, um subproduto desse processo (Lima *et al.*, 2001). Essas enzimas sofrem ações de diversos fatores (nutrientes, minerais, vitaminas, inibidores, substâncias do próprio metabolismo, pH, temperatura e

outros), alguns que estimulam e outros que reprimem a ação enzimática, afetando o desempenho do processo fermentativo conduzido pelas leveduras (Lehninger *et al*, 2000).

Na Figura 8 pode-se observar as reações que ocorrem no processo fermentativo, e as enzimas responsáveis por cada uma delas.

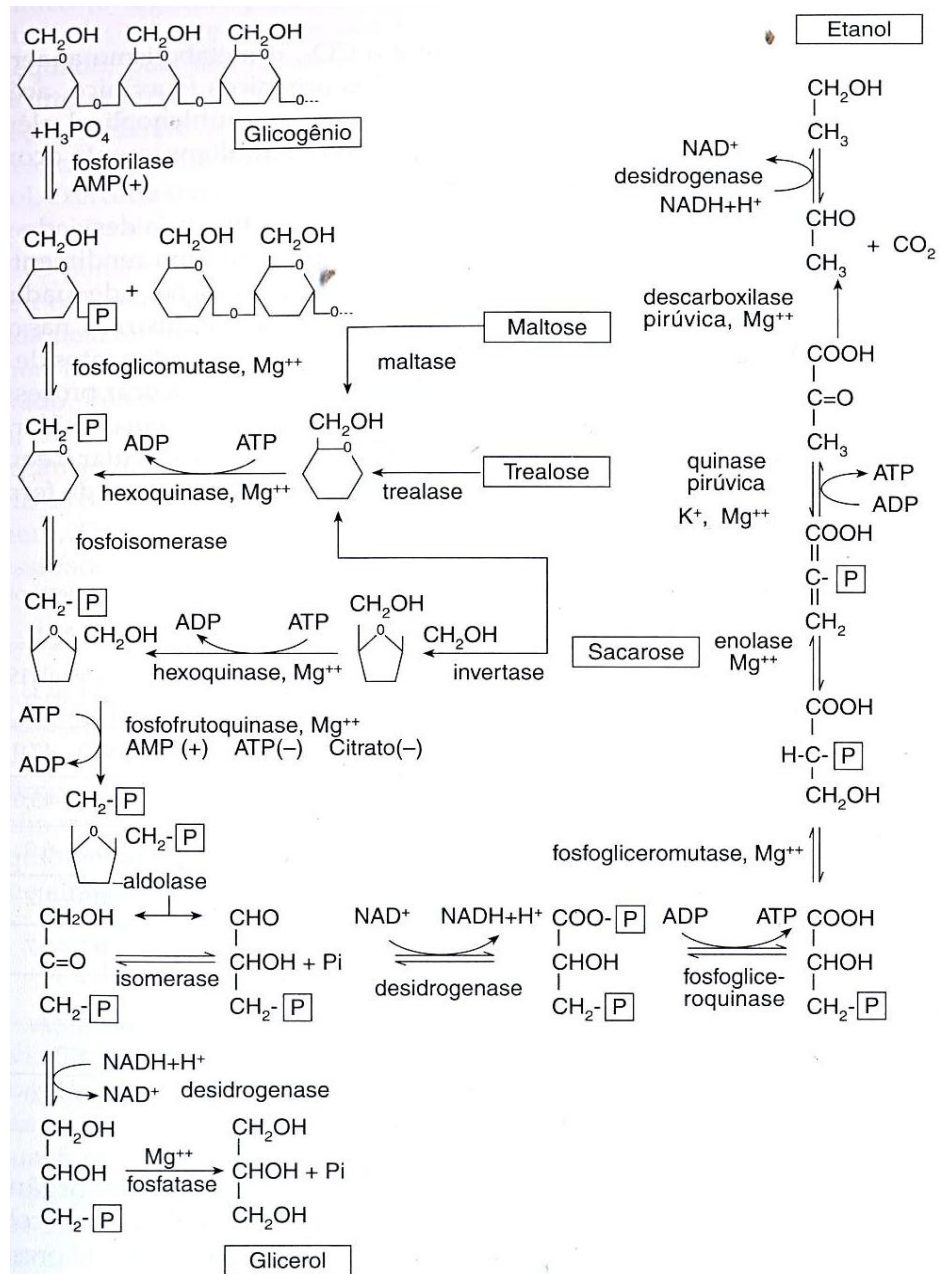


Figura 8. Sequência das reações enzimáticas na fermentação alcoólica de carboidratos endógenos (glicogênio e trealose) e exógenos (sacarose e maltose), conduzida por *Saccharomyces cerevisiae*. Fonte: Lima *et al.*, 2001.

O processo de fermentação alcoólica é a via mais importante de obtenção de etanol, tanto para a produção de etanol de primeira geração, a partir de cana-de-açúcar, quanto de

segunda geração, a partir de biomassas de composição lignocelulósica (Pereira Jr. *et al.*, 2008).

O microrganismo mais empregado na fermentação alcoólica é a levedura *S. cerevisiae*, devido à sua capacidade de assimilar facilmente a glicose da biomassa lignocelulósica (Cunha-Pereira *et al.*, 2011). Este microrganismo converte facilmente a glicose em etanol e gás carbônico (CO₂) e apresenta alta tolerância ao etanol em comparação com outras leveduras (Santos *et al.*, 2010). Entretanto, *S. cerevisiae* é incapaz de assimilar ou de fermentar pentoses como a xilose, o principal constituinte da fração hemicelulósica da biomassa.

Diversos fatores podem afetar o rendimento em etanol durante a fermentação, tais como a temperatura, a concentração de nutrientes, a presença de inibidores e o tipo de microrganismo fermentador. Para as leveduras, a concentração do inóculo, a espécie e sua linhagem afetam diretamente o desempenho do processo fermentativo, sendo que o emprego de maiores concentrações de inóculo permite a realização de fermentações mais rápidas, com maior produtividade em etanol e menor contaminação por bactérias (Lima *et al.*, 2001).

A utilização de *S. cerevisiae* para a produção de etanol celulósico sofre a interferência de inibidores que muitas vezes são formados durante o processo de pré-tratamento (Sánchez & Cardona, 2008). Geralmente, esses inibidores são compostos hidrossolúveis de baixa massa molar, como o ácido acético (vindo da desacetilação das hemiceluloses), produtos de desidratação de açúcares (furfural e hidroximetilfurfural) e produtos de degradação da lignina (compostos fenólicos), sendo que a concentração desses compostos varia com as condições de pré-tratamento e com o tipo de matéria-prima empregada.

Muitos trabalhos relatam que a formação de furfural e hidroximetilfurfural por desidratação das pentoses e hexoses, durante o processo de pré-tratamento, inibe a ação dos microrganismos fermentativos, principalmente em processos que utilizam ácido mineral diluído (Liu *et al.*, 2004). Estes inibidores danificam as paredes e membranas celulares, inibem o crescimento celular, reduzem atividades enzimáticas, causam danos ao DNA, inibem a síntese de proteínas e RNA e, por conseguinte, reduzem a produção de etanol (Van Maris *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2009). Para tornar viável a produção de etanol celulósico, estudos têm sido orientados à identificação de linhagens que sejam resistentes a inibidores gerados durante o pré-tratamento.

Na literatura há pouca informação sobre os processos de fermentação de açúcares obtidos por meio de hidrólise enzimática de biomassa pré-tratada com líquidos iônicos para a

obtenção de etanol. Ouellet *et al.* (2011) mostraram que tanto o crescimento como a produção de etanol por *S. cerevisiae* é fortemente influenciada pela presença de resíduos do [C₂mim][OAc] na biomassa recuperada após o pré-tratamento.

4 METODOLOGIA

4.1 Microrganismos

Para a fermentação dos açúcares liberados na hidrólise enzimática foram utilizadas as leveduras *S. cerevisiae*, *S. pombe* Y-698 e a bactéria termófila *G. thermoglucosidasius* B-14521.

A levedura *S. cerevisiae* foi isolada de produto comercial (Fleischmann®). *S. pombe* Y-698 e a bactéria *G. thermoglucosidasius* B-14521 foram gentilmente cedidas pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos.

4.2 Enzimas

Para a realização da hidrólise enzimática foram utilizadas enzimas - celulasas e xilanases – produzidas em cultivo em estado sólido, empregando a linhagem S1M29 de *P. echinulatum*. Esta linhagem foi obtida a partir da linhagem 9A02S1 (microrganismo depositado no *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* - DSM 18942), após várias etapas de mutagênese, caracterizando-se por ser um mutante parcialmente desreprimido à glicose (Dillon *et al.*, 2011). As enzimas liofilizadas foram gentilmente cedidas pela Dra. Rosilei Claudete Fontana para a realização das hidrólises enzimáticas.

4.3 Substratos lignocelulósicos

Utilizaram-se como substratos os seguintes materiais lignocelulósicos:

- bagaço de cana de açúcar: obtido no município de Marau, localizado na região Norte do Rio Grande do Sul (RS), região de clima subtropical úmido. Este resíduo é resultante do processamento convencional de moagem por rolos da cana-de-açúcar, para extração do caldo de cana-de-açúcar, com granulometria de aproximadamente 3 mm. A cana-de-açúcar pertence à espécie *Saccharum officinarum* foi cultivada no período de maio de 2011 a março de 2012, sem tratamento especial do solo e colheita realizada manualmente.
- capim-elefante (*Pennisetum purpureum Schumach*): coletado na cidade de Nova Petrópolis/RS em fevereiro de 2011. Foi desidratado em túnel de desidratação a 80 °C e após, triturado em moedor forrageiro a fragmento em torno de 1 cm.

- serragens de *Eucalyptus* sp. e *Pinus* sp.: foram obtidas em serrarias de Caxias do Sul/RS. Apresentavam tamanho médio de partícula em torno de 5 mm x 3 mm.

4.4 Líquidos iônicos

Foram utilizados separadamente para o pré-tratamento das biomassas lignocelulósicas os líquidos iônicos: 1-butil-3-metilimidazólio acetato, [C₄mim][OAc] e 1-etil-3-metilimidazolólio acetato [C₂mim][OAc]. Todos os líquidos iônicos utilizados eram da Sigma® (Estados Unidos).

4.5 Preparo e pré-tratamento de substratos

Os líquidos iônicos [C₄mim][OAc] e [C₂mim][OAc] foram adicionados separadamente a tubos de vidro contendo biomassa na proporção 1:4 (m/m), a uma temperatura de 120 °C por 24 h (Brandt *et al.*, 2010). Após o pré-tratamento, foi efetuada a lavagem da biomassa lignocelulósica utilizando-se a proporção de 1:10 de água destilada com subsequente centrifugação a 10 °C, 800 g , durante 15 minutos. Durante as lavagens, o sobrenadante era retirado e novo volume de água era adicionado.

Inicialmente foram realizados ensaios para determinar quantas lavagens eram necessárias para a remoção dos líquidos iônicos, sendo que nesta etapa foram realizadas cinco, dez e quinze lavagens. Após, para a realização das fermentações realizou-se cinco lavagens da biomassa. Nesta etapa foi avaliada a perda de massa, sendo utilizada a equação 1.

Equação 1:

—

Onde:

m_i = massa (g) inicial de biomassa, antes da realização do pré-tratamento;

m_f = massa (g) final de biomassa, após a realização do pré-tratamento.

4.6. Determinação da composição da biomassa

As determinações da composição das biomassas foram realizadas de acordo com as metodologias do National Renewable Energy Laboratory (NREL), seguindo as normas LAP TP-510-42618, 42619, 42622).

4.6.1 Determinação do teor de cinzas em materiais celulósicos

Quantidades de 300 mg de biomassa foram acondicionados em cadinho de porcelana, previamente calcinado e tarado, sendo então calcinada em mufla a uma temperatura de 575°C por 5 h. O teor de cinzas foi obtido pela diferença de massa entre o cadinho com cinzas e o cadinho vazio, que foi expressa em relação à quantidade de amostra inicial.

4.6.2 Extraíveis

Inicialmente, 10 g de biomassa foram submetidas a um processo de extração em aparelho Soxhlet, utilizando como solvente etanol 95%, para quantificação de extraíveis. Após a extração, o solvente foi removido por rota de evaporação, em evaporador rotativo na temperatura de 50 °C e o resíduo foi seco em balão previamente tarado. Por diferença de massas, pode-se obter o percentual do extrato em relação à massa seca do material originalmente empregado no ensaio.

4.6.3 Análise química dos substratos celulósicos

Uma quantidade conhecida de amostra seca (100 mg) foi tratada com 1 mL de ácido sulfúrico 72% (v/v) a 25°C por um período de 1 h sob agitação constante. Após este tempo, a mistura foi diluída até uma concentração de 3% (v/v) em ácido sulfúrico e a suspensão aquecida em autoclave (118°C) por 1 h para promover a hidrólise total de oligossacarídeos e polissacarídeos. Posteriormente, filtrou-se a mistura em cadinho de Gooch porosidade 2 (30 mL) previamente tarado. O resíduo foi lavado com água quente, seco em estufa até peso constante e a percentagem de lignina insolúvel em ácido foi determinada em relação à massa seca de amostra. O filtrado foi recolhido e aferido em balão volumétrico de 100 mL para determinação da composição em carboidratos e grupos acetil dos substratos celulósicos foi

determinada no hidrolisado resultante da lignina.

Alíquotas dos hidrolisados foram centrifugadas a 10000 g, filtradas em filtros de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0,2 µm e analisadas em sistema cromatográfico Shimadzu modelo LC20AD, desgaseificador de fase móvel modelo DGU 14A, forno de aquecimento de coluna modelo CTO 20A e detectores modelos RID10A para índice de refração e SPD-20A com rede de fotodiodos para espectrofotometria no ultravioleta. A análise foi realizada em coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad) a 60°C, precedida por pré-coluna Cation-H e eluída com fase móvel H₂SO₄ 5 mM a uma vazão de 0,6 mL/min. A quantificação foi efetuada por padronização externa, com base em curvas de calibração construídas para cada componente monitorado, celobiose, glicose, xilose, arabinose, ácido acético, hidroximetilfurfural e furfural, levando-se em conta seus respectivos fatores de hidrólise ácida. Estes fatores, que foram de 0,95 para a celobiose, 0,90 para a glicose, 0,88 para xilose e arabinose e 0,72 para o ácido acético, serviram para converter cada componente nos seus respectivos derivados anidro. Os fatores referentes ao hidroximetilfurfural e furfural, que foram de 0,70 e 0,64, respectivamente, serviram para converter estes compostos em seus respectivos carboidratos de origem (glicose e xilose e arabinose, respectivamente). Os resultados obtidos para anidroglicose (computados glicose, celobiose e hidroximetilfurfural nesta operação), anidroxilose, anidroarabinose (computados 50% do valor correspondente ao furfural para cada anidroaçúcar) e grupo acetil foram, então, expressos em relação ao peso seco do material original.

4.6.4 Determinação de nitrogênio total e proteínas

A análise de proteínas totais foi realizada pelo Laboratório de Análises e Pesquisas em Alimentos (LAPA), IB-UCS, de acordo com método Kjeldahl - AOAC INTERNATIONAL (2011).

Inicialmente foi feita a digestão de 1g de amostra com 12 mL de ácido sulfúrico e mistura catalítica (7 g de K₂SO₄ e 0,8 g de CuSO₄), onde ocorre a transformação do nitrogênio da amostra em sulfato de amônio. Após, fez-se a destilação da amostra para liberação de amônia, que foi fixada em solução ácida (ácido bórico 4% m/v) e titulada com uma solução de ácido clorídrico 0,1 M até atingir a cor violeta.

As análises foram realizadas em duplicata e foi feito um branco com os reagentes e sem amostra.

Para obtenção dos resultados, utilizou-se a equação a seguir:

Equação 2:

$$\% \text{ proteínas} = \frac{(V - V_b) \times M \times f \times F \times 0,0140067}{m} \times 100$$

onde:

V = volume de solução de ácido clorídrico 0,1 M gasto na amostra em mL;

V_b = volume de solução de ácido clorídrico 0,1 M gasto na prova em branco;

M = molaridade teórica da solução de ácido clorídrico 0,1 M;

f = fator de correção a solução de ácido clorídrico 0,1 M;

m = massa da amostra em gramas;

F = fator de conversão da relação nitrogênio/proteína (para vegetais=5,75).

4.7 Hidrólise enzimática e fermentação

A hidrólise enzimática da biomassa pré-tratada foi realizada em frascos de 50 mL com tampa rosqueada, empregando carga enzimática de celulasas de 15 FPU/g, com 2% (m/v) de biomassa e com uma quantidade suficiente de tampão citrato de sódio 50 mM (pH 4,8) para completar 50 mL. Os frascos foram mantidos a 50°C, durante 24 h (Camassola & Dillon, 2007), a 100 rpm. Após 24 h, o hidrolisado foi submetido à fermentação. Para tanto, inoculou-se a concentração de 10⁶ células/mL para *S. cerevisiae* e *S. pombe* Y-698, enquanto para *G. thermoglucosidasius* B-14521 foi utilizada uma alçada. A fermentação foi realizada durante 48 horas a 28°C para as leveduras e 50°C para o *G. thermoglucosidasius*. Foram realizadas coletas de amostras em 0, 3, 6, 12, 24, 36 e 48 h de processo. Para avaliar a eficiência no consumo de ARs das fermentações utilizou-se a Equação 3:

Equação 3:

$$\text{Eficiência}_{\text{consumo AR}} = \frac{\text{ARi} - \text{ARf}}{\text{ARf}} \times 100$$

Onde:

ARi = concentração (mg.g⁻¹) de açúcares redutores no início da fermentação;

ARf = concentração (mg.g⁻¹) de açúcares redutores após a fermentação.

4.8 Determinação de açúcares redutores (ARs)

Os açúcares redutores presentes nas soluções provenientes da hidrólise enzimática

foram dosados pelo método de DNS, descrito por Miller (1959). Foi realizada em placas de 96 poços de 2 mL, onde foram adicionados volumes de 20 µL de amostra, 80 µL de água destilada e 300 µL de solução do reagente DNS. A placa foi mantida em banho a 100 °C por 5 min e, em seguida, resfriada em banho de gelo. Após o resfriamento, transferiu-se 100 µL da reação para uma placa de 96 poços para leitura espectrofotométrica, onde foram adicionados 200 µL de água destilada. A absorbância das preparações foi medida em espectrofotômetro Spectramax 190 a 545 nm.

Foi construída uma curva padrão de glicose com concentrações de 0, 0,25, 0,50, 1,00, 1,50, 2,00 e 3,00 g/L, para converter os valores de absorbância para concentração de açúcares.

4.9 Determinações de açúcares e etanol

A dosagem de açúcares e de etanol foi realizada em sistema cromatográfico foi realizada tal como descrito no item Análise química dos substratos celulósicos (item 3.16).

Equação 4:

$$\text{Concentração teórica de etanol} = \frac{C_{i \text{ C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6} \times 2 (\text{MM}_{\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}})}{\text{MM}_{\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6}}$$

Onde:

$C_{i \text{ C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6}$ = Concentração de inicial de glicose (mg.g^{-1});

$\text{MM}_{\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}}$ = massa molar (g.mol^{-1}) de etanol;

$\text{MM}_{\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6}$ = massa molar (g.mol^{-1}) de etanol.

