

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
ÁREA DO CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Estratégias de pré-tratamento para fracionamento e recuperação dos
componentes majoritários de biomassas lignocelulósicas para uso em
biorrefinarias

Andréia Toscan

Caxias do Sul, 2018.

ANDRÉIA TOSCAN

Estratégias de pré-tratamento para fracionamento e recuperação dos
componentes majoritários de biomassas lignocelulósicas para uso em
biorrefinarias

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da
Universidade de Caxias do Sul, visando a obtenção de grau de Doutora em
Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon

Coorientadores: Profa. Dra. Marli Camassola e Prof. Dr. Jürgen Andreaus

Caxias do Sul, 2018.

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

T713e Toscan, Andréia

Estratégias de pré-tratamento para fracionamento e recuperação dos componentes majoritários de biomassas lignocelulósicas para uso em biorrefinarias / Andréia Toscan. – 2018.

iv, 168 f. : il. ; 30 cm

Tese (Doutorado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2018.

Orientação: Aldo José Pinheiro Dillon.

Coorientação: Marli Camassola, Jürgen Andreas.

1. Biocombustíveis. 2. Biomassa. 3. Capim-elefante. I. Dillon, Aldo José Pinheiro, orient. II. Camassola, Marli, coorient. III. Andreas, Jürgen, coorient. IV. Título.

CDU 2. ed.: 620.91

Catálogo na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)
Paula Fernanda Fedatto Leal - CRB 10/2291

ANDRÉIA TOSCAN

Estratégias de pré-tratamento para fracionamento e recuperação dos
componentes majoritários de biomassas lignocelulósicas para uso em
biorrefinarias

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da
Universidade de Caxias do Sul, visando a obtenção de grau de Doutora em
Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon

Coorientadores: Profa. Dra. Marli Camassola e Prof. Dr. Jürgen Andreas

TESE APROVADA EM 14 DE SETEMBRO DE 2018.

Orientador: Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon

Coorientadora: Profa. Dra. Marli Camassola

Coorientador: Prof. Dr. Jürgen Andreas

Prof. Dr. Marcos Silveira Buckeridge

Prof. Dr. Henrique Macedo Baudel

Prof. Dr. Thiago Barcellos da Silva

Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
A presença distante das estrelas!
Mario Quintana

Dedico este trabalho a minha família
por todo apoio, compreensão e amor
incondicionais.

AGRADECIMENTOS

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

- a Deus, por iluminar meu caminho e me dar forças para enfrentar os desafios da vida;
- ao meu orientador, Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon, e aos meus coorientadores, Profa. Dra. Marli Camassola e Prof. Dr. Jürgen Andreaus, pela oportunidade, pela atenção dispensada, pelo conhecimento compartilhado e pela confiança depositada no meu trabalho;
- ao Dr. Rafal Marcin Lukasik, pela oportunidade, pelos ensinamentos e pelas contribuições para a realização deste trabalho;
- aos professores da banca de acompanhamento, Prof. Dr. Maurício Moura da Silveira e Prof. Dr. Thiago Barcellos da Silva, e aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Marcos Silveira Buckeridge e Dr. Henrique Macedo Baudel, pela disponibilidade e colaborações;
- aos professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e a todos os funcionários do Instituto de Biotecnologia, em especial a Lucimara Serafini Rech;
- aos colegas e amigos do Laboratório de Enzimas e Biomassas, pela agradável convivência e pelo apoio, em especial a Dra. Roselei Claudete Fontana pelo auxílio em laboratório e pelas contribuições para o andamento deste trabalho e a Dra. Sheila Montipó pela amizade, contribuições e produtivas conversas sobre nossos trabalhos;
- ao Laboratório Nacional de Energia e Geologia de Portugal, pelo acolhimento, assistência e ensinamentos;
- ao Departamento de Química da Universidade Regional de Blumenau pela receptividade e contribuições;
- ao apoio estrutural e financeiro da UCS e da CAPES, principalmente pela concessão das bolsas de doutorado e de doutorado-sanduíche pela CAPES;
- a toda minha família, em especial a minha mãe Inês e a minha irmã Jéssica, por acreditarem na minha capacidade, me darem forças para superar os momentos difíceis e me amarem incondicionalmente, e ao Jean, por me apoiar e compreender em todos os momentos;
- a todos os amigos de longa data que me apoiaram em mais esta etapa da vida, a todos novos amigos que conquistei nesse período e que fico feliz em poder dizer que foram muitos, por isso não arriscarei nominá-los para não esquecer de ninguém, e principalmente, entre todos esses, aos amigos que foram o abraço que meu deus força nos momentos mais delicados.

A todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, minha mais sincera e eterna gratidão.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----|
| LISTA DE FIGURAS | i |
| RESUMO | iii |
| ABSTRACT | iv |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 7 |
| 2.1 A biomassa lignocelulósica e seus constituintes | 7 |
| 2.1.1 Constituintes da biomassa lignocelulósica..... | 8 |
| 2.1.1.1 Celulose..... | 10 |
| 2.1.1.2 Hemiceluloses..... | 14 |
| 2.1.1.3 Lignina | 17 |
| 2.1.2 As diferentes variedades de biomassa lignocelulósica | 19 |
| 2.1.2.1 Capim-elefante..... | 23 |
| 2.2 Processamento da biomassa lignocelulósica..... | 24 |
| 2.2.1 Pré-tratamento | 25 |
| 2.2.1.1 Pré-tratamentos químicos utilizando solventes sustentáveis..... | 30 |
| 2.2.1.2 Pré-tratamentos hidrotérmicos e a utilização de CO ₂ supercrítico como catalisador | 34 |
| 2.2.2 Hidrólise enzimática | 38 |
| 2.3 Biorrefinarias | 43 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS..... | 50 |

| | |
|--|-----|
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 54 |
| 4.1 Artigo 1: High-pressure carbon dioxide/water pre-treatment of sugarcane bagasse and elephant grass: assessment of the effect of biomass composition on process efficiency..... | 55 |
| 4.2 Artigo 2: Effective extraction of lignin from elephant grass using imidazole and its effect on enzymatic saccharification to produce fermentable sugars | 84 |
| 4.3 Artigo 3: New proposal of two-stage pretreatment for the fractionation of lignocellulosic components using hydrothermal pretreatment followed by imidazole delignification | 109 |
| 4.4 Discussão geral | 142 |
| 5. CONCLUSÕES | 148 |
| 6. PERSPECTIVAS | 151 |
| 7. REFERÊNCIAS..... | 152 |
| ANEXO I..... | 161 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Representação da estrutura da biomassa lignocelulósica (adaptado de Santos <i>et al.</i> , 2012). | 9 |
| Figura 2. Estrutura da glicose, celobiose e celulose (extraído de Suhas <i>et al.</i> , 2016). | 11 |
| Figura 3. Ligações de hidrogênio inter e intramoleculares da celulose (extraído de Santos <i>et al.</i> , 2012). | 13 |
| Figura 4. Formação de 5-HMF e dos ácidos levulínico e fórmico (adaptado de Rasmussen <i>et al.</i> , 2014). | 14 |
| Figura 5. Estrutura da glucuronoarabinoxilana (extraído de Buckeridge & de Souza, 2014). | 15 |
| Figura 6. Formação do furfural a partir da xilose (adaptado de Marabezi, 2009)..... | 17 |
| Figura 7. Álcoois precursores da lignina (adaptado de Isikgor & Becer, 2015). | 18 |
| Figura 8. Fórmula estrutural do imidazol (Domanska <i>et al.</i> , 2002)..... | 34 |
| Figura 9. Aplicações dos xilo-oligossacarídeos (adaptada de Vázquez <i>et al.</i> , 2000). | 46 |
| Figura 10. Intermediários químicos que podem ser obtidos a partir do ácido levulínico (extraída de Rodrigues, 2011). | 47 |
| Figura 11. Exemplos de produtos que podem ser obtidos a partir da lignina (adaptado de De Bhowmick <i>et al.</i> , 2017; de Jong <i>et al.</i> , 2012; Holladay <i>et al.</i> , 2007; Schuchardt <i>et al.</i> , 2001) | 49 |
| Figura 12. Fluxograma experimental do pré-tratamento de alta pressão utilizando H ₂ O e CO ₂ e da caracterização dos produtos | 51 |
| Figura 13. Fluxograma experimental do pré-tratamento com imidazol e da caracterização dos produtos..... | 52 |
| Figura 14. Fluxograma da caracterização básica da composição das biomassas com e sem pré-tratamentos realizada em todas as amostras sólidas. | 53 |

| | |
|--|-----|
| Figura 15. Fluxograma experimental elaborado para realização e análise do pré-tratamento em dois estágios proposto. | 146 |
|--|-----|