Equação 5:

$$\text{Rendimento em etanol (\%)} = \frac{C_{\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}}}{C_{t \text{ C}_2\text{H}_5\text{OH}}} \times 100$$

Onde:

$C_{\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}}$ = concentração de etanol após a fermentação (mg.g^{-1});

$C_{t \text{ C}_2\text{H}_5\text{OH}}$ = concentração teórica de etanol (mg.g^{-1})

4.10 Análise Estatística

Os resultados de hidrólise enzimática foram analisados estatisticamente por análise de variância e pós-teste de Tukey para um $p < 0,05$, utilizando-se o software *PrismGraphPad*.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados os resultados e as respectivas discussões para as seguintes etapas do trabalho: avaliação do número de lavagens das biomassas pré-tratadas com os líquidos iônicos; avaliação de perda de massa; avaliação do consumo de açúcares redutores durante as fermentações; avaliação do consumo de glicose e xilose, e produção de etanol durante a fermentação.

5.1 Avaliação do número de lavagens das biomassas pré-tratadas com líquidos iônicos

A presença de LI no meio reacional pode contribuir positivamente ou negativamente para a atividade de enzimas, além de interferir no metabolismo microbiano. Existem inúmeros trabalhos empregam enzimas associadas a LIs para catalisar inúmeras reações, mas a maioria das enzimas tem seu potencial catalítico reduzido ou totalmente desativado.

Neste sentido, a biomassa pré-tratada com os LIs [C₂mim][OAc] e [C₄mim][OAc] foi submetida a diferentes quantidades de lavagens antes de ser submetida a hidrólise e fermentação, visando a remoção do excesso de LIs. As amostras foram lavadas cinco, dez e quinze vezes e o efeito destas lavagens foram avaliadas em fermentações alcoólicas sobre *S. cerevisiae*, *S. pombe* e *G. thermoglucosidasius* (Figura 9).

Comparando-se os valores iniciais (tempo zero) de açúcares redutores liberados das biomassas de capim-elefante pré-tratadas com [C₂mim][OAc] e [C₄mim][OAc], verificou-se que não houve diferença significativa entre o número de lavagens. Mesma situação verificada para o controle. Estes dados indicam que a realização de cinco lavagens foi suficiente para evitar inibição das enzimas.

Na Figura 9 (9A, 9D e 9G) verifica-se que *S. cerevisiae* consumiu rapidamente os ARs, sendo que em 24 h praticamente não houve mais redução do conteúdo destes. O conteúdo remanescente de ARs é atribuído à presença de xilose proveniente da hidrólise da biomassa lignocelulósica que não é consumido por *S. cerevisiae*. Para *S. pombe* (9B, 9E e 9H) também houve consumo de açúcares, porém este foi mais lento em comparação a *S. cerevisiae*, mas após 48 h de processo, as concentrações de ARs eram semelhantes entre *S. pombe* e *S. cerevisiae*. Para *S. pombe* também verificou-se que houve incrementos na concentração de AR. Isto deve-se a presença de enzimas no meio que

continuaram o processo de hidrólise e ao consumo mais lento de *S. pombe* em comparação a *S. cerevisiae*.

Para *G. thermoglucosidasius* (Figura 9C, 9F e 9I) foram verificados aumentos das concentrações de ARs para todas as condições avaliadas, sendo que as maiores concentrações foram determinadas em 24 h de processo, indicando que as enzimas adicionadas para a hidrólise mantiveram a sua ação. Após 36 e 48 h verificou-se consumo de ARs, porém este foi reduzido.

Um dado que chama atenção nos tratamentos com *G. thermoglucosidasius* é o incremento das concentrações de ARs na amostra que não foi submetida à pré-tratamento, sugerindo que *G. thermoglucosidasius* produz substâncias capazes de contribuir para o aumento da liberação de ARs mesmo na ausência de pré-tratamento.

Para os processos fermentativos também não foram verificadas diferenças no consumo de ARs entre as amostras com maior número de lavagens, sendo selecionada a condição com menor número de lavagens para prosseguir os experimentos, visto do menor volume de efluente gerado e tempo consumido para a realização da atividade.

Ao contrário de outros solventes, os LIs têm a capacidade de causar a dissolução de celulose devido às suas características polares e a capacidade dos ânions dos LIs para formar ligações de hidrogênio com os grupos hidroxilo na celulose (Holm & Lassi, 2011). Este tipo de interação também pode ocorrer com outras substâncias presentes na membrana plasmática ou em outras estruturas celulares, fazendo-se necessário a remoção dos LIs para possibilitar a atuação de enzimas e microrganismos.

Sathitsuksanoth *et al.* (2012), observou taxas de hidrólise mais lentas para a palha de milho e a celulose pré-tratadas com o LI 1-butil-3-metilimidazólio cloreto, devido a uma diminuição da estabilidade da celulase na presença de resíduos de LI. Segundo ele, uma grande desvantagem de utilizar solventes no pré-tratamento da celulose é a grande quantidade de água necessária para retirar o solvente residual. Materiais pré-tratados com LIs apresentam cerca de 10-15% (v/v) de LI residual no meio, o que leva a diminuição na digestibilidade de glucano provocada pela redução da reatividade do substrato, além da inibição do produto, e a desativação da enzima.

A remoção dos LI para evitar interferência na atividade das enzimas também foi avaliada por Zao *et al.* (2009), no qual testou diferentes concentrações de LIs e observou que quanto maior é a concentração de LIs no meio, maior é a inibição na atividade da celulase de *T. reesei*, como também a consequente redução nos açúcares redutores totais ao final da

hidrólise, sendo isto provocado pela forte basicidade da ligação de hidrogênio e dos ânions acetato.

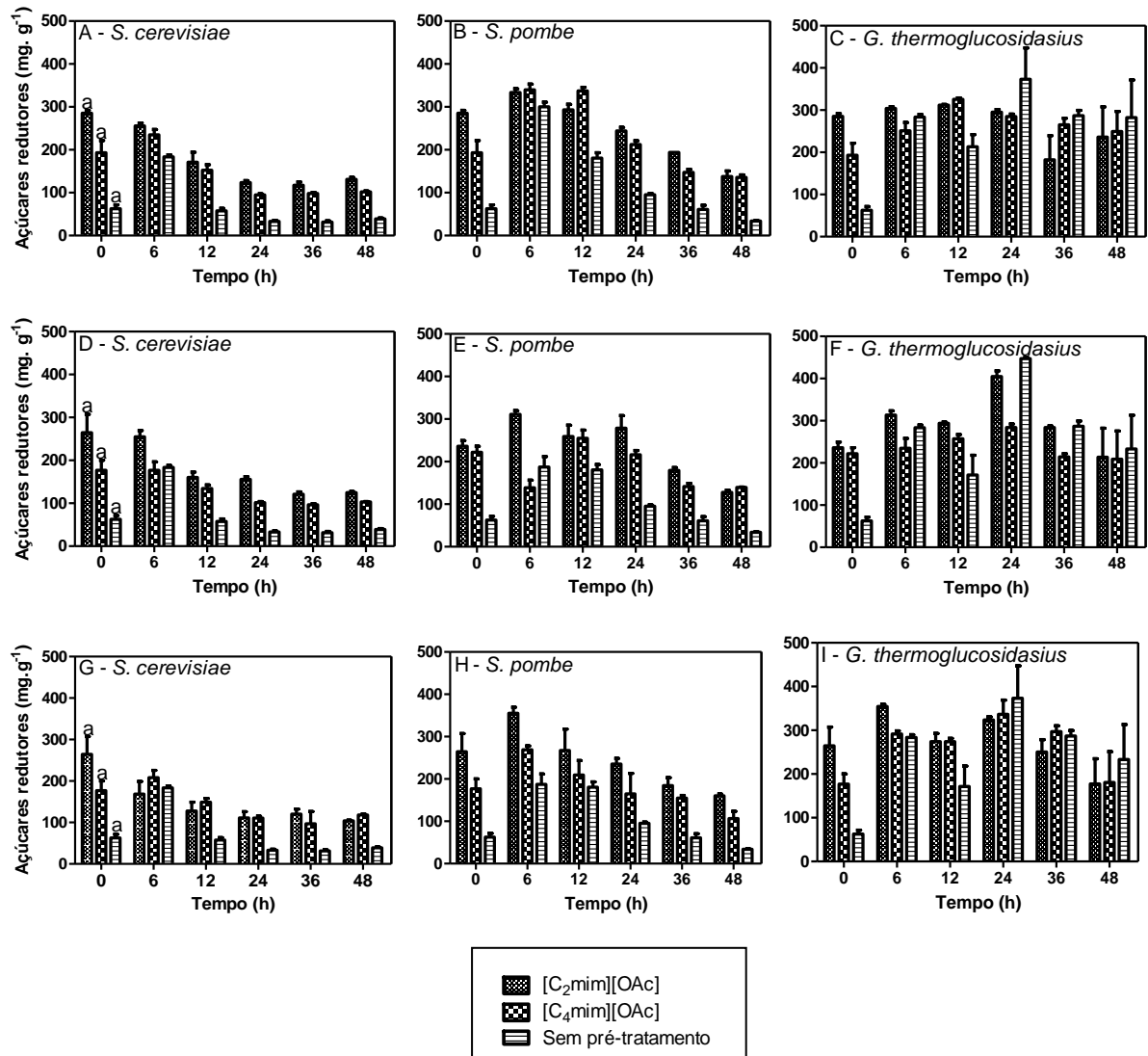


Figura 9. Consumo de açúcares redutores durante a fermentação de capim-elefante pré-tratado com os LIs $[C_2mim][OAc]$ e $[C_4mim][OAc]$ após realização de cinco (A, B e C), dez (D, E e F) e quinze (G, H e I) lavagens. As fermentações foram realizadas por *Saccharomyces cerevisiae* (A, D e G), *Schizosaccharomyces pombe* (B, E e H) e *Geobacillus thermoglucosidasius* (C, F e I). Utilizou-se como controle biomassa não submetida à pré-tratamento. Os tratamentos com a mesma letra, para cada LI avaliado entre as diferentes quantidades de lavagens, não diferem estatisticamente em nível de 5% ($< 0,05$).

Segundo Tan & Lee (2012), quando um anti-solvente tal como a água é adicionada a uma mistura de LI e biomassa, os íons do LI formam ligações de hidrogênio com as moléculas de água e são deslocados para a fase aquosa. Essas interações entre o LI e a

celulose são protegidas pelas conchas hidrodinâmicas construídas por moléculas de água em torno dos íons do LI. Conseqüentemente, a celulose que anteriormente interagiu com LI é expulsa e reconstrói suas ligações intramoleculares e intermoleculares de hidrogênio e precipita. Subseqüentemente, o precipitado é separado do LI por meio de filtração ou centrifugação.

5.2 Avaliação de perda de massa

Perdas de massa durante pré-tratamento são comuns, no entanto de acordo com a quantidade de biomassa perdida durante esta etapa, o processo pode-se tornar completamente inviável.

Na Tabela 1 são apresentados os dados referentes às perdas de massa durante os pré-tratamentos realizados com LIs. Verificou-se que o emprego de [C₂mim][OAc] resultou em maior perda de massa para as biomassa de *Pinus* sp. e *Eucalyptus* sp. Já o [C₄mim][OAc] ocasionou maior perda de massa para bagaço de cana-de-açúcar e capim-elefante.

Diferentes biomassas lignocelulósicas estudados por outros autores também mostraram perda de massa similar. Shafiei *et al.* (2013) observaram uma perda de massa de 11% em lascas de madeira pré-tratada com [C₄mim][OAc]. No entanto, Weerachanchai *et al.* (2012) relatou cerca de 20% de perda de massa para o resíduo de polpa de mandioca e 10% para a palha de arroz, quando pré-tratados com [C₂mim][OAc], 1-etil-3-fosfato metilimidazólio éter e 1,3-dimetilimidazólio sulfato. Cao & Aita (2013) encontraram 3,17 a 17,69% de perda de massa para o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com [C₂mim][OAc], dependendo do tempo de tratamento. Qiu *et al.* (2012) relataram que [C₂mim][OAc] tratados com o bagaço de cana-de-açúcar resultou em uma remoção significativa de lignina (32,0 %) com perdas de glucano e xilano, de 8,8% e 14,0%, respectivamente, e exibiram digestibilidade enzimática significativamente maior (87,0% e 64,3%) do que sem tratamento (5,5% e 2,8%) ou tratados com água (4,0% e 2,1%) do bagaço da cana-de-açúcar.

De acordo com Shafiei *et al.* (2013), cerca de 85-97% de pó de madeira macia, com um tamanho entre 295 e 833 µm e 89-100% das aparas de madeira com um tamanho inferior a 2 cm, podem ser recuperados após pré-tratamento com os mesmos LIs utilizados neste trabalho. Outros pré-tratamentos de aparas de madeira, tais como

explosão de vapor e ácido diluído, podem ter uma perda de massa que varia de 20-50% (Shafiei *et al.*, 2013).

Goshadrou *et al.* (2013) apresentou em seu estudo com madeira de álamo moída (177 – 840 μm) perda de massa de 40,5% para o pré-tratamento com ácido diluído a 1,2% (m/m) e de 18,7% a 23,8%(m/m) para o pré-tratamento com o LI [C₂mim][OAc], constatou também quanto maior o tempo de pré-tratamento com LIs, maior é a perda de massa.

Uma possível explicação para as maiores perdas de massa com [C₂mim][OAc] para *Pinus* sp. e *Eucalyptus* sp. pode estar relacionada a maior concentração de lignina presente nestas biomassas (Tabela 1). [C₂mim][OAc] poderia dissolver completamente diferentes tipos de madeira, tais como *spruce*, *beech* e *chestnut*, mas somente faria uma dissolução parcial de *silver fir* (*Abies alba*) (Zavrel *et al.*, 2009). A mais provável razão para a reduzida dissolução de *silver fir* é o elevado percentual de celulose (50,5%), enquanto a lignina fica em 27,7 %.

Qiu *et al.* (2012) observaram perdas de 15,1% de massa durante o pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar com [C₂mim][OAc] com perda de 52,6% do conteúdo de lignina. Outros estudos também indicaram que [C₂mim][OAc] é efetivo para a remoção de lignina (Lee *et al.*, 2009; Fu *et al.*, 2010; Samayam & Schall, 2010).

Shill *et al.* (2011) indicaram que as interações π - π do cátion de [C₂mim][OAc] com lignina causa a solubilização da lignina. Entretanto, a completa deslignificação da biomassa é difícil devido à localização da lignina dentro do complexo lignina-carboidrato, com fortes ligações poli-anel de C-O-C e hidrofobicidade.

Todavia, pré-tratamentos com LI exibem menor efeito sobre a deslignificação de outros processos de pré-tratamento, tais como com amônia diluída que possibilita a remoção de até 55% de lignina em bagaço de cana-de-açúcar (Aita *et al.*, 2011). Lascas de madeira pré-tratada por explosão a vapor e ácido diluído mostraram uma perda de massa entre 20 e 50% (Shafiei *et al.*, 2013). No entanto, bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com água quente e explosão a vapor mostraram perdas de massa de 2-26 % e 2-16 %, respectivamente. Os valores variaram devido a diferentes temperaturas e tempo de residência. A perda de massa variou de 17 a 50% em água quente, e de 4 a 35 % com a explosão de vapor (Laser *et al.*, 2002).

Fu *et al.* (2010) relataram que 52,7% de lignina insolúvel em ácido foi extraída de palha de tritcale por [C₂mim][OAc] a 150°C durante 2 h. Outro estudo com *switchgrass* relatou uma remoção total de lignina de 69,2%, usando [C₂mim][OAc] em 160°C durante

3 h (Li *et al.*, 2010). Adicionalmente, Kilpelainen *et al.* (2007) sugeriram que interações do tipo π - π de cátion de LIs com compostos aromáticos de lignina contribuem para a deslignificação de biomassas lignocelulósicas.

O efeito do [C₂mim][OAc] também vem sendo avaliado sobre a celulose, sendo apontada a redução da cristalinidade como a maior alteração. A celulose em sua forma nativa (celulose I) tem sido apontada como a forma mais recalcitrante que as formas regeneradas (celulose II, III, etc.) (Wada *et al.*, 2010; Chundawat *et al.*, 2011), sendo que o conhecimento das interações dos LIs com a celulose cristalina presente na parede celular de plantas é fundamental para o melhor entendimento sobre os pré-tratamentos empregando LIs. As estruturas de várias camadas de parede celular da planta e o complexo lignina-carboidratos retardam o acesso dos LIs à celulose e dificultam a interpretação da estrutura cristalina resultante após o pré-tratamento. Comparado com celulose pura (Cheng *et al.*, 2012), uma necessidade é aumentar a severidade do pré-tratamento para solubilizar biomassa. Após amostras de biomassa terem sido incubadas em [C₂mim][OAc], a baixas temperaturas (Lucas *et al.*, 2011; Samayam *et al.*, 2011), a estrutura de celulose I foi observada após o pré-tratamento. Propôs-se que a estrutura da celulose I nativa foi em grande parte destruída por [C₂mim][OAc] e recristalizada para celulose I quando [C₂mim][OAc] foi removido. Noutro estudo, o pré-tratamento de amostras de palha de milho em [C₂mim][OAc] em cargas altas de biomassa (> 35 m/m), ocorreu uma queda no índice de cristalinidade de estrutura de celulose (Wu *et al.*, 2011).

Tabela 1. Perda de massa das biomassas pré-tratadas com os líquidos iônicos

Biomassa Líquidos iônicos	Perda de massa (%)	
	[C ₂ mim][OAc]	[C ₄ mim][OAc]
Bagaço de cana-de-açúcar	18	21
Capim-elefante	26	28
<i>Pinus sp.</i>	33	27
<i>Eucalyptus sp.</i>	32	25

O LI [C₄mim][OAc], de acordo com Zhang *et al.*, (2014) atua principalmente sobre a celulose. Estudos destes autores indicaram existir interações de [C₄mim][OAc] com celulose cristalina nativa na parede celular da planta, onde a presença de moléculas LI causa intumescimento progressivo das amostras de biomassa. Além disso, houve redução da cristalinidade da celulose. Adicionalmente, Sun *et al.* (2011) salientou que os ânions de líquidos iônicos podem afetar a solubilidade da celulose na seguinte ordem

decrecente: $[\text{OAc}]^- \approx [(\text{CH}_3\text{CH}_2)_2\text{PO}_2]^- > [\text{SHCH}_2\text{COO}]^- > [\text{HCCO}]^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- \approx [\text{SCN}]$. Ainda Samayan & Schall (2010) apontam diversas vantagens para utilização de $[\text{C}_2\text{mim}][\text{OAc}]$. Este LI apresenta baixa temperatura de fusão (-20°C), baixa viscosidade, não é tóxico e é pouco corrosivo, além de ser bastante eficiente para a dissolução de biomassa lignocelulósica.

Tabela 2. Composição química da biomassa lignocelulósicas.

Biomassa Componente	Bagaço de cana-de-açúcar	Capim-elefante	<i>Pinus</i> sp.	<i>Eucalyptus</i> sp.
Extraíveis	5,23±1,24	8,84±0,83	6,99±1,13	8,13±0,89
Celulose	44,82±0,02	35,97±1,06	37,98±1,21	39,90±1,29
Hemicelulose (Xilose)	20,86±0,12	15,15±0,21	15,58±0,06	15,86±2,06
Hemicelulose (Arabinose)	1,85±0,08	5,36±0,02	1,06±0,05	1,14±0,09
Hemicelulose (grupo acetil)	1,87±0,04	1,92±0,01	0,94±0,02	1,08±0,01
Lignina	20,5±1,5	19,65±0,78	29,3±2,01	31,5±1,51
Cinzas	6,53±0,23	8,53±0,23	8,53±0,23	6,23±0,23
Proteínas	0,89	5,55	0,86	0,79

Uma das grandes vantagens da utilização de LIs para pré-tratamentos de biomassas lignocelulósicas é o elevado rendimento de açúcares que este processo possibilita. Neste trabalho, as liberações de açúcares redutores (AR) após a hidrólise enzimática, apresentaram aumentos significativos para as biomassas pré-tratadas com LIs em comparação com as biomassas sem pré-tratamento, sendo que as liberações foram cerca de 9,5 vezes superiores na presença dos LIs avaliados (Figura 10). Isso comprova a eficiência dos LIs na diminuição da recalcitrância da biomassa lignocelulósica, facilitando o acesso da enzima e promovendo o aumento na liberação de AR (Sun *et al.*, 2013).

5.3 Avaliação do consumo de açúcares redutores (ARs) durante as fermentações

Inicialmente avaliou-se a liberação de ARs das diferentes biomassas empregadas no trabalho. Verificou-se efeito positivo dos LIs avaliados para todas as biomassas empregadas. Tratamentos com LIs $[\text{C}_2\text{mim}][\text{OAc}]$ e $[\text{C}_4\text{mim}][\text{OAc}]$ também mostraram-se bastante eficazes também no tratamento de pedaços de madeira (Shafiei *et al.*, 2013), sabugo de milho (Sun *et al.*, 2013), haste de algodão (Haykir *et al.*, 2013) e palha de arroz (Poornejad *et al.*, 2013).

Yoon *et al.* (2012) estabeleceu a temperatura de 145°C como sendo a condição ótima para o pré-tratamento do bagaço de cana de açúcar com [C₂mim][OAc], mas usando apenas 14% (m/m) de biomassa. Nesta condição, obteve um rendimento AR de 69,7%. Rendimentos maiores de açúcares redutores foram obtidos no presente trabalho, embora utilizou-se tempo de incubação maior, menores temperaturas e com quantidades diferentes de LI. A concentração de ARs obtidos após hidrólise enzimática foi semelhante para ambos LIs utilizados na etapa de pré-tratamento. A realização dos pré-tratamentos com LIs permitiram o aumento na liberação de AR de 98,7 mg.g⁻¹ para a biomassa não tratada, para 947,07 e 926,45 mg.g⁻¹ para biomassa pré-tratada com [C₂mim][OAc] e [C₄mim][OAc] respectivamente, mesmo ocorrendo perda de massa.

No tempo zero os valores máximos de ARs obtidos com as serragens de *Pinus* sp. pré-tratadas com [C₂mim][OAc] foi 319,87 mg.g⁻¹ e 266,59 mg.g⁻¹, com [C₄mim][OAc], e para as serragens de *Eucalyptus* sp. foi de 280,03 mg.g⁻¹ com [C₂mim][OAc] e 250,72 mg.g⁻¹ com [C₄mim][OAc], conforme pode ser observado na Tabela 3. Yamashita *et al.* (2010) obteve 462 mg.g⁻¹ de ARs com aparas de madeira pré-tratadas por explosão de vapor (25 atm) e LI [C₄mim][OAc], e uma menor concentração de AR (69,7 mg.g⁻¹), quando utilizou para o pré-tratamento somente o LI 1-butil-3-metilimidazólio cloreto, ambos os resultados foram obtidos por hidrólise enzimática de 48 h.

Os ARs obtidos das amostras pré-tratadas com LIs, bem como as amostras provindas de biomassas que não foram submetidos a processos de pré-tratamento foram submetidas à fermentação, empregando isoladamente as leveduras *S. cerevisiae*, *S. pombe* e a bactéria *G. thermoglucosidasius*. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 10.

Verificou-se que a liberação de AR durante a hidrólise enzimática, apresentou um aumento significativo para todas as biomassas pré-tratadas com LIs em comparação com a biomassa sem pré-tratamento.

Para o bagaço de cana-de-açúcar (Figura 10A, 10B e 10C) verificou-se que os três microrganismos avaliados consumiram os ARs, sendo que *S. cerevisiae* apresentou maior velocidade de consumo. Para *S. pombe*, no meio com [C₄mim][OAc] foi determinado uma menor concentração de ARs após 12 h do início do processo que no meio com [C₂mim][OAc]. Isto pode ser atribuído um consumo mais rápido por *S. pombe* para a biomassa pré-tratada com [C₄mim][OAc] ou maior atividade de enzimas de hidrólise da biomassa pré-tratada com [C₂mim][OAc] remanescente no meio. Para *G. thermoglucosidasius* não houve diferença para o consumo de ARs provenientes dos pré-

tratamentos com os dois LIs testados, apenas verificou-se que o consumo ocorreu de forma mais lenta em relação as leveduras avaliadas.

Nas fermentações que foram empregados ARs provenientes da hidrólise de capim-elefante (Figura 10D, 10E e 10F), constatou-se um consumo mais rápido por *S. cerevisiae*. *S. pombe* e *G. thermoglucosidasius* apresentaram incrementos nas concentrações de ARs após 12 h de processo, indicando que as enzimas hidrolíticas, mesmo na presença destes microrganismos, continuavam agindo. Estes aumentos na concentração de açúcares, no início do processo de fermentação são, devido à biomassa não hidrolisada remanescente, e a presença de enzimas que são, eventualmente, desreprimidas após o consumo inicial de açúcares pelas leveduras.

Cardona *et al.* (2014) obtiveram rendimentos de ARs de 711,2 mg.g⁻¹ para o capim-elefante pré-tratado com 1,5% em massa de NaOH, durante 2 h a 100°C e hidrólise com carga enzimática de 30 FPU, durante 26 h a 50°C, sendo os rendimentos de ARs obtidos superiores ao deste trabalho, porém as condições em que foram realizados são diferentes.

Nos ARs provenientes de *Pinus* sp., *S. cerevisiae* consumiu os ARs, mas em *S. pombe* e *G. thermoglucosidasius* houve inicialmente incrementos nas concentrações de ARs, mas também observou-se consumo de ARs, principalmente para *S. pombe*. Para o *G. thermoglucosidasius* menores consumos de ARs forma observados, indicando a presença de substâncias que retardaram o consumo de ARs (Figura 10G, 10H e 10I).

Para os ARs provenientes da hidrólise de *Eucalyptus* sp., a exemplo do observado para as demais biomassas, *S. cerevisiae* mostrou ser a mais eficiente no consumo de ARs, *S. pombe* e *G. thermoglucosidasius* apresentaram incrementos nas concentrações, seguido de reduções, indicando metabolismo microbiano (Figura 10J, 10K e 10L).

Cabe ressaltar que para as serragens de *Pinus* sp. e *Eucalyptus* sp. na presença das duas leveduras houve as maiores reduções de ARs, sugerindo que nestes meios a concentração de xilose era reduzida ou estes microrganismos consumiram xilose (Figura 10G, 10H, 10J e 10K).

Durante os processos fermentativos, verificou-se que o maior consumo de ARs ocorreu entre 12 h e 24 h do início da fermentação tanto para as leveduras quanto para a bactéria. Isto ocorre porque nas primeiras horas de processo existe a necessidade de adaptação do microrganismo ao meio e o aumento do número de células.

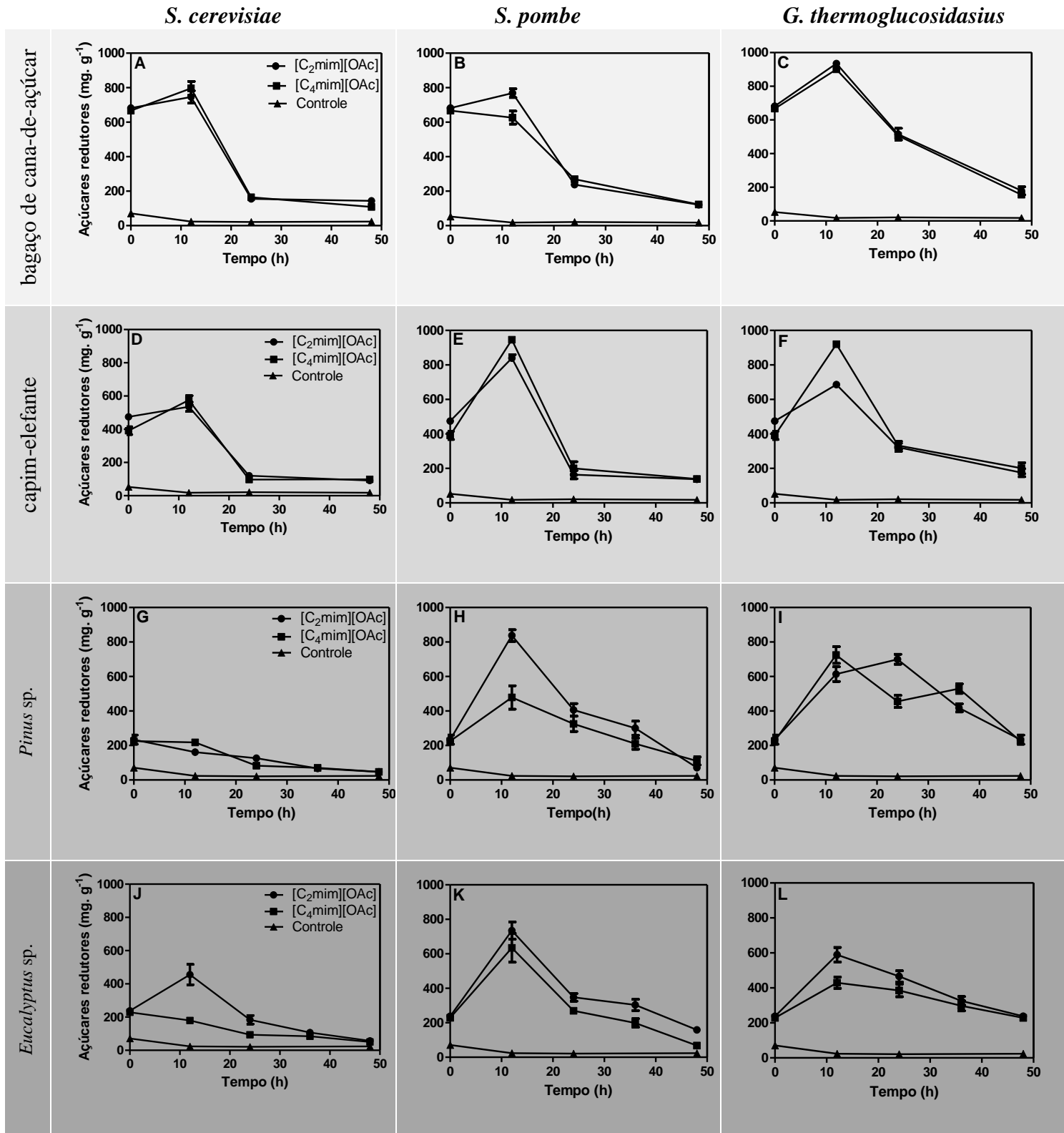


Figura 10. Consumo de açúcares redutores durante a fermentação dos açúcares liberados da hidrólise enzimática de bagaçõ de cana-de-açúcar (A, B e C), capim-elefante (D, E e F), serragem de *Pinus* sp. (G, H e I) e serragem de *Eucalyptus* sp. (J, K e L) pré-tratadas com os líquidos iônicos e sem pré-tratamento (Controle). As fermentações foram realizadas empregando as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (A, D, G e J) e *Schizosaccharomyces pombe* (B, E, H e K) e pela bactéria *Geobacillus thermoglucosidasius* (C, F, I e L).

Cheng *et al.* (2010), apresentaram rendimentos de ARs de 182,8 mg.g⁻¹, para a palha de arroz pré-tratada com 20% em massa de Ca(OH)₂ durante 1 hora e 95°C e hidrólise de 34 h a 50°C, e rendimento de AR de 118,1 mg.g⁻¹ para o pré-tratamento com NaOH a 4% em massa, durante 2 h e 55 °C e hidrólise de 45 h a 50°C.

A levedura *S. cerevisiae* apresentou um consumo máximo de 84,6% dos ARs provenientes do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com [C₄mim][OAc]. Esta foi a condição que apresentou o maior consumo de ARs quando comparado com os demais microrganismos e biomassas (Tabelas 3, 4, 5 e 6).

S. pombe apresentou um consumo de ARs semelhante para o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ambos LIs, sendo o maior consumo verificado em biomassa pré-tratada por [C₂mim][OAc], diferente do que foi observado para *S. cerevisiae*, onde [C₄mim][OAc] apresentou os maiores consumos.

Já a bactéria *G. thermoglucosidasius* apresentou maior consumo de AR quando utilizado o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com [C₄mim][OAc] (Tabelas 5 e 6), seguindo pelo capim-elefante pré-tratado com o mesmo líquido iônico. Menores consumos de AR foram verificados para as biomassas de *Pinus sp.* e *Eucalyptus sp.*

Estes dados indicam a possibilidade de realizar pré-tratamentos com os LIs [C₂mim][OAc] e [C₄mim][OAc], seguido de hidrólise enzimática para diferentes biomassa lignocelulósicas para a liberação de ARs que estes serão consumidos pelos microrganismos avaliados neste trabalho.

Tabela 3. Concentração de açúcares redutores no início e após 48 h de fermentação por *Saccharomyces cerevisiae* e a eficiência no consumo de ARs.

Biomassas	Líquidos Iônicos	Concentração de açúcares redutores (mg.g ⁻¹)		Eficiência (%)
		0 h	48h	
Bagaço de cana-de-açúcar	[C ₂ mim][OAc]	681,89	136,98	79,9
	[C ₄ mim][OAc]	667,05	102,96	84,6
Capim-elefante	[C ₂ mim][OAc]	474,30	91,00	80,8
	[C ₄ mim][OAc]	391,50	98,34	74,9
<i>Pinus sp.</i>	[C ₂ mim][OAc]	233,62	47,34	79,7
	[C ₄ mim][OAc]	225,37	49,40	78,1
<i>Eucalyptus sp.</i>	[C ₂ mim][OAc]	237,84	56,86	76,1
	[C ₄ mim][OAc]	229,06	49,40	78,4

Tabela 4. Concentração de açúcares redutores no início e após 48 h de fermentação por *Schizosaccharomyces pombe* e a eficiência no consumo de ARs.

Biomassas	Líquidos Iônicos	Concentração de açúcares redutores (mg.g ⁻¹)		Eficiência (%)
		0 h	48h	
Bagaço de cana-de-açúcar	[C ₂ mim][OAc]	681,89	121,21	82,2
	[C ₄ mim][OAc]	667,05	123,11	81,5
Capim-elefante	[C ₂ mim][OAc]	474,30	129,98	72,6
	[C ₄ mim][OAc]	391,50	132,15	66,2
<i>Pinus sp.</i>	[C ₂ mim][OAc]	233,62	70,95	69,6
	[C ₄ mim][OAc]	225,37	110,10	51,1
<i>Eucalyptus sp.</i>	[C ₂ mim][OAc]	237,84	116,26	51,1
	[C ₄ mim][OAc]	229,06	68,22	70,2

Tabela 5. Concentração de açúcares redutores no início e após 48 h de fermentação por *Geobacillus thermoglucosidasius*.e a eficiência no consumo de ARs.

Biomassas	Líquidos Iônicos	Concentração de açúcares redutores (mg.g ⁻¹)		Eficiência (%)
		0 h	48h	
Bagaço de cana-de-açúcar	[C ₂ mim][OAc]	681,89	179,201	73,7
	[C ₄ mim][OAc]	667,05	155,126	76,7
Capim-elefante	[C ₂ mim][OAc]	474,30	175,674	63,0
	[C ₄ mim][OAc]	391,50	201,369	48,6
<i>Pinus sp.</i>	[C ₂ mim][OAc]	233,62	233,62	0,0
	[C ₄ mim][OAc]	225,37	227,06	0,0
<i>Eucalyptus sp.</i>	[C ₂ mim][OAc]	237,84	237,84	0,0
	[C ₄ mim][OAc]	229,06	229,06	0,0

Tabela 6. Concentração de açúcares redutores em 12 h e após 48 h de fermentação por *Geobacillus thermoglucosidasius*.e a eficiência no consumo de ARs.

Biomassas	Líquidos Iônicos	Concentração de açúcares redutores (mg.g ⁻¹)		Eficiência (%)
		12 h	48h	
Bagaço de cana-de-açúcar	[C ₂ mim][OAc]	935,12	179,201	80,8
	[C ₄ mim][OAc]	900,71	155,126	82,8
Capim-elefante	[C ₂ mim][OAc]	686,04	175,674	74,4
	[C ₄ mim][OAc]	920,32	201,369	78,1
<i>Pinus sp.</i>	[C ₂ mim][OAc]	613,71	233,62	61,9
	[C ₄ mim][OAc]	724,53	227,06	68,7
<i>Eucalyptus sp.</i>	[C ₂ mim][OAc]	589,64	237,84	59,7
	[C ₄ mim][OAc]	429,88	229,06	46,7

Embora as diferenças no consumo de ARs tenham sido pequenas, não houve um pré-tratamento com um LI que possibilitasse as maiores eficiências, indicando que existem

peculiaridades tanto para a ação do LI como da composição da biomassa lignocelulósica para o metabolismo microbiano.

Para melhor compreensão do processo fermentativo, análises de eficiência do consumo de ARs foram realizadas. Para tanto utilizou-se as concentrações iniciais e após 48 h de fermentação, exceto para *G. thermoglucosidasius* que utilizou-se os valores de ARs em 12 h, para evitar resultados falso negativos.

Embora o consumo de ARs tenha sido avaliado empregando o reagente de DNS, análises de cromatografia também foram realizadas para avaliar o quais açúcares eram consumidos e quais eram os metabólitos produzidos.

5.4 Avaliação dos açúcares e metabólitos produzidos durante a fermentação dos ARs liberados de diferentes biomassas lignocelulósicas

5.4.1 Bagaço de cana-de-açúcar

Na Figura 11A, verifica-se que a levedura *S. cerevisiae* consumiu praticamente todo o conteúdo de glicose liberada da biomassa pré-tratada com [C₂mim][OAc] e uma pequena quantidade de xilose durante a fermentação, apenas cerca de 13% do conteúdo de xilose. Quando avaliou-se a produção de etanol, constatou-se um rendimento de 65,4 mg.g⁻¹, sendo este obtido, sem considerar o conteúdo de xilose que foi consumido, o que indica um rendimento de etanol de 49% a partir da glicose (Tabela 7). Para a biomassa pré-tratada com [C₄mim][OAc] (Figura 11B), o consumo de xilose foi de apenas 6%, mas o conteúdo de glicose foi praticamente todo consumido, restando apenas 2,9 mg.g⁻¹. O rendimento na produção de etanol foi de 56%, considerando-se apenas a fermentação da glicose liberada da biomassa. Estes dados indicam que, embora o pré-tratamento seguido pela hidrólise enzimática seja eficiente para a liberação de açúcares redutores, especialmente com [C₂mim][OAc], os resíduos deste líquido iônico interferem mais que do que os de [C₄mim][OAc] na produção de etanol por *S. cerevisiae*.