RESUMO

A utilização de biomassas lignocelulósicas representa uma oportunidade para a implementação sustentável de biorrefinarias capazes de gerar biocombustíveis, energia e um amplo leque de produtos com alto valor comercial. Além de serem fundamentais para a utilização de qualquer biomassa lignocelulósica, os pré-tratamentos são a principal etapa de processamento para que esta matéria-prima seja adequada e eficientemente fracionada para possibilitar a obtenção de mais de um produto. Este estudo teve por objetivo avaliar diferentes estratégias de pré-tratamento quanto à capacidade de fracionar biomassas lignocelulósicas para a obtenção de frações mais puras dos principais componentes lignocelulósicos, focando principalmente na alta recuperação e seletividade de mono e oligossacarídeos. O capim-elefante foi utilizado como matéria-prima base devido, entre outras características, à sua alta produtividade e sua adaptabilidade favorável para o cultivo em diversas condições de clima e solo, sendo uma cultura energética alternativa no cenário regional e nacional, além de apresentar similaridade com outras gramíneas avaliadas como cultura energética nos Estados Unidos e na Europa, o que permitiria a transposição tecnológica. Neste trabalho foram avaliados os pré-tratamentos de alta pressão utilizando H₂O e CO₂, em condições supercríticas para o CO₂, variando as condições operacionais que foram representadas pelo fator de severidade combinado (CS_{pCO₂}). A avaliação em paralelo das biomassas de capim-elefante e bagaço de cana-de-açúcar permitiu observar o impacto significativo na eficiência desse tipo de pré-tratamento causado pelas características intrínsecas de cada biomassa. Os pré-tratamentos de alta pressão utilizando H₂O e CO₂ foram capazes de fracionar as hemiceluloses das biomassas recuperando principalmente xilose e arabinose na forma de mono e oligossacarídeos em uma fração líquida resultante. A utilização de imidazol como solvente de pré-tratamento também foi avaliada e mostrou ser uma tecnologia eficiente para a deslignificação da biomassa lignocelulósica e a obtenção de uma fração sólida com elevada concentração de polissacarídeos e alta digestibilidade enzimática. Um adequado planejamento experimental permitiu otimizar as condições de tempo e temperatura para maximizar a deslignificação no pré-tratamento do capim-elefante ao se utilizar uma razão imidazol/biomassa de 9 g.g⁻¹. A condição otimizada calculada prediz que em temperatura de 140 °C para o tempo de residência de 313,2 min uma deslignificação máxima de 85,7% é obtida, o que representa apenas 4% de deslignificação a mais que a observada em condições mais amenas testadas. Por fim, foi proposta uma nova combinação de pré-tratamento em dois estágios para o fracionamento completo da biomassa. O pré-tratamento hidrotérmico foi realizado como primeiro estágio objetivando a separação das hemiceluloses e a obtenção de uma fração líquida rica nos seus açúcares constituintes. Já a deslignificação com imidazol foi proposta como segundo estágio para a obtenção de um sólido enriquecido em celulose e de alta digestibilidade. O melhor conjunto de condições avaliado permitiu obter aproximadamente 30 kg de glicose, 7,5 kg de xilose e 1,3 kg de arabinose, separados em duas frações na forma de mono e oligossacarídeos, totalizando aproximadamente 39 kg de açúcares recuperados a cada 100 kg de capim-elefante processado.

Palavras-chave: capim-elefante, CO₂ supercrítico, imidazol, pré-tratamento hidrotérmico, oligossacarídeos.

ABSTRACT

The use of lignocellulosic biomass represents an opportunity for the sustainable implementation of biorefineries capable of generating biofuels, energy and a wide range of products with high commercial value. In addition to being fundamental to the use of any lignocellulosic biomass, pretreatments are the main processing step for this raw material to be properly and efficiently fractionated to allow the obtaining of more than one product. The objective of this study was to evaluate different pretreatment strategies for the ability to fractionate lignocellulosic biomasses to obtain purer fractions of the main lignocellulosic components, focusing mainly on the high recovery and selectivity of mono- and oligosaccharides. Elephant grass was used as a base raw material due, among other characteristics, to its high productivity and favorable adaptability for cultivation in diverse climatic and soil conditions, being an alternative energy culture in the regional and national scenario, besides presenting similarity to other grasses evaluated as energy crops in the United States and Europe, which would allow technological transposition. In this work, high pressure CO₂/H₂O pretreatments were evaluated, under supercritical conditions for CO₂, varying the operating conditions that were represented by the combined severity factor (CS_{pCO₂}). Parallel evaluation of the effects of high pressure CO₂/H₂O pretreatments on elephant grass and sugarcane bagasse allowed observe a significant impact on the efficiency of pretreatments caused by the intrinsic characteristics of each biomass. The high pressure CO₂/H₂O pretreatments were able to fractionate the hemicelluloses of the biomasses mainly recovering xylose and arabinose as mono- and oligosaccharides in a resulting liquid fraction. The use of imidazole as solvent for pretreatment presented high potential for the delignification of the biomass and the obtaining of a solid fraction with high concentration of polysaccharides and high enzymatic digestibility. An adequate experimental design allowed to optimize the time and temperature conditions to maximize delignification in the pretreatment of elephant grass when using an imidazole/biomass ratio of 9 g.g⁻¹. The calculated optimized condition predicts that at a temperature of 140 °C for the residence time of 313.2 min a maximum delignification of 85.7% is obtained, which represents an increase of only 4% in delignification than that observed for the milder conditions tested. Finally, a new combination of two-stage pretreatment was proposed for the complete fractionation of the biomass. The hydrothermal pretreatment was carried out as a first stage aiming at the separation of hemicelluloses and obtaining a rich liquid fraction in its constituent sugars. The delignification with imidazole was proposed as a second stage to obtain a solid enriched in cellulose with high digestibility. The best set of conditions allowed to obtain approximately 30 kg of glucose, 7.5 kg of xylose and 1.3 kg of arabinose, separated into two fractions in the form of mono- and oligosaccharides, totaling approximately 39 kg of sugars recovered per 100 kg of elephant grass processed.

Keywords: elephant grass, supercritical CO₂, imidazole, hydrothermal pretreatment, oligosaccharides.

1. INTRODUÇÃO

A crescente industrialização aliada à evolução dos meios de transporte, com a popularização dos automóveis no início do século XX seguida pelo surgimento da aviação comercial, conduziu a sociedade a uma elevada demanda energética suprida principalmente pela transformação da energia armazenada em fontes fósseis. Porém, com o modelo de desenvolvimento econômico baseado na dependência do petróleo, a década de 1970 fez os países de todo o planeta despertarem para a importância da autossuficiência energética. Esta década foi marcada pela formação de cartéis com o aumento do preço do barril de petróleo pelos países do Oriente Médio que até hoje são os principais exportadores de petróleo do mundo, possuindo atualmente em sua região mais de 47% das reservas de petróleo comprovadas no planeta (BP, 2018). Neste cenário, o etanol surgiu como um combustível líquido promissor, sendo que no Brasil, onde se vivenciou simultaneamente um colapso dos preços do açúcar no mercado mundial, ocorreu o incentivo à utilização do excedente de cana-de-açúcar para a produção de etanol pelo Programa Nacional do Álcool, o Proálcool.

Dados recentes mostram que mais 13.000 Mtoe (*million tonnes of oil equivalent* – unidade que relaciona a energia proveniente de cada produto com a energia proveniente do petróleo) de fontes primárias de energia foram consumidas por ano em todo o mundo, nos anos de 2015, 2016 e 2017 (BP, 2017; BP, 2018; IEA, 2017). Do consumo de 2017, mais de 4.600 Mtoe foi de petróleo, seguido por carvão e gás natural, representando pouco mais de 3.700 Mtoe e 3.100 Mtoe, respectivamente, e apenas aproximadamente 480 Mtoe de energias renováveis (BP, 2018). Mais de 64% do total de produtos de petróleo são consumidos para o abastecimento dos meios de transporte, sendo que apenas os transportes rodoviários absorvem quase 50% do total (IEA, 2017). Estados Unidos e Brasil lideram a produção mundial de biocombustíveis, tendo como principal produto o etanol obtido a partir do milho e da cana-de-

açúcar, respectivamente. No ano de 2017 a produção de etanol pelos Estados Unidos (EUA) foi de 15,80 bilhões de galões, representando 58% da produção mundial, enquanto que no Brasil a produção foi de 7,06 bilhões de galões de etanol, cerca de 26% da produção mundial (RFA, 2018).

No aspecto ambiental, observa-se que a utilização de combustíveis fósseis tem provocado um excessivo acúmulo de carbono na atmosfera, absorvendo maior radiação e provocando um acúmulo de calor na terra, ou seja, intensificando o efeito estufa e provocando, conseqüentemente, o aquecimento global. Perspectivas ambientais, publicadas pela OECD (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico) em 2011, preveem que sem a implementação de políticas mais efetivas as emissões de gases do efeito estufa deverão aumentar em 50% até 2050, impulsionadas principalmente por um aumento projetado em 70% nas emissões de CO₂ (Marchal *et al.*, 2011).

Para sanar a necessidade energética e de autossuficiência das nações, e simultaneamente reduzir os problemas ambientais relacionados às emissões de poluentes, a alternativa encontrada é a utilização de fontes renováveis para a produção de energia e combustíveis. O etanol produzido pelo Brasil e os EUA já é uma realidade em utilização de uma fonte vegetal renovável para a produção de um combustível líquido. Porém, a utilização do milho nos EUA gera uma concorrência entre a produção de combustível e sua destinação para a alimentação, gerando questionamentos sociais sobre a prática. No Brasil, a utilização da cana-de-açúcar gera resíduos de bagaço e palha, hoje amplamente aproveitados para geração de energia elétrica, mas que, como um dos principais resíduos agroindustriais do País, servem como base para os estudos da produção de etanol de segunda geração (etanol celulósico).

A biomassa lignocelulósica é um material barato e amplamente disponível encontrado em resíduos como os agroindustriais, árvores coníferas e folhosas, gramíneas e

uma grande diversidade de culturas. Os materiais lignocelulósicos podem ser cultivados em terras desfavoráveis para a agricultura, com limitações de nutrientes e água, sem competir com a agricultura para a alimentação. A biomassa lignocelulósica é o recurso biológico renovável mais abundante do planeta e armazena energia principalmente na forma de carboidratos, tendo como principais constituintes a celulose, as hemiceluloses e a lignina. A celulose é um polímero composto exclusivamente por unidades de glicose enquanto que as hemiceluloses, apesar de também serem polímeros compostos principalmente por carboidratos, apresentam uma composição variada de pentoses, hexoses e ácidos urônicos conforme a espécie da biomassa. A lignina por sua vez é uma macromolécula complexa, caracterizada pela presença de anéis polifenólicos, que envolvem as estruturas sacarídicas, protegendo e dando rigidez à estrutura lignocelulósica.

Entre as culturas energéticas cultivadas especificamente para conversão em energia e biocombustíveis, as gramíneas vêm sendo bastante estudadas como fonte de biomassa lignocelulósica. Particularmente no Brasil, a gramínea em foco é o capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) pelo fato de se encontrar bem adaptada a todas as regiões do País, sob as diferentes condições nutricionais do solo e as diferenças climáticas, apresentando-se como uma alternativa energética para regiões não propícias para a produção de cana-de-açúcar. Outra vantagem desta planta é o seu rápido desenvolvimento, que possibilita que esta cultura seja utilizada entre o período de safras agrícolas de outras culturas. Além disso, diversos estudos publicados por países da América do Norte e da Europa utilizam gramíneas semelhantes a esta, o que facilitaria a transposição tecnológica.