S. pombe consumiu cerca de 97% da glicose obtida da hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado tanto com [C₂mim][OAc] como com [C₄mim][OAc] (Tabela 7). Já o conteúdo de xilose praticamente não foi consumido. Foram observadas reduções de 2% da xilose quando os açúcares foram pré-tratados com [C₂mim][OAc] e apenas 0,5% quando pré-tratado com [C₄mim][OAc]. Considerando-se apenas a conversão de glicose a etanol,

verificaram-se rendimentos de 52% e 78% para [C₂mim][OAc] e [C₄mim][OAc], respectivamente (Figura 11A, 11B).

Tabela 7. Concentrações de glicose e rendimento em etanol para o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com os líquidos iônicos [C₂mim][OAc] (A) e [C₄mim][OAc] (B) antes da fermentação (Início - 0 horas) e depois (48 horas) para as leveduras *S. cerevisiae* e *S. pombe*, e a bactéria *G. thermoglucosidasius*.

Biomassa	Líquidos Iônicos	Microrganismos	Concentração de glicose (mg.g ⁻¹)		Consumo de glicose (%)	Concentração de etanol (mg.g ⁻¹)	Rendimento em etanol (%)
			0 h	48h			
Bagaço de cana-de-açúcar	[C ₂ mim][OAc]	<i>S. cerevisiae</i>	261,45	3,1	98,8	65,4	50
		<i>S. pombe</i>		6,25	97,6	69,3	52
		<i>G. thermoglucosidasius</i>		249,65	4,5	21,1	16
	[C ₄ mim][OAc]	<i>S. cerevisiae</i>	241,2	2,9	98,8	68,6	51
		<i>S. pombe</i>		6,25	97,4	96	72
		<i>G. thermoglucosidasius</i>		251,25	0	21,7	16

G. thermoglucosidasius, que segundo Cripps *et al.* (2009) tem potencial para fermentar pentoses e hexoses. Porém, neste trabalho mostrou baixo potencial para a conversão de açúcares. Consumiu apenas 11,8 mg.g⁻¹ de glicose e apenas 2,25 mg.g⁻¹ de xilose, para o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com [C₂mim][OAc] (Figura 11A), apresentando um rendimento de 15,78% em etanol considerando o conteúdo de glicose.

Já é conhecido que baixos níveis de [C₂mim][OAc] inibem significativamente a atividade de celulasas do fungo *Trichoderma reesei* (Datta *et al.*, 2010). No entanto, em microrganismos, Pfruender *et al.* (2006) conduziram um experimento para examinar a biocompatibilidade de solventes iônicos imiscíveis em água e não verificaram nenhuma perda de viabilidade quando os microrganismos examinados eram *Escherichia coli* e *S. cerevisiae*.

Já Ouellet *et al.* (2011) indicaram que tanto o crescimento como a produção de etanol por *S. cerevisiae* é fortemente influenciada por resíduos de LIs em biomassa recuperada após o pré-tratamento com [C₂mim][OAc]. Somente concentrações menores que 0,1% de LIs apresentaram mínimo impacto sobre *S. cerevisiae* BY4742.

Em sua revisão, Liu *et al.* (2012) observam que quanto maior é a concentração de LIs no meio, maior é a inibição da atividade da celulase e consequente redução na liberação dos ARs ao final da hidrólise, sendo isto provocado pela forte basicidade da ligação de hidrogênio e dos ânions acetato. Esta mesma situação pode ter interferido em proteínas de membrana ou enzimas das leveduras avaliadas neste trabalho. Outra possível ação pode ser relacionada à

integridade das membranas, uma vez que os líquidos iônicos apresentam cargas que podem ocasionar a desintegração das membranas das leveduras. Esta hipótese é sustentada pelos diferentes rendimentos obtidos na produção de etanol pelas diferentes leveduras avaliadas, visto que cada levedura apresenta composição distinta de proteínas, glucanos e lipídios presentes na sua membrana. Mas os líquidos iônicos também podem interferir de maneira diferente devido à presença de diferentes proteínas/enzimas nas diferentes leveduras avaliadas.

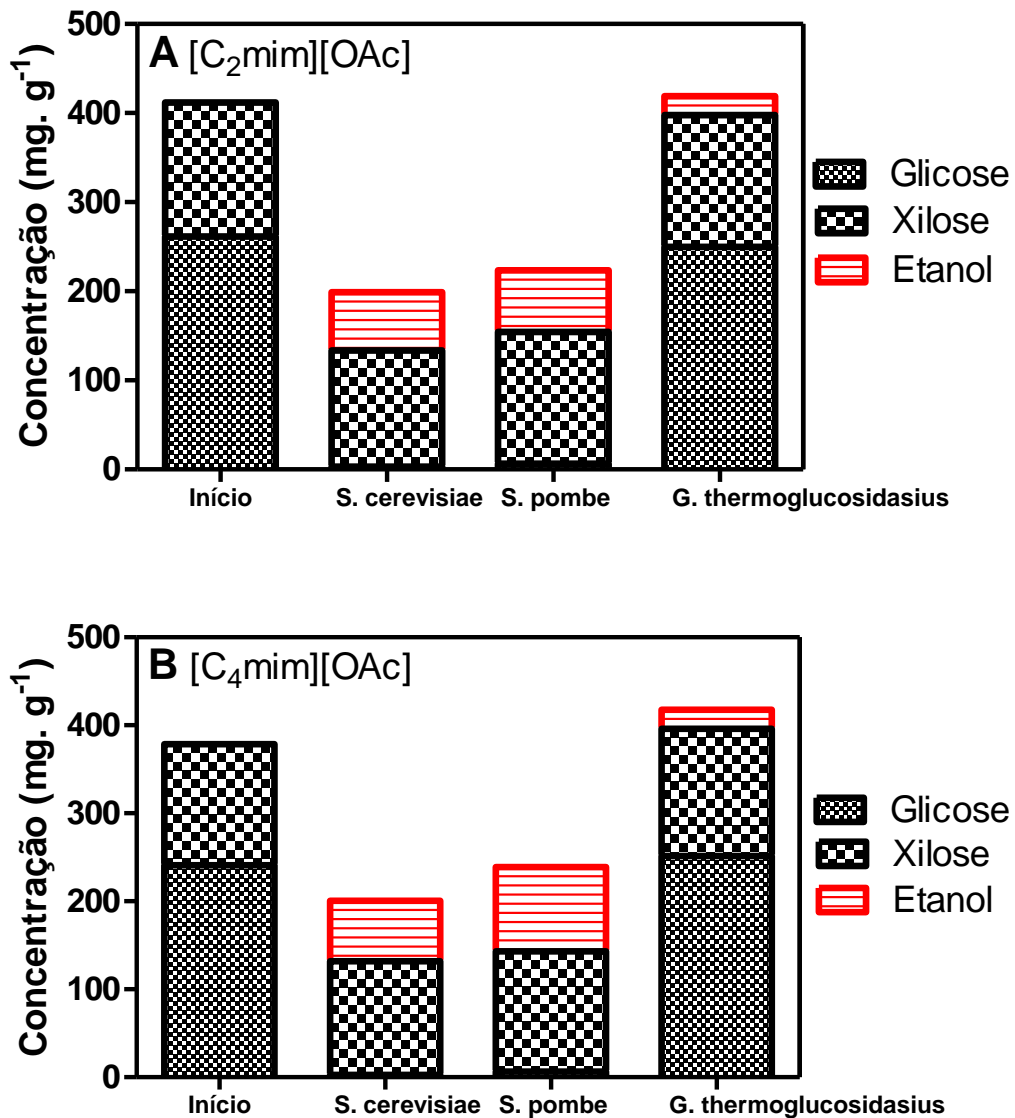


Figura 11. Concentrações da glicose, xilose e etanol para o bagaço de cana-de-açúcar, pré-tratado com os líquidos iônicos [C₂mim][OAc] (A) e [C₄mim][OAc] (B) antes da fermentação (Início - 0 horas) e depois (48 horas) para as leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* e para a bactéria *Geobacillus thermoglucosidasius*.

Em sua revisão, Liu *et al.* (2012) observam que quanto maior é a concentração de LIs no meio, maior é a inibição da atividade da celulase e consequente redução na liberação dos ARs ao final da hidrólise, sendo isto provocado pela forte basicidade da ligação de hidrogênio e dos ânions acetato. Esta mesma situação pode ter interferido em proteínas de membrana ou enzimas das leveduras avaliadas neste trabalho. Outra possível ação pode ser relacionada à integridade das membranas, uma vez que os líquidos iônicos apresentam cargas que podem ocasionar a desintegração das membranas das leveduras. Esta hipótese é sustentada pelos diferentes rendimentos obtidos na produção de etanol pelas diferentes leveduras avaliadas, visto que cada levedura apresenta composição distinta de proteínas, glucanos e lipídios presentes na sua membrana. Mas os líquidos iônicos também podem interferir de maneira diferente devido à presença de diferentes proteínas/enzimas nas diferentes leveduras avaliadas.

Comparando-se os rendimentos obtidos para as leveduras avaliadas com o bagaço de cana-de-açúcar, constatou-se que a *S. pombe*, embora tenha apresentado menor consumo de xilose, apresentou os maiores rendimentos de etanol que a *S. cerevisiae*. Estes dados diferem da literatura que sugere que linhagens de *S. cerevisiae* são consideradas as melhores produtoras de etanol. Uma possível explicação para estas diferenças poderia estar relacionada à presença de substâncias inibitórias no meio de fermentação, como ácido fórmico, ácido levulínico, furfural, 5-hidroximetilfurfural fenólicos (Kuhad *et al.*, 2011). No entanto, nos meios avaliados apenas constatou-se a presença de ácido acético, como pode ser observado na Figura 12.

De acordo com a Figura 12, cabe ressaltar que as concentrações de arabinose, xilitol e celobiose presentes nas biomassas pré-tratadas pelos dois LIs avaliados não apresentaram diferenças (Figura 12), indicando o potencial dos dois LIs avaliados para a obtenção destas substâncias. Já, a concentração de ácido acético para as leveduras diminuiu de $7,85 \text{ mg.g}^{-1}$ para $3,15 \text{ mg.g}^{-1}$, com *S. cerevisiae* e para $3,3 \text{ mg.g}^{-1}$ com *S. pombe*. Porém, a concentração de ácido acético durante a fermentação com a bactéria *G. thermoglucosidasius* aumentou para $8,8 \text{ mg.g}^{-1}$. *G. thermoglucosidasius* apresentou a menor concentração de glicerol após as 48 h de fermentação, sendo de $0,8 \text{ mg.g}^{-1}$, no entanto, as leveduras apresentaram um aumento na concentração de $0,75 \text{ mg.g}^{-1}$ para $3,4 \text{ mg.g}^{-1}$, com *S. cerevisiae* e para $6,25 \text{ mg.g}^{-1}$ para *S. pombe*.

Maiores quantidades de ácido acético foram produzidas durante o pré-tratamento com $[\text{C}_2\text{mim}][\text{OAc}]$, sendo a presença deste inibidor uma possível explicação para os menores rendimentos de etanol obtidos para as duas leveduras avaliadas. *S. pombe* que apresentou

maiores rendimentos de etanol consumiu praticamente todo ácido acético presente no meio que continha açúcares oriundos de biomassa pré-tratada por $[C_4mim][OAc]$. Já na fermentação dos açúcares da biomassa pré-tratada por $[C_2mim][OAc]$, onde havia maior concentração de ácido acético, apesar de haver consumo deste ácido, nenhuma levedura conseguiu consumir todo o conteúdo. Todavia, a quantidade consumida de ácido acético pela *S. pombe* foi semelhante nas duas situações (Figura 12). Neste caso, como resíduos de líquidos iônicos estavam presentes no meio de fermentação, sugerem-se que a *S. pombe* é mais tolerante a líquidos iônicos que a *S. cerevisiae*. Estes dados diferem dos apresentados na literatura, onde há relatos de que *S. cerevisiae* é relativamente mais tolerante a sais se comparada a outras leveduras, tais como *S. pombe* e *P. stipitis*, porém menos tolerantes do que várias espécies de *Candida* (Wadskog & Adler, 2003).

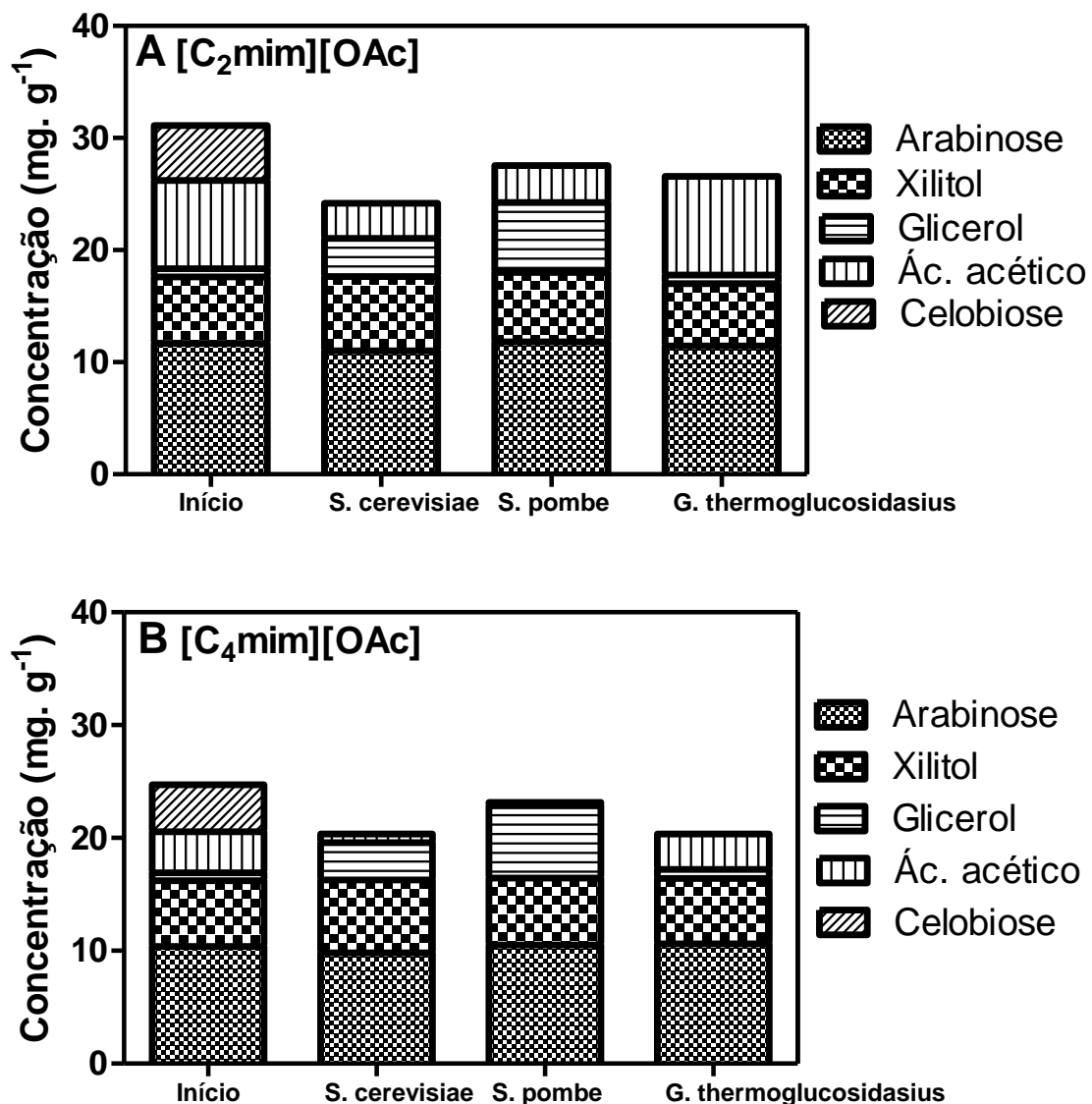


Figura 12. Concentrações de arabinose, xilitol, glicerol, ácido acético e celobiose para o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com os líquidos iônicos [C₂mim][OAc] (A) e [C₄mim][OAc] (B) antes da fermentação (Início - 0 horas) e depois (48 horas) para as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe* e a para bactéria *Geobacillus thermoglucosidasius*.

O baixo rendimento de etanol para *G. thermoglucosidasius*, pode estar relacionado à concentração de ácido acético, no qual, apresentou pequeno aumento durante a fermentação, ao contrário das leveduras que apresentaram uma significativa redução na concentração de ácido acético.

O bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com o LI [C₄mim][OAc] apresentou uma concentração de ácido acético inferior ao pré-tratamento com o LI [C₂mim][OAc]. Essa diferença na concentração de ácido acético pode ter sido a responsável pelo rendimento de etanol ter sido superior para o bagaço pré-tratado com [C₄mim][OAc], pois quanto maior a concentração de ácido acético no meio, menor foi o rendimento de etanol, demonstrando uma possível inibição das leveduras.

5.4.2 Capim-elefante

S. cerevisiae, durante a fermentação dos açúcares liberados da hidrólise de capim-elefante pré-tratado com [C₂mim][OAc], conforme a Figura 13A e a Tabela 8, apresentou-se eficiente no consumo de glicose, cerca de 98%, e pouco eficiente no consumo de xilose, cerca de 1%, sendo o rendimento em etanol de 51%, considerando-se apenas o consumo de glicose (Tabela 8). Para o capim-elefante pré-tratado com [C₄mim][OAc], conforme Figura 13B, o consumo de glicose foi de 97% e de xilose de 0,3%, apresentando um rendimento de etanol a partir de glicose de 60%. Estes dados demonstram que, apesar do consumo de glicose e, especialmente de xilose ser menor, o rendimento de etanol utilizando-se o capim-elefante pré-tratado com [C₄mim][OAc] foi superior ao pré-tratamento com [C₂mim][OAc].

De acordo com a Figura 13A e 13B e a Tabela 8, *S. pombe* consumiu cerca de 97% da glicose obtida da fermentação dos açúcares liberados do capim-elefante pré-tratado com [C₂mim][OAc] e cerca de 95% para o capim-elefante pré-tratado com [C₄mim][OAc]. Já o consumo de xilose foi maior para a biomassa pré-tratada com [C₄mim][OAc], cerca de 27% e de 15% para [C₂mim][OAc]. No entanto, o rendimento em etanol foi de 50% para o pré-tratamento com [C₂mim][OAc], sendo superior ao rendimento obtido com o LI [C₄mim][OAc], que foi de 45%. O consumo de xilose foi maior utilizando-se a levedura *S.*

pombe, quando comparada com a *S. cerevisiae*, conforme a Figura 14 sugerindo que outras substâncias presentes no meio interferem no consumo de xilose.

A bactéria *G. thermoglucosidasius* (Figura 13A e 13B) apresentou um consumo de glicose de 17% para o capim-elefante pré-tratado com [C₂mim][OAc] e de 14% para o [C₄mim][OAc]. Apesar do consumo de glicose ser maior para o capim-elefante pré-tratado com [C₂mim][OAc], o rendimento em etanol foi de 21%, sendo inferior ao capim-elefante pré-tratado com [C₄mim][OAc], no qual obteve-se 27% de rendimento (Tabela 8). O consumo de xilose apresentou-se insignificante para a biomassa pré-tratada com [C₄mim][OAc], enquanto que para o pré-tratamento com [C₂mim][OAc] foi de 7%.