Sendo a biomassa lignocelulósica composta por cerca de 55-75% de carboidratos (em base seca) (Sindhu *et al.*, 2016), busca-se converter esses constituintes em combustíveis e produtos comerciais, principalmente por processos fermentativos. Porém, as três frações majoritárias encontram-se fortemente ligadas, sendo que a lignina atua unindo a estrutura e

formando uma resistente barreira que dificulta a ação de enzimas e microrganismos. A celulose e as hemiceluloses também possuem ligações químicas que precisam ser quebradas para uma conversão adequada. Além disso, celulose e hemiceluloses se encontram na forma polimérica e precisam ser hidrolisadas para a liberação de açúcares fermentescíveis. Para que estas transformações ocorram pelo menos dois processos precisam ser realizados antes da fermentação, o pré-tratamento e a hidrólise enzimática. Tratamentos utilizando ácidos podem ser utilizados como etapa única para desestruturação e hidrólise dos lignocelulósicos, porém promovem problemas de corrosão dos equipamentos, degradação dos açúcares e apresentam diversas desvantagens do ponto de vista ambiental.

O pré-tratamento consiste na utilização de pelo menos um processo, de mecanismo químico, físico, biológico ou uma combinação destes, capaz de desestruturar a matriz lignocelulósica rompendo as barreiras que dificultam a hidrólise enzimática desses materiais. Entre as diferentes metodologias estudadas, os pré-tratamentos hidrotérmicos, com ou sem adição de catalisadores, se destacam por já serem utilizados para produção comercial de etanol em empresas como a Inbicon, Dinamarca. Esses pré-tratamentos utilizam a água como reagente para promover a desestruturação da biomassa lignocelulósica. Em altas temperaturas e pressões, a água assume um caráter ácido, ajudando a promover a quebra das ligações existentes na microfibrila lignocelulósica e dissolvendo as hemiceluloses. Além disso, o pré-tratamento hidrotérmico tem a vantagem de gerar pouco ou nenhum composto que possa vir a inibir as etapas seguintes do processo de produção de etanol. Uma grande variedade de solventes vem sendo avaliada como uma possibilidade ambiental e economicamente sustentável para desestruturar e fracionar a biomassa lignocelulósica. Entre estes, destacam-se os solventes orgânicos, como o próprio etanol e o metanol, e os líquidos iônicos que, apesar de possibilitarem o fracionamento seletivo da biomassa lignocelulósica, têm custo elevado. Até onde se tem conhecimento, no ano de 2016 foi publicado o primeiro trabalho propondo a

utilização exitosa de imidazol como solvente para fracionamento e deslignificação da biomassa lignocelulósica. Antes disso, o imidazol já havia sido proposto como solvente para dissolução de amido e é utilizado como um dos principais precursores dos líquidos iônicos.

Apesar de já existirem tecnologias de pré-tratamento capazes de converter os constituintes da biomassa lignocelulósica para produção comercial de biocombustível como o etanol, ainda é preciso avanços tecnológico para tornar essa prática viável economicamente. Neste sentido, uma das principais linhas de pesquisa que tem emergido nos últimos anos é a implementação de biorrefinarias onde ocorra a associação e a integração de processos capazes de converter cada fração da biomassa lignocelulósica em diferentes produtos que apresentem valor comercial, a exemplo do que ocorre atualmente no processamento do petróleo. Assim, menos energia é consumida para a obtenção de um produto, desde que, ao mesmo tempo, muitos produtos sejam produzidos, favorecendo o balanço econômico do processo e minimizando ao máximo o acúmulo de resíduos. O etanol, por exemplo, além de sua utilização tradicional como combustível, e entre outras possibilidades de utilização, já vem sendo empregado também como matéria-prima para a produção de polímeros, que antes eram produzidos a partir de compostos obtidos no processo de craqueamento do petróleo. A desidratação do etanol leva a produção de etileno, que possui um mercado de 100 milhões de toneladas por ano e pode ser usado como precursor de diversos outros polímeros. Nesta conjuntura, o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica é, mais do que nunca, um dos principais gargalos do processo, pois a obtenção de variados produtos com máximo aproveitamento da biomassa depende do desenvolvimento de um ou uma sequência de pré-tratamentos capazes de promover o fracionamento dos constituintes da biomassa conforme os produtos que se deseja obter. Além disso, muitos produtos podem ser gerados durante o próprio processo de pré-tratamento, conforme a combinação de biomassa, reagentes e condições operacionais utilizadas.