Rendimentos em etanol de 62,2 mg.g⁻¹ e 141,5 mg.g⁻¹ foram encontrados por Cardona *et al.* (2014) quando utilizou capim-elefante pré-tratado a 120 °C com NaOH na proporção de 1:20 (m/m) durante 1 h, a enzima comercial utilizada na hidrólise foi a Accellerase 1500 e o tempo de fermentação foi de 36 h a 37°C.

Tabela 8. Concentrações de glicose e rendimento em etanol para o capim-elefante pré-tratado com os líquidos iônicos [C₂mim][OAc] (A) e [C₄mim][OAc] (B) antes da fermentação (Início - 0 horas) e depois (48 horas) para as leveduras *S. cerevisiae* e *S. pombe*, e a bactéria *G. thermoglucosidasius*.

Biomassa	Líquidos Iônicos	Microrganismos	Concentração de glicose (mg.g ⁻¹)		Consumo de glicose (%)	Concentração de etanol (mg.g ⁻¹)	Rendimento em etanol (%)
			0 h	48h			
Capim-elefante	[C ₂ mim][OAc]	<i>S. cerevisiae</i>	198,65	4,6	97,7	51,2	51
		<i>S. pombe</i>		5,9	97	50,3	50
		<i>G. thermoglucosidasius</i>		165,55	16,7	17,75	18
	[C ₄ mim][OAc]	<i>S. cerevisiae</i>	176,15	4,85	97,2	54,2	60
		<i>S. pombe</i>		8,7	95	40,5	45
		<i>G. thermoglucosidasius</i>		150,85	14,4	21,1	23

Xu *et al.* (2011) apresentou 94,7% de rendimento teórico em etanol para a *bermuda grass* pré-tratada com ácido fosfórico e acetona, realizando a fermentação a 38°C por 96 h, com uma carga de celulase de 25 FPU g⁻¹ e 10% (v/v) do inóculo de *S. cerevisiae*. Em outro estudo, Fan *et al.* (2013) utilizou a levedura *Pichia guilliermondii*, no qual foi anteriormente adaptada a resíduos de sabugo de milho e selecionada, hidrolisada e utilizada para a produção de etanol sem qualquer desintoxicação ou suplementação de nutrientes, através de batelada alimentada, atingindo um rendimento de 56,3 g/L de etanol.

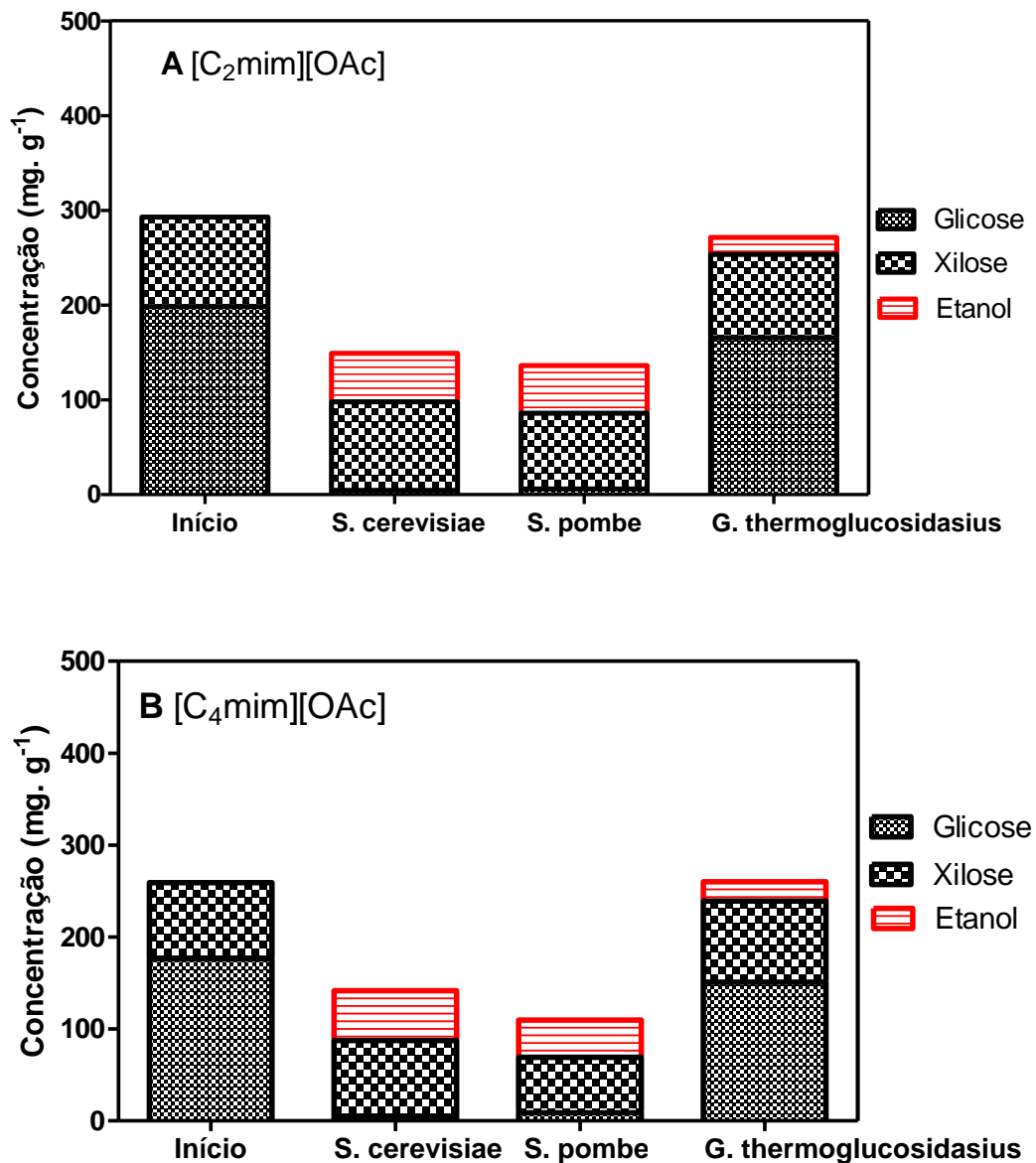


Figura 13. Concentrações da glicose, xilose e etanol para o capim-elefante, pré-tratado com os líquidos iônicos [C₂mim][OAc] (A) e [C₄mim][OAc] (B) antes da fermentação (Início - 0 horas) e depois (48 horas) para as leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* e para a bactéria *Geobacillus thermoglucosidasius*.

Na Figura 14A e 14B, observa-se que o capim-elefante pré-tratado com os LIs [C₂mim][OAc] e [C₄mim][OAc] apresentou concentrações de arabinose e de xilitol praticamente inalteradas do início ao fim da fermentação; no entanto, a concentração de ácido acético foi menor para a biomassa pré-tratada com [C₄mim][OAc] desde o início da fermentação, ocorrendo uma diminuição na concentração para as leveduras *S. cerevisiae* e *S. Pombe*. Porém, para a bactéria *G. thermoglucosidasius*, a concentração de ácido acético aumentou de 5,35 mg.g⁻¹ para 13,15 mg.g⁻¹, para o capim pré-tratado com [C₄mim][OAc].

Entretanto, o rendimento em etanol foi superior para a *G. thermoglucosidasius* com o LI [C₄mim][OAc] com relação a [C₂mim][OAc].

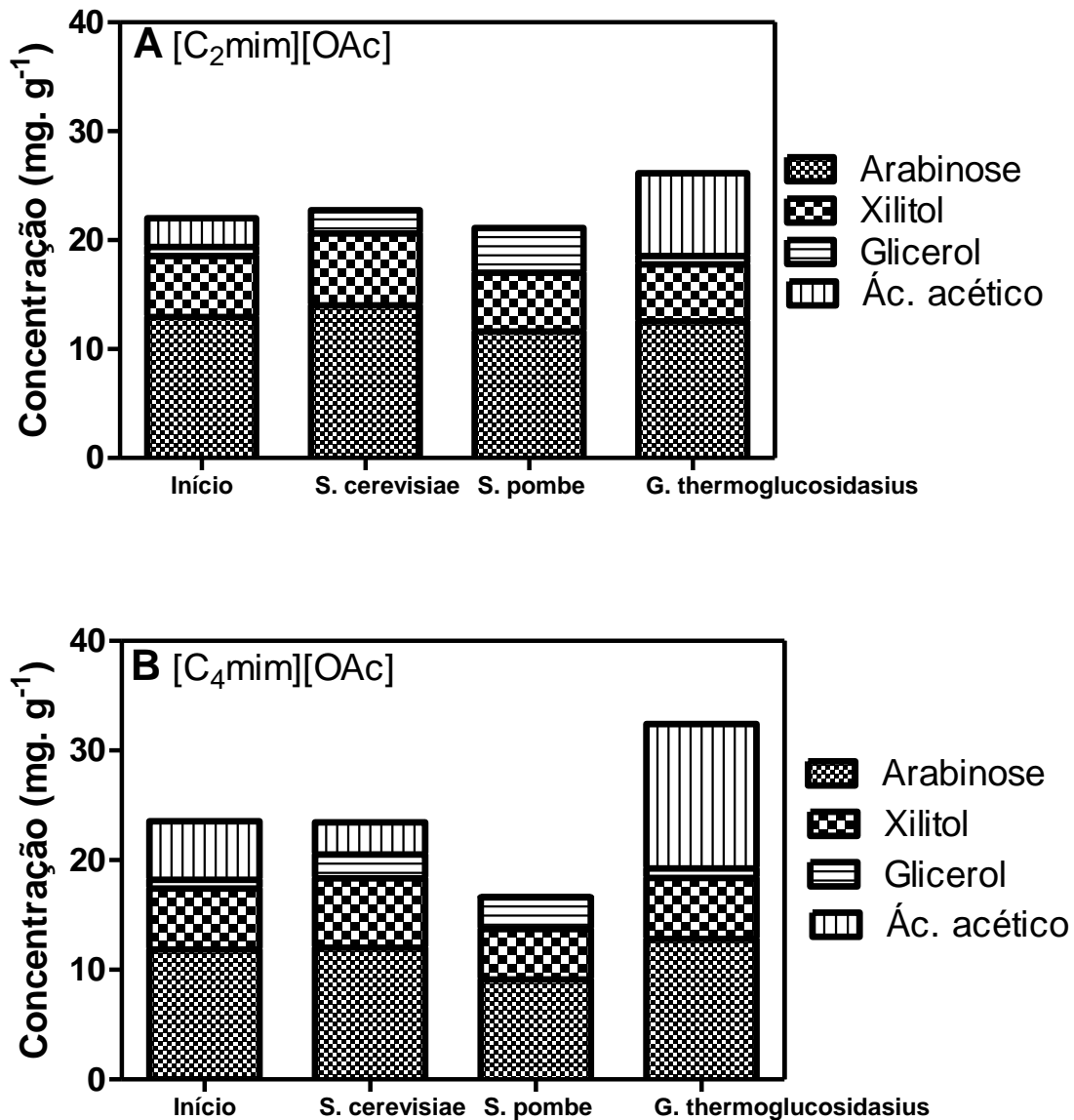


Figura 14. Concentrações de arabinose, xilitol, glicerol, ácido acético e celobiose presente nas amostras de capim-elefante pré-tratado com os líquidos iônicos [C₂mim][OAc] (A) e [C₄mim][OAc] (B) e hidrolisado por enzimas de *Penicillium echinulatum*, antes da fermentação (Início - 0 horas) e depois (48 horas) para *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* e *Geobacillus thermoglucosidasius*.

5.4.3 Serragens de *Eucalyptus* sp. e *Pinus* sp.

S. cerevisiae se mostrou mais eficiente no consumo de ARs tanto para as serragens de *Pinus* sp. quanto de *Eucalyptus* sp. pré-tratadas com ambos LIs, quando comparada com *S. pombe*, e *G. thermoglucosidasius*, sendo o maior consumo de AR de 80% obtido com *S. cerevisiae* e o LI [C₂mim][OAc].

A serragem de *Pinus* sp. pré-tratada com os LIs [C₂mim][OAc] e [C₄mim][OAc] e fermentada com a levedura *S. cerevisiae* (Figura 15A e 15B) mostraram consumo de glicose semelhante, cerca de 98%. Já o consumo de xilose foi de 54% para a biomassa pré-tratada com [C₂mim][OAc] e de 51% para o pré-tratamento com [C₄mim][OAc]. O rendimento de etanol a partir da glicose, no entanto, foi de 37% para o pré-tratamento com [C₂mim][OAc] e de cerca de 31% para o LI [C₄mim][OAc], demonstrando que apesar do consumo de glicose ter sido semelhante, o LI [C₂mim][OAc] contribuiu para um melhor rendimento. Verifica-se na Figura 15A e 15B, que *S. pombe* apresentou um consumo de glicose de 92% tanto para a serragem de *Pinus* sp. pré-tratada com [C₂mim][OAc] quanto para [C₄mim][OAc], porém, o consumo de xilose foi maior para o pré-tratamento com [C₄mim][OAc], cerca de 51%, com relação ao LI [C₂mim][OAc], cerca de 48%. O rendimento em etanol considerando apenas a glicose, foi de 33% para o [C₂mim][OAc] e de 31% para o [C₄mim][OAc].

Embora os rendimentos tenham sido reduzidos, nesta condição seria possível a obtenção de cerca de 47 L de etanol por tonelada de serragem de *Pinus* sp., porém ainda é necessário aumentar estes rendimentos para tornar o processo economicamente viável para o aproveitamento de serragem de *Pinus* sp.

Para *G. thermoglucosidasius* verificou-se que houve consumo parcial de glicose e xilose, mas pouco etanol foi produzido. O consumo de glicose e xilose de cerca de 43% e 31%, respectivamente, para a serragem de *Pinus* sp. pré-tratada com ambos LI, sendo o rendimento de 7% para a produção de etanol. Estes dados indicam que maiores tempos de fermentação ou maiores inóculos são necessários para este microrganismo.

Tabela 9. Concentrações de glicose e rendimento em etanol para a serragem de *Pinus* sp. pré-tratado com os líquidos iônicos [C₂mim][OAc] (A) e [C₄mim][OAc] (B) antes da fermentação (Início - 0 horas) e depois (48 horas) para as leveduras *S. cerevisiae* e *S. pombe*, e a bactéria *G. thermoglucosidasius*.

Biomassa	Líquidos Iônicos	Microrganismos	Concentração de glicose (mg.g ⁻¹)		Consumo de glicose (%)	Concentração de etanol (mg.g ⁻¹)	Rendimento em etanol (%)
			0 h	48h			
<i>Pinus</i> sp.	[C ₂ mim][OAc]	<i>S. cerevisiae</i>	200,45	2,98	98,51	37,45	36,55
		<i>S. pombe</i>		16,25	91,89	33,50	32,70
		<i>G. thermoglucosidasius</i>		115,30	57,52	6,75	6,59
	[C ₄ mim][OAc]	<i>S. cerevisiae</i>	179,55	2,86	98,41	33,60	36,61
		<i>S. pombe</i>		13,10	92,70	28,05	30,56
		<i>G. thermoglucosidasius</i>		102,85	42,72	6,60	7,19

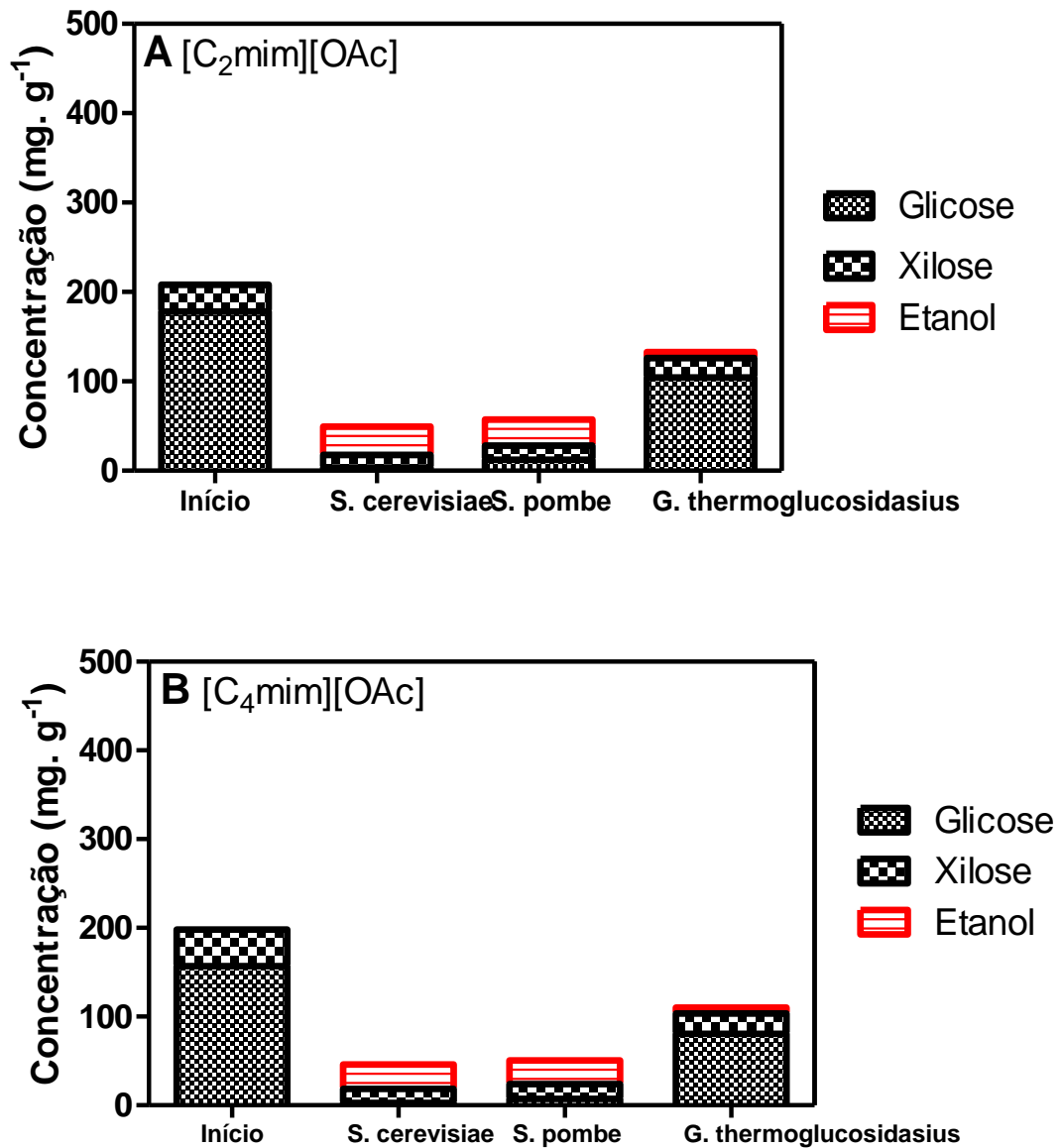


Figura 15. Concentrações da glicose, xilose e etanol nas amostras de *Pinus* sp. pré-tratado com os líquidos iônicos [C₂mim][OAc] (A) e [C₄mim][OAc] (B) e hidrolisadas com enzimas de *Penicillium echinulatum*, antes da fermentação (Início - 0 horas) e depois (48 horas) para *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* e *Geobacillus thermoglucosidasius*.