Dentro deste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar diferentes estratégias de pré-tratamento quanto à capacidade de fracionamento da biomassa lignocelulósica, visando à obtenção de frações ricas principalmente em mono e oligossacarídeos, utilizando como matéria-prima base o capim-elefante. Neste sentido, foram traçados os seguintes objetivos específicos:

- avaliar os efeitos do pré-tratamento de alta pressão utilizando H₂O e CO₂ supercrítico no fracionamento do capim-elefante;
- avaliar como as diferenças de composição de duas biomassas lignocelulósicas distintas, capim-elefante e bagaço de cana-de-açúcar, afetam o desempenho e a eficiência dos pré-tratamentos de alta pressão utilizando H₂O e CO₂ sob diversas condições operacionais;
- analisar os efeitos da utilização do imidazol como solvente de pré-tratamento para o fracionamento do capim-elefante;
- otimizar as condições de tempo e temperatura para a realização de pré-tratamentos utilizando imidazol como solvente para a biomassa de capim-elefante;
- propor uma combinação sequencial de pré-tratamentos para maximizar o fracionamento do capim-elefante;
- avaliar o potencial de fracionamento e a recuperação total de açúcares do capim-elefante da combinação sequencial de pré-tratamentos proposta.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A biomassa lignocelulósica e seus constituintes

Biomassa é um termo genérico utilizado para descrever a matéria orgânica, geralmente formada pela fotossíntese, com potencial para substituir as matérias-primas fósseis utilizadas para produção de biocombustíveis para transporte, calor, energia e biomateriais, além de sustentar novas plataformas químicas (Zhang *et al.*, 2016b). No processo de formação da biomassa a fotossíntese converte energia luminosa em energia química que é armazenada, principalmente, como carboidratos (Zhang, 2008). A biomassa lignocelulósica é o recurso biológico renovável mais abundante do planeta, disponível em árvores coníferas e folhosas, resíduos oriundos do manejo florestal, gramíneas perenes, resíduos agrícolas, industriais e municipais e uma diversidade de culturas empregadas para a produção de energia (Alvira *et al.*, 2010; Maity, 2015; Mohapatra *et al.*, 2017; Zhang, 2008). Os principais constituintes desses materiais são os polímeros de carboidratos, celulose e hemiceluloses, e a lignina. Esses materiais são particularmente atraentes como matérias-primas para a produção de biocombustíveis devido aos custos relativamente baixos, a grande abundância e a oferta sustentável, além de não comprometerem a segurança alimentar (Agbor *et al.*, 2011; Dias *et al.*, 2012).

A composição e a estrutura das biomassas lignocelulósicas são apresentadas na seção 2.1.1, enquanto que as classificações quanto origem e/ou estrutura das diferentes biomassas lignocelulósicas que podem ser utilizadas são apresentadas na seção 2.1.2.

2.1.1 Constituintes da biomassa lignocelulósica

A matriz lignocelulósica possui como principais constituintes a celulose (30-50%), hemiceluloses (15-35%) e lignina (10-20%), sendo que as proporções destes componentes numa fibra dependem do tempo de cultivo, da origem da fibra e das condições de extração utilizadas para a obtenção das fibras (Balat & Balat, 2009; Knauf & Moniruzzaman, 2004; Reddy & Yang, 2005; Zhang *et al.*, 2016b). A celulose é composta de unidades de glicose, e naturalmente, procura-se reduzir essa macromolécula ao seu monômero, para aproveitá-lo como matéria-prima, de modo semelhante ao que é feito com o amido (Reguly, 1996). As hemiceluloses são heteropolissacarídeos complexos compostos por diferentes carboidratos como hexoses, pentoses e ácidos urônicos (Girio *et al.*, 2010; Ramos, 2003). Já a lignina é uma estrutura complexa caracterizada pela presença de anéis aromáticos que apresenta variações em sua composição conforme a fonte da biomassa (Holladay *et al.*, 2007).

Do ponto de vista tecnológico, os açúcares constituintes das frações celulósica e hemicelulósica representam substratos que podem ser utilizados para a produção de diversos produtos de interesse industrial e energético (Buckeridge & de Souza, 2014; Canilha *et al.*, 2010). Porém, celulose e hemiceluloses não se apresentam de forma isolada na natureza, estando sempre associadas entre si e à lignina, constituindo a parede celular vegetal (Figura 1) (Reguly, 1996; Santos *et al.*, 2012). Provavelmente devido a necessidade de apresentar resistência física e química à penetração por microrganismos e à degradação por herbívoros, a parede celular vegetal é uma estrutura recalcitrante difícil de ser desestruturada e convertida em monossacarídeos fermentescíveis (Buckeridge & de Souza, 2014). Com isso, para conversão dos açúcares constituintes faz-se indispensável a realização de pré-tratamentos para a desestruturação e fracionamento da biomassa lignocelulósica. A hidrólise enzimática também é fundamental para a conversão da celulose em glicose após o pré-tratamento,

podendo ainda ser utilizada para converter outros oligossacarídeos obtidos em monossacarídeos.