Na Figura 16, pode-se observar que serragem de *Eucalyptus* sp. pré-tratada com os LIs [C₂mim][OAc] e [C₄mim][OAc] possibilitou que as leveduras consumissem maior conteúdo de glicose. O maior consumo de glicose, cerca de 98%, foi verificado para a levedura *S. cerevisiae*. O consumo de xilose foi maior quando serragem foi pré-tratada por [C₄mim][OAc], atingindo consumos de 62% para *S. cerevisiae* e 59% para *S. pombe*.

Conforme a Tabela 10, o melhor rendimento de etanol, considerando apenas o consumo de glicose, foi obtido com a *S. cerevisiae*, sendo de 35% para ambos LIs. O maior rendimento de etanol, cerca de 37%, considerando apenas o consumo de glicose, foi obtido

com a serragem de *Pinus* sp. pré-tratada com [C₂mim][OAc] e fermentada com *S. cerevisiae* e de 35% para a serragem de *Eucalyptus* sp. pré-tratada com ambos LIs.

No trabalho de Shafiei *et al.* (2013) com lascas e pó de madeira pré-tratadas com [C₂mim][OAc], obteve-se rendimentos em etanol de 66,8% e de 81,5%, respectivamente. Já para o pré-tratamento com [C₄mim][OAc] o rendimento foi de 51,8% para as lascas de madeiras e de 81% para o pó de madeira. Apesar do pré-tratamento ter sido realizado com os mesmos líquidos iônicos e a fermentação ser realizada com leveduras da mesma espécie, o tempo de pré-tratamento, hidrólise e fermentação foram diferentes o que deve ter contribuído para os diferentes rendimentos. Yamashita *et al.* (2010), obteve 30,1 g/L de etanol utilizando pré-tratamento com explosão a vapor (45 atm), e de 73,3 g/L para o pré-tratamento com solventes orgânicos, utilizando uma concentração inicial de substrato de 200 g/L e tempo de fermentação de 48 h com *S. cerevisiae*. Romaní *et al.* (2013), através do pré-tratamento de madeira de *Eucalyptus globulus* moída com tamanho de 8 mm com explosão a vapor em diferentes condições, atingiu em rendimento de etanol 51 g/L.

Tabela 10. Concentrações de glicose e rendimento em etanol para a serragem de *Eucalyptus* sp. pré-tratada com os líquidos iônicos [C₂mim][OAc] (A) e [C₄mim][OAc] (B) antes da fermentação (Início - 0 horas) e depois (48 horas) para as leveduras *S. cerevisiae* e *S. pombe*, e a bactéria *G. thermoglucosidasius*.

Biomassa	Líquidos Iônicos	Microrganismos	Concentração de glicose (mg.g ⁻¹)		Consumo de glicose (%)	Concentração de etanol (mg.g ⁻¹)	Rendimento em etanol (%)
			0 h	48h			
<i>Eucalyptus</i> sp.	[C ₂ mim][OAc]	<i>S. cerevisiae</i>	178,30	3,39	98,10	31,55	34,62
		<i>S. pombe</i>		12,10	93,21	29,35	32,21
		<i>G. thermoglucosidasius</i>		104,50	41,39	6,80	7,46
	[C ₄ mim][OAc]	<i>S. cerevisiae</i>	157,00	2,76	98,23	27,75	34,58
		<i>S. pombe</i>		7,30	95,35	26,30	32,77
		<i>G. thermoglucosidasius</i>		80,45	48,76	6,75	8,41

Goshadrou *et al.* (2013), realizou o pré-tratamento de madeira de álamo moída com tamanho entre 177 - 840 µm com o LI [C₂mim][OAc] na proporção de 1:19 (m/m) a temperatura de 120°C durante 1 h, 3 h e 5 h, obtendo após 24 h de fermentação com *S. cerevisiae* um rendimento teórico em etanol de 73,5%, 78,9% e 81,2%, de acordo com tempo de pré-tratamento. Segundo ele, o rendimento em etanol para a madeira de álamo moída pré-tratada com ácido sulfúrico diluído a 1,2% (m/m) foi inferior ao obtido no pré-tratamento com o LI, sendo convertido 42,1% de glucano em etanol, produzindo cerca de 80 g de etanol para

1 kg de biomassa utilizada, enquanto que para o LI $[C_2mim][OAc]$ a conversão de glucano atingiu 87%, produzindo cerca de 224 g de etanol para cada kg de biomassa.

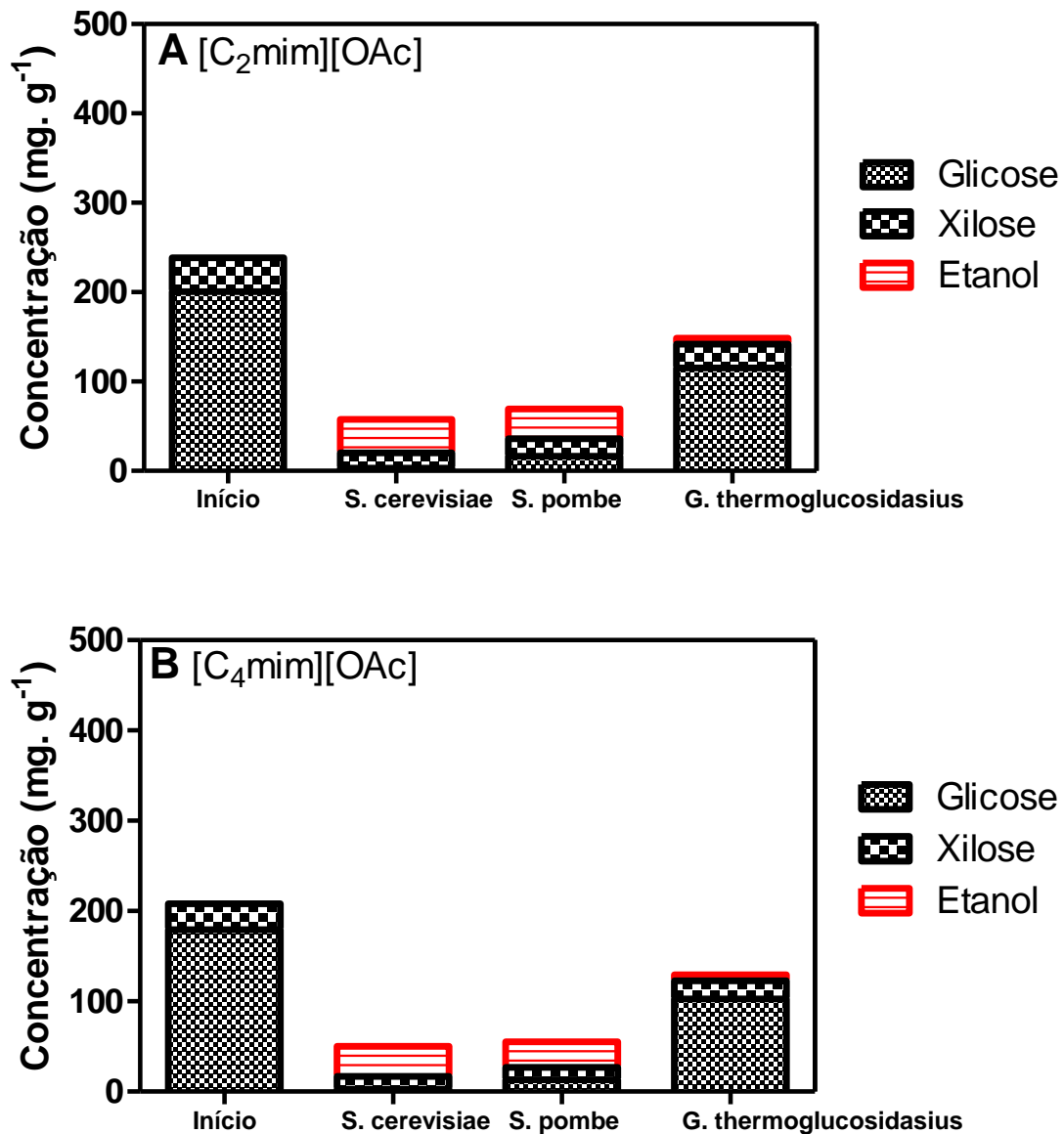


Figura 16. Concentrações de glicose, xilose e etanol para a serragem de *Eucalyptus* sp. pré-tratado com os líquidos iônicos $[C_2mim][OAc]$ (A) e $[C_4mim][OAc]$ (B) antes da fermentação (Início - 0 horas) e depois (48 horas) para *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe* e *Geobacillus thermoglucosidasius*.

Haykir & Bakir (2013), utilizando hastes de algodão pré-tratadas com o LI $[C_2mim][OAc]$ e alcalino obteve um rendimento em etanol de $22,9 \text{ mg.g}^{-1}$ e $19,8 \text{ mg.g}^{-1}$, respectivamente, o que demonstra uma maior eficiência no pré-tratamento com LIs quando comparado ao alcalino, embora os líquidos iônicos empregados também são alcalinos.

Considerando os rendimentos de etanol obtidos para a serragem de *Eucalyptus* sp. seria possível a produção de cerca de 40 L de etanol por tonelada deste resíduo.

Para as serragens de *Pinus* sp. e de *Eucalyptus* sp., observa-se, na Figura 17 e 18, que as concentrações de arabinose e o xilitol permaneceram constantes durante a fermentação, com exceção da serragem de *Eucalyptus* sp. pré-tratada com [C₄mim][OAc] (Figura 18B), onde observa-se redução na concentração de arabinose por *S. cerevisiae*. Isto indica que talvez os resíduos de [C₄mim][OAc] apresentaram interferência no metabolismo desta levedura, possibilitando o consumo da pentose arabinose.

Nas amostras que a celobiose estava presente esta foi consumida, tanto por *S. cerevisiae* e *S. pombe*, mas este consumo possivelmente foi relacionado à presença de β -glucosidase no meio. Isto ocasionou a hidrólise do dissacarídeo à glicose. Celobiose não foi detectada nas amostras de *Eucalyptus* pré-tratadas por [C₄mim][OAc], indicando que nesta condição este dissacarídeo foi convertido a glicose durante a etapa da hidrólise.

Comparando-se os rendimentos de etanol produzidos entre as leveduras *S. cerevisiae* e *S. pombe* percebe-se que embora as diferenças dos rendimentos foram reduzidos, *S. cerevisiae* apresentou maior rendimento.

Em relação às biomassas avaliadas, os maiores rendimentos de produção de etanol foram observados para *Pinus* sp., esta biomassa não continha a maior quantidade de carboidratos. *Pinus* sp. continha 38% de celulose e 16,14 % de hemicelulose, enquanto *Eucalyptus* sp. apresentava 40,05% de celulose e 16,55% de hemicelulose. Quanto a quantidade de lignina entre as duas biomassas avaliadas foram muito semelhantes, 28,7 % e 28% para *Pinus* sp. e *Eucalyptus* sp., respectivamente. Estes dados indicam que a concentração de lignina e carboidratos não são as características mais relevantes para a liberação de açúcares de biomassa pré-tratada por líquidos iônicos.

Ainda na Figura 17 e 18, observa-se que em todas as amostras hidrolisadas havia ácido acético, provindas do processo de pré-tratamento, mas observou-se que as leveduras avaliadas consumiram todo o conteúdo este ácido. Outro aspecto observado na Figura 18A e 18B, é a produção de glicerol que foi maior para *S. pombe* em ambas biomassas pré-tratadas com [C₄mim][OAc], isso pode ter ocasionado o menor rendimento de etanol, pois a formação de glicerol reduz a eficiência na fermentação como demonstrado por Oura (1977) e Brumm & Ebeda (1988).

Para as serragens de *Pinus* sp. e de *Eucalyptus* sp., observa-se, na Figura 17 e 18, que as concentrações de arabinose e xilitol permaneceram constantes durante a fermentação. A concentração de ácido acético diminui, tanto para as leveduras quanto para a bactéria, e a

concentração de glicerol permaneceu nula durante a fermentação com a bactéria *G. thermoglucosidasius*, o que não ocorreu com as leveduras.

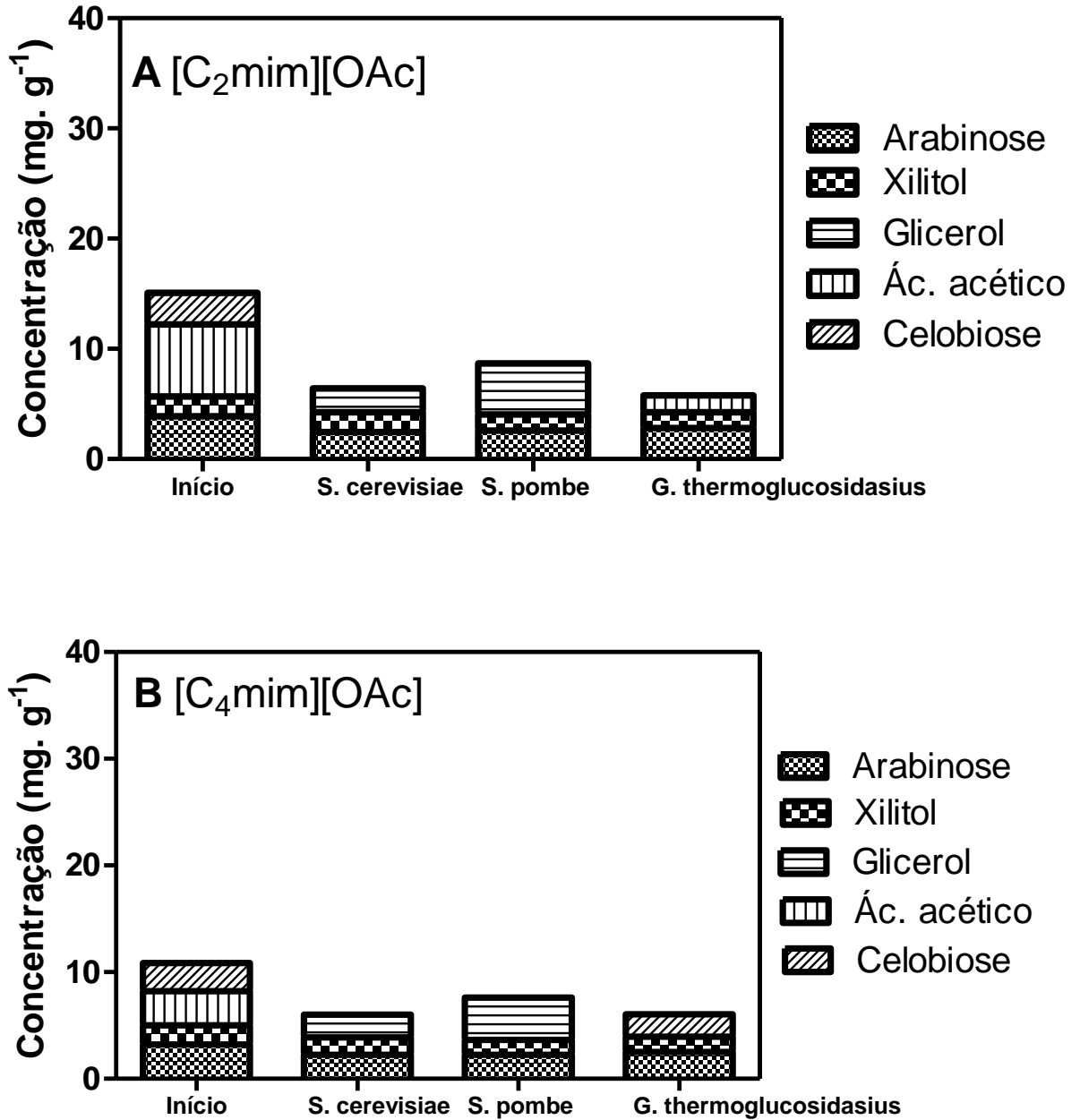


Figura 17. Concentrações de arabinose, xilitol, glicerol, ácido acético e celobiose para a serragem de *Pinus* sp. pré-tratada com os líquidos iônicos [C₂mim][OAc] (A) e [C₄mim][OAc] (B) antes da fermentação (Início - 0 horas) e depois (48 horas) para as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe*, e a bactéria *Geobacillus thermoglucosidasius*.

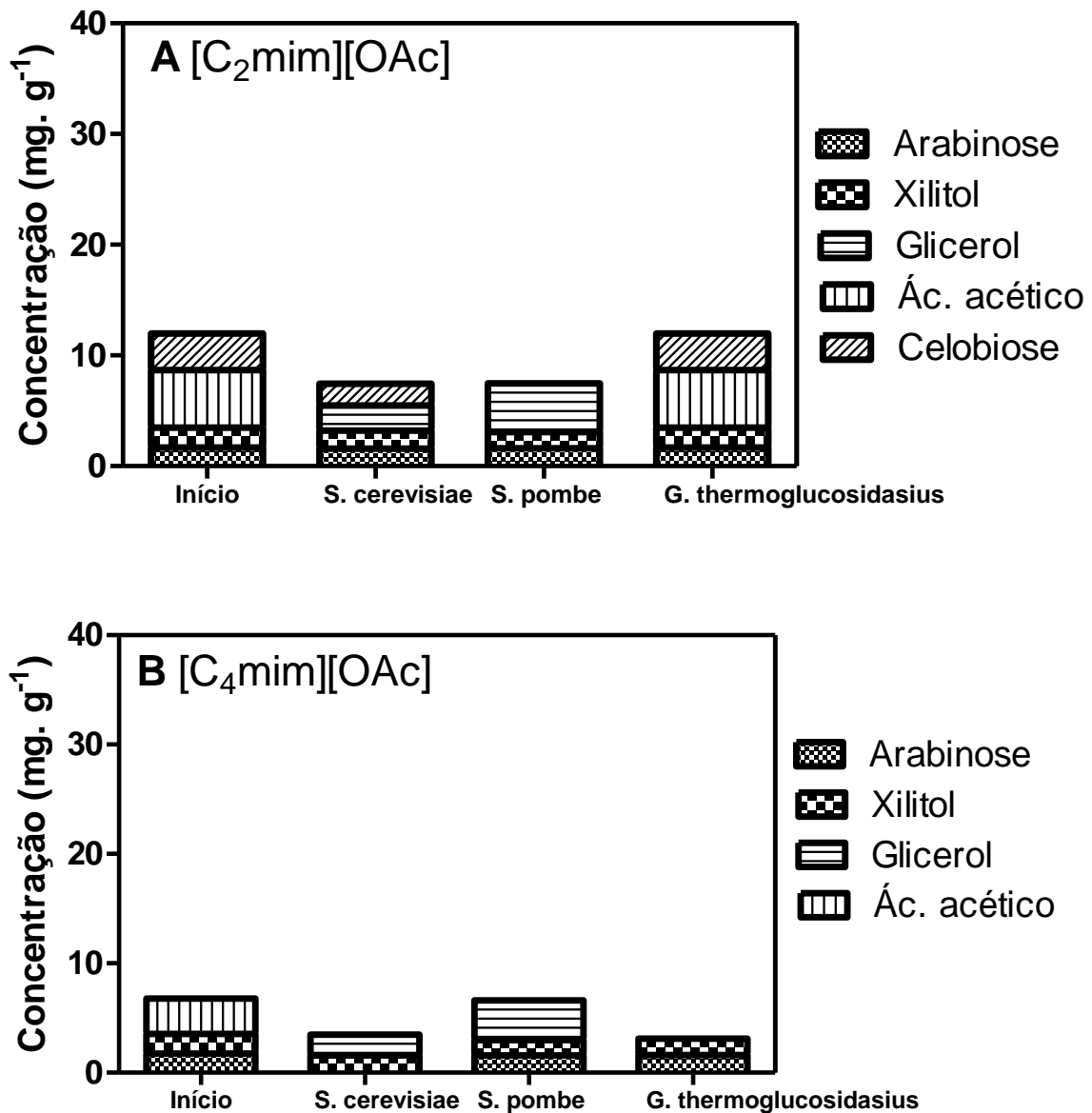


Figura 18. Concentrações de arabinose, xilitol, glicerol, ácido acético e celobiose para a serragem de *Eucalyptus* sp., pré-tratada com os líquidos iônicos [C₂mim][OAc] (A) e [C₄mim][OAc] (B) antes da fermentação (Início - 0 horas) e depois (48 horas) para as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe*, e a bactéria *Geobacillus thermoglucosidasius*.