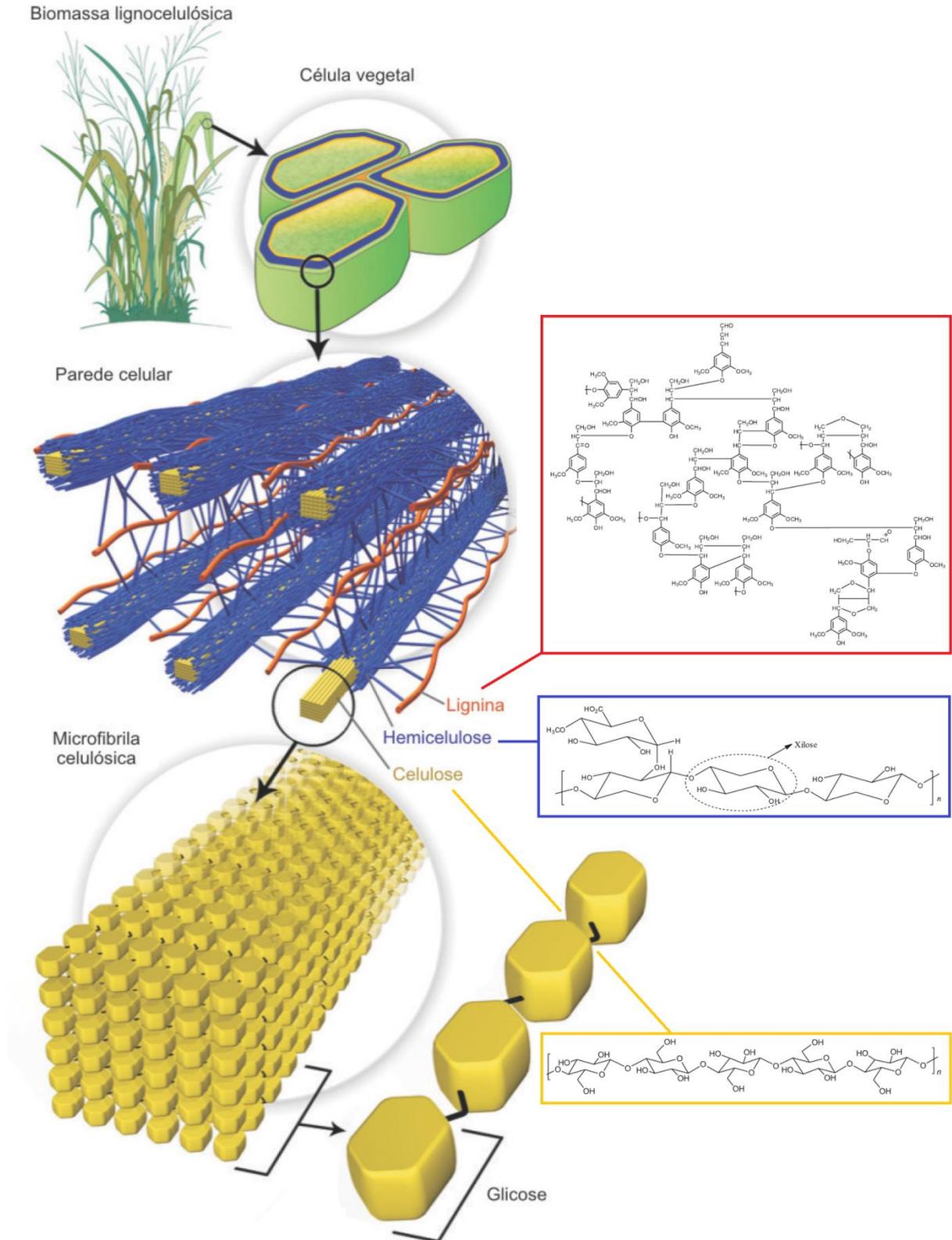


Figura 1. Representação da estrutura da biomassa lignocelulósica (adaptado de Santos *et al.*, 2012).

Conhecer a composição polissacarídica, as interações existentes entre os componentes e a estrutura da parede celular da biomassa lignocelulósica a ser utilizada, tendo clareza não só das diferenças existentes entre as diferentes espécies, mas também das diferenças entre os diferentes tecidos de cada espécie, favorece a determinação das condições operacionais que devem ser empregadas para desestruturar e hidrolisar esses materiais (de Souza *et al.*, 2013).

2.1.1.1 Celulose

A celulose é o principal constituinte da parede celular da célula vegetal e, por consequência, o principal componente da biomassa lignocelulósica e o recurso orgânico renovável mais abundante do planeta, estando presente em plantas, bactérias, fungos, algas e outras biomassas (Agbor *et al.*, 2011; Somerville, 2006). A celulose é um polímero linear composto por unidades de glicose unidas entre si por ligações β -1,4-glicosídicas, formando repetidas unidades de celobiose, dissacarídeo este que é considerado a unidade fundamental da celulose (Figura 2) (Agbor *et al.*, 2011; Sorek *et al.*, 2014; Suhas *et al.*, 2016). A fórmula química da celulose é representada por $(C_6H_{10}O_5)_n$, na qual n é denominado de grau de polimerização e representa o número de repetições de unidades de glicose que pode variar de centenas até milhares de unidades (Somerville, 2006; Sorek *et al.*, 2014). As unidades de β -D-glicose se unem por ligações covalentes entre o grupo OH do carbono C-4 de uma molécula de glicose e o átomo de carbono C-1 da outra molécula de glicose (Suhas *et al.*, 2016). Essa configuração de ligação permite que as cadeias de glucano formem uma estrutura cristalina plana e rígida, unidas por interações conhecidas como forças de van der Waals, entre as quais predomina a realização de ligações de hidrogênio e dipolo-induzido, formando microfibrilas (Agbor *et al.*, 2011; Somerville, 2006; Sorek *et al.*, 2014).