Os inibidores de fermentação que comumente são formados em processos de pré-tratamento que empregam elevadas temperaturas, 5-hidroximetil-2-furfural (HMF) e furfural, não foram detectados nas amostras deste trabalho. Estes dados são reforçados pelos dados obtido por Shafiei *et al.* (2013) com lascas e pó de madeira pré-tratada com os mesmos líquidos iônicos. Estes autores também não constaram a formação de HMF e furfural.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

- os LIs apresentam compatibilidade e podem ser aplicado para pré-tratamentos de lignocelulósicos, seguido por hidrólise enzimática empregando enzimas de *P. echinulatum*;

- o LI [C₄mim][OAc] apresenta maior potencial para pré-tratamento de capim-elefante, enquanto [C₂mim][OAc] apresenta maior potencial para o pré-tratamento de *Pinus* sp. e *Eucalyptus* sp.;

- os resíduos líquidos iônicos apresentam interferência no metabolismo das leveduras avaliadas ao que se refere à produção de etanol.

- os LIs interferência no metabolismo de *S. cerevisiae* que *S. pombe*, sendo que resíduos de [C₄mim][OAc] apresentam menor interferência na produção de etanol por ambas leveduras avaliadas, quando utilizados os açúcares provenientes de bagaço de cana-de-açúcar e capim-elefante;

- *G. thermoglucosidasius* apresenta potencial para produção de etanol, empregando simultaneamente xilose e glicose.

7 PERSPECTIVAS

- Avaliar o efeito da utilização de *G. thermoglucosidasius* para a conversão de biomassas a açúcares sem a realização de pré-tratamentos;
- Avaliar concentrações maiores de biomassa nos processos de hidrólise enzimática e fermentação;
- Otimizar e escalonar o processos fermentativos empregando os microrganismos utilizados neste trabalho;
- Avaliar o emprego de leveduras utilizadas em usinas de produção de etanol para a fermentação de açúcares provenientes de biomassas pré-tratadas por LIs;
- Empregar leveduras termotolerantes para fermentações e hidrólises enzimáticas simultâneas;
- Reutilizar os líquidos iônicos para novos processos de pré-tratamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADSUL, M. G.; GHULE, J. E.; SINGH, R.; SHAIKH, H.; BASTAWDE, K. B.; GOKHALE, D. V.; VARMA A. J. Polysaccharides from bagasse: applications in cellulase and xylanase production. **Carbohydrate Polymers**, v.57, p. 67-72, 2004.
- AITA, G. A.; SALVI, D. A.; WALKER, M. S. Enzyme hydrolysis and ethanol fermentation of dilute ammonia pretreated energy cane. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 4444–4448, 2011.
- ALVES, E. F.; BOSE, S. K.; FRANCIS, R. C.; COLODETTE, J. L.; IAKOVLEV, M.; HEININGEN, A. V.. Carbohydrate composition of eucalyptus, bagasse and bamboo by a combination of methods. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 1097–1101, 2010.
- ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4851–4861, 2010.
- ANDERSON, J. L.; DING, J.; WELTON, T.; ARMSTRONG, D. W. Characterizing ionic liquids on the basis of multiple solvation interactions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124 (47), p. 14247–14254, 2002.
- ANDRADE, M. F.; COLODETTE, J. L. Dissolving pulp production from sugar cane bagasse. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 58– 64, 2014.
- AYUB, M. A. Z.; ROSA, C. A.; CRUZ, P. B. de S.; SEHNEM, N. T.; HICKERT, L. R.; PEREIRA, F. de C. Conversion of sugars present in rice hull hydrolysates into ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology**, v. 102, nº 5, p. 4218–4225, 2011.
- BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**, v. 52, p. 858–875, 2011.
- BALLONI, Carlos José Vespúcio. **Caracterização física e química da madeira de *pinus elliottii***. 2009.41 f. Trabalho de graduação do Curso Engenharia Industrial Madeireira, Unesp, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Itapeva/SP. Disponível em:<
http://www.if.ufrj.br/biolig/art_citados/Caracteriza%C3%A7%C3%A3o%20f%C3%ADsica%20e%20qu%C3%ADmica%20da%20madeira%20de%20Pinus%20elliottii.pdf>. Acesso em: 28 mar. 2014.
- BARR, C. J.; MERTENS, J. A.; SCHALL, C. A. Critical cellulase and hemicellulase activities for hydrolysis of ionic liquid pretreated biomass. **Bioresource Technology**, v. 104, p. 480–485, 2012.
- BÉGUIN, P.; AUBERT, J. P. The biological degradation of cellulose. **FEMS Microbiology Letters**, v. 13, p.25-58, 1994.
- BHAT, M. K. Research review paper: Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v.18, p. 355-383, 2000.

- BIZZO, W. A.; LENÇO, P. C.; CARVALHO, D. J.; VEIGA, J. P. S. The generation of residual biomass during the production of bio-ethanol from sugar cane, its characterization and its use in energy production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 29, p. 589–603, 2014.
- BNDS, CGEE, FAO, CEPAL – Bioetanol de cana-de-açúcar - Energia para o desenvolvimento sustentável. 2008. Disponível em: <http://www.bioetanoldecana.org/pt/download/resumo_executivo.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2014.
- BODDEY, R.; ALVES, B.; URQUIAGA, S. **Capim-elefante: uma nova fonte alternativa de energia.** 2006. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2006_2/capimelefante/Index.htm>. Acesso em: 12 jun. 2012.
- BRACELPA – Associação Brasileira de Celulose e Papel. (2010). Setor de celulose e papel. Disponível em: <HTTP:// www.bracelpa.org.br>. Acesso em: 12 jun. 2012.
- BRACELPA- Associação Brasileira de Celulose e Papel. (2012). Disponível em: http://www.bracelpa.org.br/bra2/sites/default/files/imprensa/Florestas_plantadas-referencia_mundial.pdf>. Acesso em: 05 mar. 2014.
- BRANDT, A.; HALLETT, J. P.; LEAK, D. J.; MURPHY, R. J.; WELTON, T. The effect of the ionic liquid anion in the pretreatment of pine wood chips. **Green Chemistry**, v. 12, p. 672–679, 2010.
- BRANDT, A.; RAY, M. J.; TO, T. Q.; LEAK, D. J.; MURPHY, R. J.; WELTON, T. A. Ionic liquid pretreatment of lignocellulosic o with ionic liquid–water mixtures. **Green Chemistry**, v. 13 p. 489–2499, 2011.
- CAMASSOLA M.; DILLON A. J. Cellulases and xylanases production by *Penicillium echinulatum* grown on sugar cane bagasse in solid-state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 1889-1900, 2010.
- CAMASSOLA, M. **Produção de celulasas e xilanasas pelo fungo *Penicillium echinulatum* em cultivos submersos e em estado sólido para a hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar, visando à produção de etanol.** 2007. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2007.
- CAMASSOLA, M.; DE BITTENCOURT, L. R.; SHENEM, N. T.; ANDREAUS, J.; DILLON, A. J. P. Characterization of the Cellulase Complex of *Penicillium echinulatum*. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 22, p. 391-396, 2004.
- CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P. Production of cellulases and hemicellulases by *Penicillium echinulatum* grown on pretreated sugar cane bagasse and wheat bran in solid-state fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p 2196-2204, 2007.
- CANTARELLA, M.; CANTARELLA, L.; GALLIFUOCO, A.; ALFANI F. Comparison of different detoxification methods for steam-exploded poplar wood as a substrate for the bioproduction of ethanol in SHF e SSF. **Process Biochemistry**, v. 39, 2004, p. 1533-1542.

- CAO S.; AITA G. M. Enzymatic hydrolysis and ethanol yields of combined surfactant and dilute ammonia treated sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 357-64, 2013.
- CARA, C.; RUIZ, E.; BALLESTEROS, I.; NEGRO, M. J.; CASTRO, E. Enhanced enzymatic hydrolysis of olive tree wood by steam-explosion and alkaline peroxide delignification. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 423–429, 2006.
- CARDONA E.; RIOS J.; PEÑA J.; RIOS L. Effects of the pretreatment method on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentability of the cellulosic fraction from elephant grass. **Fuel**, v. 118, p. 41–47, 2014.
- CASSILHA A. C.; PODLASEK C. L.; CASAGRANDE JUNIOR E. F.; SILVA M. C.; MENGATTO S. N. F. Indústria moveleira e resíduos sólidos: considerações para o equilíbrio ambiental. **Revista Educação & Tecnologia**, v. 8, p. 1-21, 2004.
- CHAGAS, André Luís Squarize. Biocombustíveis- economia de baixo carbono: avaliação de impactos de restrições e perspectivas tecnológicas. Disponível em: <http://www.desenvolvimento.gov.br/arquivos/dwnl_1378391496.pdf>. Acesso em: 11 fev. 2013.
- CHANDRA, R. P.; BURA, R.; MABEE, W. E.; BERLIN, A., PAN, X.; SADDLER, J. N. Substrate pretreatment: the key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics. **Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology**, v. 108, 2007, p. 67-93.
- CHENG, G.; VARANASI, P.; ARORA, R.; STAVILA, V.; SIMMONS, B. A.; KENT, M.S.; SINGH, S. Impact of ionic liquid pretreatment conditions on cellulose crystalline structure using 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate. **The Journal of Physical Chemistry. B** 116 (33), p. 10049–10054, 2012.
- CHENG, Y.; ZHENG, Y.; YU, C. W.; DOOLEY, T. M.; JENKINS, B. M.; VANDERGHEYNST, J. S. Evaluation of high solids alkaline pretreatment of rice straw. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p.1768-1784, 2010.
- CONAB – Compra Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra de cana-de-açúcar/2013/14 – 3º levantamento. Dezembro de 2013. p. 1-15, 2014.
- COUTO, Gabriela Martucci do. **Utilização da serragem de *eucalyptus* sp. na preparação de carvões ativados**. 2009. Dissertação, Programa de Pós-Graduação em ciência e Tecnologia da Madeira, UFLA, Universidade Federal de Lavras, Lavras/MG. Disponível em: <http://bdtd.ufla.br/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=2733>. Acesso em: 28 mar. 2014.
- CRIPPS, R. E.; ELEY, K.; LEAK, D. J.; RUDD, B.; TAYLOR, M.; TODD, M.; BOAKES, S.; MARTIN, S.; ATKINSON, T. Metabolic engineering of *Geobacillus thermoglucosidasius* for high yield ethanol production. **Metabolic Engineering**, v. 11, p. 398-408, 2009.
- CUNHA-PEREIRA, F. da; HICKERT, L. R.; SEHNEM, N. T.; SOUZA-CRUZ, P. B. de; ROSA, C. A.; AYUB, M. A. Z. Conversion of sugars present in rice hull hydrolysates into ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 4218–4225, 2011.
- DADI, A. P.; SCHALL, C. A.; VARANASI, S. Mitigation of cellulose recalcitrance to enzymatic hydrolysis by ionic liquid pretreatment. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 1 – 12, p. 137–140, p. 407–421, 2007.

- DADI, A. P.; VARANASI, S.; SCHALL, C. A. Enhancement of cellulose saccharification kinetics using an ionic liquid pretreatment step. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 95 (5), p. 904–910, 2006.
- DADI, A. P.; VARANASI, S.; SCHALL, C. A. Enhancement of cellulose saccharification kinetics using an ionic liquid pretreatment step. **Biotechnonology and Bioengineering**, v. 95, p. 904-910, 2007.
- DATTA, S.; HOLMES, B.; PARK, J. I.; CHEN, Z.; DIBBLE, D. C.; HADI, M.; BLANCH, H. W.; SIMMONS, B. A.; SAPRA, R. Ionic liquid tolerant hyperthermophilic cellulases for biomass pretreatment and hydrolysis **Green Chemistry**, v. 12, p. 338-345, 2010.
- DIGMAN, M. F.; SHINNERS, K. J.; CASLER, M. D.; BRUCE S. DIEN, B. S.; RONALD D. HATFIELD, R. D.; JUNG, H.-J. G.; MUCK, R. E.; WEIMER, P. J. Optimizing on-farm pretreatment of perennial grasses for fuel ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 5305–5314, 2010.
- DILLON, A. J. P. Cellulases. In.: Enzimas como agentes biotecnológicos. Editado por Said, S.; Pietro, R. C. L. R. **Editora Legis Summa**, p. 243-269, 2004.
- DILLON, A. J. P. et al. Use of 2-deoxyglucose in liquid media for the selection of mutant strains of *Penicillium echinulatum* producing increased cellulase and b-glucosidase activities. **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin, v. 70, p. 740-746, 2006.
- DILLON, A. J.; BETTIO, M.; POZZAN, F. G.; ANDRIGHETTI, T.; CAMASSOLA, M. A new *Penicillium echinulatum* strain with faster cellulase secretion obtained using hydrogen peroxide mutagenesis and screening with 2-deoxyglucose. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, p. 48-53, 2011.
- EGGERT, C.; TEMP, U.; ERIKSSON, K. E. L. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p.1151-1158, 1996.
- ENGEL, P.; MLADENOV, R.; WULFHORST, H.; J'AGER, G.; ANTJE C. Spiess Point by point analysis: how ionic liquid affects the enzymatic hydrolysis of native and modified cellulose. **Green Chemistry**, v. 12, p. 1959–1966, 2010.
- FAN, C.; QI, K.; XIA, X.-X.; ZHONG, J.-J. Efficient ethanol production from corncob residues by repeated fermentation of an adapted yeast. **Bioresource Technology**, v. 136, p. 309–315, 2013.
- FAN, L. T.; LEE, Y.-H.; BEARDMORE, D. H. Mechanism of the enzymatic hydrolysis of cellulose: Effects of major structural features of cellulose on enzymatic hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 22, p. 177-199, 1980.
- FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, p. 613, 1989.
- FERREIRA, V. F.; ROCHA, D. R.; SILVA, F. de C. Potentiality and opportunity in the chemistry of sucrose and other sugars. *Química Nova*, v.32, nº 3, p. 623-638, São Paulo, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000300007>>. Acesso em: 22 fev. 2014.

- FONTOURA, C. F.; BRANDÃO, L. E.; GOMES, L. L. Elephant grass biorefineries: towards a cleaner Brazilian energy matrix. **Journal of Cleaner Production**, p. 1-9, 2014.
- FU D.; MAZZA G.; TAMAKI Y. Lignin extraction from straw by ionic liquids and enzymatic hydrolysis of the cellulosic residues. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58(5), p. 2915–2922, 2010.
- GALDEANO, M. C. **Caracterização e aplicação de casca de aveia modificada por tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino associado à extrusão**. 2001. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2001.
- GÁMEZ, S.; GONZÁLEZ-CABRIALES, J. J.; RAMÍREZ, J.A.; GARROTE, G., VÁZQUEZ, M. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. **Journal of Food Engineering**, v. 74 (1), p. 78-88, 2006.
- GÍRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MARQUES, S.; BOGEL-LUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4775–4800, 2010.
- GOLDEMBERG, J. The Brazilian biofuel industry. **Biotechnology for Biofuels**, p.1-6, 2008.
- GONZALEZ, R.; DAYSTAR, J.; JETT, M.; TREASURE, T.; JAMEEL, H.; VENDITTI, R.; PHILLIPS, R. Economics of cellulosic ethanol production in a thermochemical pathway for softwood, hardwood, corn stover and switchgrass. **Fuel Processing Technology**, v. 94, p. 113–122, 2012.
- GOSHADROU, A.; KARIMI, K.; LEFSRUD, M. Characterization of ionic liquid pretreated aspen wood using semi-quantitative methods for ethanol production. **Carbohydrate Polymers**, v. 96, p. 440– 449, 2013.
- GRAY K. A.; ZHAO, L.; EMPTAGE, M. **Bioethanol**. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 2, p. 141-6, 10 Apr. 2006.
- HAYES, D. J. An examination of biorefining processes, catalysts and challenges. **Catalysis Today**, v. 145, p.138–151, 2009.
- HAYKIR, N. I.; BAHCEGUL, E.; BICAK, N.; BAKIR, U. Pretreatment of cotton stalk with ionic liquids including 2-hydroxy ethyl ammonium formate to enhance biomass digestibility. **Industrial Crops and Products**, v. 41, p. 430– 436, 2013.
- HAYKIR, N. I.; BAKIR, U. Ionic liquid pretreatment allows utilization of high substrate loadings in enzymatic hydrolysis of biomass to produce ethanol from cotton stalks. **Industrial Crops and Products**, v. 51, p. 408– 414, 2013.
- HOLM, J.; LASSI, U. Ionic liquids in the pretreatment of lignocellulosic biomass, in: A. Kokorin (Ed.), **Ionic Liquids: Applications and Perspectives**, InTech, Finland, 2011, p. 551.
- HOWARD, R. L.; ABOTSI, E.; JANSEN VAN RENSBURG E. L.; HOWARD S. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. **African Journal of Biotechnology**, p. 602-619, 2003.

- IEA- International Energy Agency. Sustainable production of second-generation biofuels. 2010. Disponível em: < http://www.iea.org/textbase/npsum/2nd_gen_biofuels.pdf >. Acesso em: 20 jan. 2014.
- IMAI, M. IKARI, K. SUZUKI, I. High-performance hydrolysis of cellulose using mixed cellulase species and ultrasonication pretreatment. **Biochemical Engineering Journal**, v. 17, p. 79-83, 2004.
- JÖRGENSEN, H.; MØRKEBERG, A.; KROGH, K. B.R.; OLSSON, L. Production of cellulases and hemicellulases by three *Penicillium* species: effect of substrate and evaluation of cellulase adsorption by capillary electrophoresis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 42-48, 2005.
- KADAM, K. L.; RYDHOLM, E. C.; McMILLAN, J. D. Development and validation of a kinetic model for enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. **Biotechnology**, v. 20, p. 698-705, 2004.
- KALOGERIS, E.; INIOTAKI, F.; TOPAKAS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J. Performance of an intermittent agitation rotating drum type bioreactor for solid-state fermentation of wheat straw. **Bioresource technology**, v. 86, p. 207-213, 2003.
- KANSOH, A. L.; ESSAM, S. A.; ZEINAT, A. N. Biodegradation and utilization of bagasse with *Trichoderma reesei*. **Polymer Degradation and Stability**, v. 62, p. 273-278, 1999.
- KILPELAINEN, I.; XIE, H.; KING, A.; GRANSTROM, M.; HEIKKINEN, S., ARGYROPOULOS, D. S. Dissolution of wood in ionic liquids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55 (22), p. 9142-9148, 2007.
- KUHAD, R. C.; GUPTA, R.; KHASA, Y. P.; SINGH, A.; ZHANG, Y.-H. P. Bioethanol production from pentose sugars: Current status and future prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, p. 4950-4962, 2011.
- LANGAN, P.; BALAN, V.; GNANAKARAN, S.; DALE, B. E. Restructuring the crystalline cellulose hydrogen bond network enhances its depolymerization rate. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133 (29), p. 11163-11174, 2011.
- LASER M.; SCHULMAN D.; ALLEN S. G.; LICHWA J.; ANTAL J. R. M. J.; LYND L. R. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. **Bioresource Technology**, v. 81, p. 33-44, 2002.
- LAUREANO-PEREZ, L.; TEYMOURI, F.; ALIZADEH, H.; DALE, B. E. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121/124, p. 1081-1099, 2005.
- LEE, S. H.; DOHERTY, T. V.; LINHARDT, R. J.; DORDICK, J. S. Ionic liquid mediated selective extraction of lignin from wood leading to enhanced enzymatic cellulose hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n° 5, p. 1368-1376, 2009.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2000.

- LI, C.; KNIERIM, B.; MANISSERI, C.; ARORA, R.; SCHELLER, H. V.; AUER, M.; VOGEL, K. P.; SIMMONS, B. A.; SINGH, S. Comparison of dilute acid and ionic liquid pretreatment of switchgrass: biomass recalcitrance, delignification and enzymatic saccharification. **Bioresource Technology**, v. 101(13), p. 4900–4906, 2010.
- LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. **Produção de Etanol. Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo, Edgard Blücher, v. 3, 2001.
- LINDER, M.; TEERI, T. T. The Role and Function of Cellulose Binding Domain. **Journal of Biotechnology**. v. 57, p. 15-28, 1997.
- LIU, C.-Z.; WANG, F., W.; STILES, A. R.; GUO, C. Ionic liquids for biofuel production: Opportunities and challenges. **Applied Energy**, v. 92, p. 406–414, 2012.
- LIU, Q. B.; JANSSEN, M. H. A.; VAN RANTWIJK, F.; SHELDON, R. A. Room-temperature ionic liquids that dissolve carbohydrates in high concentrations. **Green Chemistry**, v. 7 (1), p. 39–42, 2005.
- LIU, Z. L.; MA, M.; SONG, M. Evolutionarily engineered ethanologenic yeast detoxifies lignocellulosic biomass conversion inhibitors by reprogrammed pathways. **Molecular Genetics Genomics**, v. 282, p. 233-244, 2009.
- LIU, Z. L.; SLININGER, P. J.; DIEN, B. S.; BERHOW, M. A.; KURTZMAN, C. P.; GORSICH, S. W. Adaptive response of yeasts to furfural and 5-hydroxymethylfurfural and new chemical evidence for HMF conversion to 2,5-bis-hydroxymethylfuran. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 31, p. 345-352, 2004.
- LU, Y.; YANG, B.; GREGG, D.; MANSFIELD, S.; SADDLER, J. Cellulase adsorption and an evaluation of enzyme recycle during hydrolysis of steam-exploded softwood residues. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, V. 98, p. 642-654, 2002.
- LUCAS, M.; WAGNER, G. L.; NISHIYAMA, Y., HANSON, L.; SAMAYAM, I. P.; SCHALL, C. A.; LANGAN, P.; RECTOR, K. D. Reversible swelling of the cell wall of poplar biomass by ionic liquid at room temperature. **Bioresource Technology**, v. 102 (6), p. 4518–4523, 2011.
- MACRELLI, S., MOGENSEN, J., ZACCHI, G. Techno-economic evaluation of 2nd generation bioethanol production from sugar cane bagasse and leaves integrated with the sugar-based ethanol process. **Biotechnol Biofuels**, v. 5, p. 22, 2012.
- MARTÍN, C.; KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B. Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. **Enzyme and microbial technology**, v. 40, p. 426-432, 2007.
- MCINTOSH S.; VANCOV, T.; PALMER, J.; SPAIN, M. Ethanol production from Eucalyptus plantation thinnings. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 264–272, 2012.
- MEDVE, J. **Cellulose hydrolysis by *Trichoderma reesei* cellulases: studies on adsorption, sugar production and synergism of cellobiohydrolase I, II and endoglucanase II**. 1997. 49f. Doutorado em Bioquímica – Department of Biochemistry, Lund University, Lund, Sweden, 1997.

- MENEGOL, D.; SCHOLL, A. L.; FONTANA, R. C.; DILLON, A. J. P.; CAMASSOLA, M. Increased release of fermentable sugars from elephant grass by enzymatic hydrolysis in the presence of surfactants. **Energy Conversion and Management**, 2014.
- MENEGOL, Daiane. **Produção de celulases e xilanases por *penicillium echinulatum* para hidrólise enzimática de capim-elefante (*pennisetum purpureum*, schum.)** 2012. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2012.
- MENON, V.; RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, p. 522-550, 2012.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, p.426-428, 1959.
- MOOD, S. H.; GOLFESHAN, A. H.; TABATABAEI, M.; JOUZANI, G. S.; NAJAFI, G. H.; GHOLAMI, M.; ARDJMAND, M. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 77–93, 2013.
- MORAIS, S. A. L. de; NASCIMENTO, E. A. do; MELO, D. C. de. Chemical analysis of Pinus oocarpa wood part I – quantification of macromolecular components and volatile extractives. **Revista Árvore**, v. 29, nº 3, Viçosa, May/June, 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622005000300014>>. Acesso em:22 fev. 2014.
- MOREIRA, J. R.; PACCA, S. A.; PARENTE, V. The future of oil and bioethanol in Brazil. **Energy Policy**, v. 65, p. 7–15, 2014.
- MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 673-686, 2005.
- MOULTHROP, J. S.; SWATLOSKI, R. P.; MOYNA, G.; ROGERS, R. D. High-resolution C-13 NMR studies of cellulose and cellulose oligomers in ionic liquid solutions. **Chemical Communications**, v. 12, p. 1557–1559, 2005.
- NAIK, S. N.; GOUD, V. V.; ROUT, P. K.; DALAI, A. K. Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 578–597, 2010.
- ODEGA, T. L.; PETRI, T. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, v. 33, nº 7, p. 1549-1558, 2011.
- OUELLET, M.; DATTA, S.; DIBBLE, D. C.; TAMRAKAR, P. R.; BENKE, P. I.; LI, C.; SINGH, S.; SALE, K. L.; ADAMS, P. D.; KEASLING, J. D.; SIMMONS, B. A.; HOLMES, B. M.; MUKHOPADHYAY, A. Impact of ionic liquid pretreated plant biomass on *Saccharomyces cerevisiae* growth and biofuel production. **Green Chemistry**, v. 13, p. 2743–2749, 2011.
- PALONEN, H. Role of lignin in the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **VTT Biotechnology**, p. 62, 1995.

- PALONEN, H.; TJERNELD, F.; ZACCHI, G.; TENKANEN, M. Adsorption of *Trichoderma reesei* CBH I and EG II and their catalytic domains on steam pretreated *softwood* and isolated lignin. **Journal of Biotechnology**, v. 107, p. 65-72, 2004.
- PAN, X.; ZHANG, X. GREGG, D. J.; SADDLER, J. N. Enhanced enzymatic hydrolysis of steam-exploded Douglas fir wood by alkali-oxygen post-treatment. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p. 1103-1114. 2004.
- PEREIRA Jr., N.; COUTO, M. A. P. G.; SANTA ANNA, L. M. M. **Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery**. In Series on Biotechnology, Ed. Amiga Digital UFRJ, Rio de Janeiro, v. 2, p. 45, 2008.
- PERÉZ, J.; MUNÔZ-DOURADO, J.; DE-LA-RUBIA, T.; MARTINEZ, J. Biodegradation and biological treatments off cellulose, hemicellulose and lignin: and overview. **International Microbiology**, v. 5, p. 53-63, 2002.
- PFRUENDER, H.; JONES, R.; WEUSTER-BOTZ D. Water immiscible ionic liquids as solvents for whole cell biocatalysis. **Journal of Biotechnology**, v. 124(1), p. 182-90. 25 jun. 2006.
- 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.
- QIU, Z.; AITA, G. M. Pretreatment of energy cane bagasse with recycled ionic liquid for enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 532 -7, 2013.
- QIU, Z.; AITA, G. M.; WALKER, M. S. Effect of ionic liquid pretreatment on the chemical composition, structure and enzymatic hydrolysis of energy cane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 117p. 251–256, 2012.
- RAMOS, L. P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, v. 26, p. 863-871, 2003.
- REMSING, R. C.; SWATLOSKI, R. P.; ROGERS, R. D.; MOYNA, G. Mechanism of cellulose dissolution in the ionic liquid 1-n-butyl-3-methylimidazolium chloride: a C-13 and Cl-35/37 NMR relaxation study on model systems. **Chemical Communications**, v. 12, p. 1271–1273, 2006.
- RODRIGUES, M.A.; PINTO, P.; BEZERRA, R.M.; DIAS, C.V.M.; CARDOSO, V.M.G. Effect of enzyme extracts isolated from white-rot fungi on chemical composition and in vitro digestibility of wheat straw. **Animal Feed Science and Technology**, v. 141, p. 326-338, 2008.
- ROMANI, A.; GARROTE, G.; BALLESTEROS, I.; BALLESTEROS, M. Second generation bioethanol from steam exploded Eucalyptus globules wood. **Fuel**, v. 111, p. 66–74, 2013.
- SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 30, p. 279-291, 2003.
- SAID, S.; PIETRO, R. **Enzimas de interesse industrial e biotecnológico**. Editora Eventos, p. 35-36, 2002.

- SAMAYAM, I. P.; HANSON, B. L.; LANGAN, P.; SCHALL, C. A. Ionic-liquid induced changes in cellulose structure associated with enhanced biomass hydrolysis. **Biomacromolecules**, v. 12 (8), p. 3091–3098, 2011.
- SAMAYAM, I. P.; SCHALL, C. A. Saccharification of ionic liquid pretreated biomass with commercial enzyme mixtures. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 3561–3566, 2010.
- SÁNCHEZ, O. J.; CORDONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 88, p. 5270-5295, 2008.
- SATHITSUKSANO, N.; ZHU, Z.; ZHANG, P. Y.-H. Cellulose solvent-based pretreatment for corn stover and avicel: concentrated phosphoric acid versus ionic liquid [BMIM]Cl. *Cellulose*, v. 19, p. 1161–1172, 2012.
- SCHALL, C. A.; MERTENS, J. A.; BARR, C. J. Critical cellulase and hemicellulase activities for hydrolysis of ionic liquid pretreated biomass. **Bioresource Technology**, v. 104, p. 480–485, 2012.
- SCHILLING, J.S.; TEWALT, J.P.; DUNCAN, S.M. Synergy between pretreatment lignocellulose modifications and saccharification efficiency in two brown rot fungal systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, p. 465-475, 2009.
- SHAFIEI, M.; ZILOUEI, H.; ZAMANI, A.; TAHERZADEH, M. J.; KARMI, K. Enhancement of ethanol production from spruce wood chips by ionic liquid pretreatment. **Applied Energy**, v.102, p. 163–169, 2013.
- SHILL, K.; PADMANABHAN, S.; XIN, Q.; PRAUSNITZ, J. M.; CLARK, D. S.; BLANCH, H. W. Ionic liquid pretreatment of cellulosic biomass: enzymatic hydrolysis and ionic liquid recycle. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, p. 511–520, 2011.
- SILVA, Neumara Luci Conceição. **Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose**. 2010. 109 f. Dissertação (Mestrado em ciências) - Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, UFRJ, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- SILVA, S. A. da; LEE, S.-H.; ENDO, T.; BON, E. P. S. Major improvement in the rate and yield of enzymatic saccharification of sugarcane bagasse via pretreatment with the ionic liquid 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate ([Emim][Ac]). **Bioresource Technology**, v. 102, p. 10505–10509, 2011.
- SILVA, S. M. **Otimização das condições de cultivo sólido de *Pleurotus sajor-caju* em meio constituído de serragem de *Pinus* sp.** 2004. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2004.
- SOUZA, W. R. de ; GOUVEA, P. F. de; SAVOLDI, M.; MALAVAZI, I.; BERNARDES, L. A. de S.; GOLDMAN, M. H. S.; VRIES, R. P. de; OLIVEIRA, J. V. de C.; GOLDMAN, G. H. Transcriptome analysis of *Aspergillus niger* grown on sugar cane bagasse. **Biotechnology for Biofuels**, 4:40, 2011.
- SOUZA, W. R. Microbial Degradation of Lignocellulosic Biomass. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5772/54325>>. Acesso em: 30 abr. 2014.

- STOLTE, S.; MATZKE, M.; ARNING, J.; BOSCHEN, A.; PITNER, W.-R.; WELZBIERMANN, U.; JASTORFF, B.; J. RANKE, J. Effects of different head groups and functionalised side chains on the aquatic toxicity of ionic liquids. **Green Chemistry**, v. 9, p. 1170-1179, 2007.
- SUN, R.; WANG, K, JIANG, J.; XU, F. Influence of steaming explosion time on the physical-chemical properties of cellulose from *Lespedeza stalks* (*lespedera crytobotrya*). **Bioresource Technology**. v. 100, p. 5288-5294, 2009.
- SUN, S.-N.; LI, M.-F.; YUAN, T.-Q.; XU, F.; SUN, R.-C. Effect of ionic liquid/organic solvent pretreatment on the enzymatic hydrolysis of corncob for bioethanol production. Part 1: Structural characterization of the lignins. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 570– 577, 2013.
- SWATLOSKI, R. P.; SPEAR, S. K.; HOLBREY, J. D.; ROGERS, R. D. Dissolution of cellose with ionic liquids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124 (18), p. 4974–4975, 2002.
- SZENGYEL, Z. **Ethanol from wood cellulase enzyme production**. 2000. PhD Tesis. Lund University, Sweden, p. 54, 2000.
- TALEBNIA, F.; KARAKASHEV, D.; ANGELIDAKI, I. Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4744–4753, 2010.
- TAN, T. H.; LEE, K. T. Understanding the impact of ionic liquid pretreatment on biomass and enzymatic hydrolysis. **Chemical. Engineering Journal**, v. 183, p. 448– 458, 2012.
- UJU; SHODA Y.; NAKAMOTO, A.; GOTO, M.; TOKUHARA, W.; NORITAKE, Y.; KATAHIR, S.; ISHIDA, N.; NAKASHIMA, K.; OGINO, C.; KAMIYA, N. Short time ionic liquids pretreatment on lignocellulosic biomass to enhance enzymatic saccharification. **Bioresource Technology**. v. 103, p. 446–452, 2012.
- VAN MARIS, A. J.; ABBOTT, D. A.; BELLISSIMI, E.; VAN DEN BRINK, J.; KUYPER, M.; LUTTIK, M. A.; WISSELINK, H. W.; SCHEFFERS, W. A.; VAN DIJKEN, J. P.; PRONK, J. T. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 90, p. 391-418, 2006.
- WADA, M.; IKE, M.; TOKUYASU, K. Enzymatic hydrolysis of cellulose I is greatly accelerated via its conversion to the cellulose II hydrate form. **Polymer Degradation Stability**, v. 95 (4), p. 543–548, 2010.
- WADSKOG, I.; ADLER, L. 2003. Ion homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae* under NaCl stress, p. 201-239, in S. Hohmann and P.W.H. Mager, (Eds.). *Yeast Stress Responses*. Topics in Current Genetics, v. 1. Spriner-Verlag, Berlin Heidelberg.
- WEERACHANCHAI P.; LEONG S. S.; CHANG M. W.; CHING C. B.; LEE J. M. Improvement of biomass properties by pretreatment with ionic liquids for bioconversion process. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 453-9, 2012.
- WEERACHANCHAI, P. & A LEE, J.- M. Effect of Organic Solvent in Ionic Liquid on Biomass Pretreatment. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 1, p. 894–902, 2013.

- WEERACHANCHAI, P.; LEE, J.-M. Effect of Organic Solvent in Ionic Liquid on Biomass Pretreatment. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 1, p. 894–902, 2013.
- WEINGARTNER, H. Understanding ionic liquids at the molecular level: facts, problems, and controversies. **Angewandte Chemie-International Edition In English**, v. 47 (4), p. 654–670, 2008.
- WELTON, T.; MURPHY, R. J.; LAEK, D. J.; TO, T. Q.; RAY, M. J.; BRANDT, A. The effect of the ionic liquid anion in the pretreatment of pine wood chips. **Green Chemistry**, v. 12, p. 672–679, 2009.
- WELTON, T.; MURPHY, R. J.; LAEK, D. J.; TO, T. Q.; RAY, M. J.; BRANDT, A. Ionic liquid pretreatment of lignocellulosic biomass with ionic liquid–water mixtures. **Green Chemistry**, v. 13 p. 489–2499, 2011.
- WILSON, B. D. Microbial diversity of cellulose hydrolysis. **Current opinion in Microbiology**, v. 4, p. 259-263, 2011.
- WU, L., LEE; S.-H., ENDO, T. Effect of dimethyl sulfoxide on ionic liquid 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate pretreatment of eucalyptus wood for enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 140, p. 90–96, 2013
- XU, J.; WANG, Z.; CHENG, J. J. Bermuda grass as feedstock for biofuel production: A review. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 7613–7620, 2011.
- YAMASHITA, Y.; SASAKI, C.; NAKAMURA, Y. Effective enzyme saccharification and ethanol production from Japanese cedar using various pretreatment methods. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 110, n^o. 1, p. 79–86, 2010.
- YOON, L. W.; NGOH, G. C.; MAY CHUA, A. S.; HASHIM, M. A. Comparison of ionic liquid, acid and alkali pretreatments for sugarcane bagasse enzymatic saccharification. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 86, p.1342–1348, 2011.
- ZAVREL M, BROSS D, FUNKE M, BUCHS J, SPIESS AC. High-throughput screening for ionic liquids dissolving (ligno-) cellulose. **Bioresource Technology**, v. 100(9), p. 2580–2587, 2009.
- ZHANG, H.; WU, J.; ZHANG, J.; HE, J. S. 1-Allyl-3-methylimidazolium chloride room temperature ionic liquid: A new and powerful nonderivatizing solvent for cellulose. **Macromolecules**, v. 38 (20), p. 8272–8277, 2005.
- ZHANG, J.; WANG, Y.; ZHANG, L.; ZHANG, R.; LIU, G.; CHENG, G. Understanding changes in cellulose crystalline structure of lignocellulosic biomass during ionic liquid pretreatment by XRD. **Bioresource Technology**, v. 151, p. 402–405, 2014.
- ZHAO M, DAI C-C, GUAN X-Y, TAO J. Genome shuffling amplifies the carbon source spectrum and improves arachidonic acid production in *Diasporangium* sp. **Enzyme Microbial Technology**, v. 45, p. 419-25, 2009.
- ZHENG, Y.; PAN, Z.; ZHANG, R. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol

production. **International Journal of Agricultural and Biological Engineering**, v. 2, p. 51 – 68, 2009.