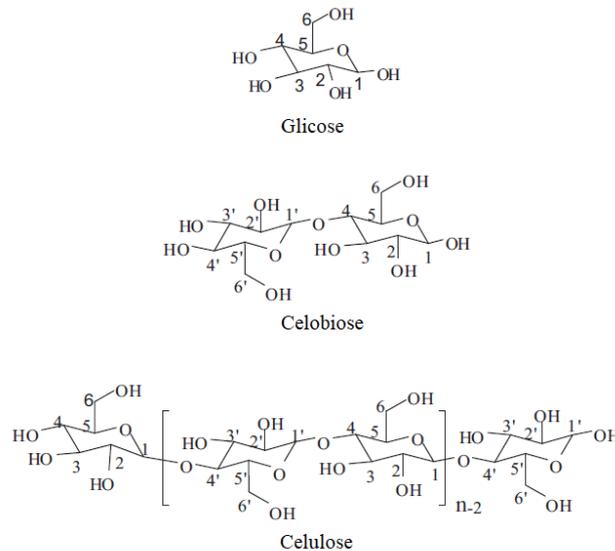


Figura 2. Estrutura da glicose, celobiose e celulose (extraído de Suhas *et al.*, 2016).

O grande número de átomos de hidrogênio e oxigênio distribuídos uniformemente em ambos os lados da cadeia da celulose formam ligações de hidrogênio inter e intramolecular (Figura 3) resultando em arranjos cristalinos ordenados, com regiões amorfas (Agbor *et al.*, 2011; Sorek *et al.*, 2014). De modo geral, 60 a 70% da estrutura da celulose são cristalina e 30 a 40% se encontra sob a forma amorfa (Reguly, 1996). As ligações de hidrogênio entre as cadeias de celulose competem com a água de hidratação das hidroxilas e com isto, durante a formação da microfibrila, apenas uma quantidade mínima de água permanece na estrutura, resultando em uma estrutura cristalina extremamente compactada e desidratada e conferindo as microfibrilas resistência a forças de tensão (Buckeridge *et al.*, 2008). Essas características são responsáveis pela insolubilidade da celulose em solventes orgânicos, água e soluções alcalinas (Suhas *et al.*, 2016). A celulose também é insolúvel em soluções ácidas diluídas em temperatura ambiente, porém, torna-se solúvel em temperaturas mais elevadas, pois a energia fornecida é suficiente para quebrar as ligações de hidrogênio da estrutura da molécula (Harmsen *et al.*, 2010).

A aplicação de tratamentos químicos e o processamento da celulose geram uma variedade de formas polimórficas que apresentam diferentes padrões de raios X e espectros de infravermelhos (Hon, 1994). A celulose I é a forma nativa da celulose, ou seja, como a celulose é encontrada na natureza. A celulose I é o polimorfo mais cristalino da celulose e é encontrado em duas formas, I_α e I_β , que, apesar de muito semelhantes, diferem-se no padrão de empacotamento da estrutura devido a diferente extensão das ligações de hidrogênio existentes entre as cadeias (Huber *et al.*, 2012; O'sullivan, 1997; Suhas *et al.*, 2016). A celulose II é obtida a partir da celulose I por meio de regeneração, que é quando ocorre a solubilização da celulose I em um solvente seguido pela precipitação em água, e pela mercerização, que envolve a dilatação das fibras de celulose com hidróxido de sódio concentrado seguido pela remoção do reagente alcalino (Hon, 1994; O'sullivan, 1997). A transformação da celulose I em celulose II ocorre de modo irreversível, sendo a celulose II uma forma estável (Hon, 1994). A celulose III é formada de forma reversível a partir da celulose I (III_1) ou da celulose II (III_2) por tratamento com amônia ou algumas amidas, seguido da evaporação do reagente (Hon, 1994; O'sullivan, 1997). A celulose IV (IV_1 e IV_2) pode ser preparada por aquecimento em glicerol da celulose III correspondente (Hon, 1994; Huber *et al.*, 2012; O'sullivan, 1997).

A estrutura da celulose pode ser hidrolisada em unidades de glicose por ação enzimática ou utilizando ácidos, tanto diluídos associados a altas temperaturas quanto concentrados. A utilização de hidrólise ácida, apesar de ser eficiente, apresenta diversos problemas de processo, como a alta formação de produtos de degradação e a corrosão dos equipamentos, associados a danos ambientais. A hidrólise enzimática, por sua vez, exige a realização de um pré-tratamento, pois a estrutura cristalina da celulose aliada à estrutura complexa e recalcitrante da matriz lignocelulósica dificultam o acesso das enzimas a celulose. Em qualquer das vias escolhidas para a conversão da celulose deve-se avaliar as condições de

realização para minimizar a formação de compostos de degradação como o 5-hidroxiacetilfurfural (5-HMF), o ácido levulínico e o ácido fórmico, a menos que o processo seja realizado objetivando a obtenção destes compostos.

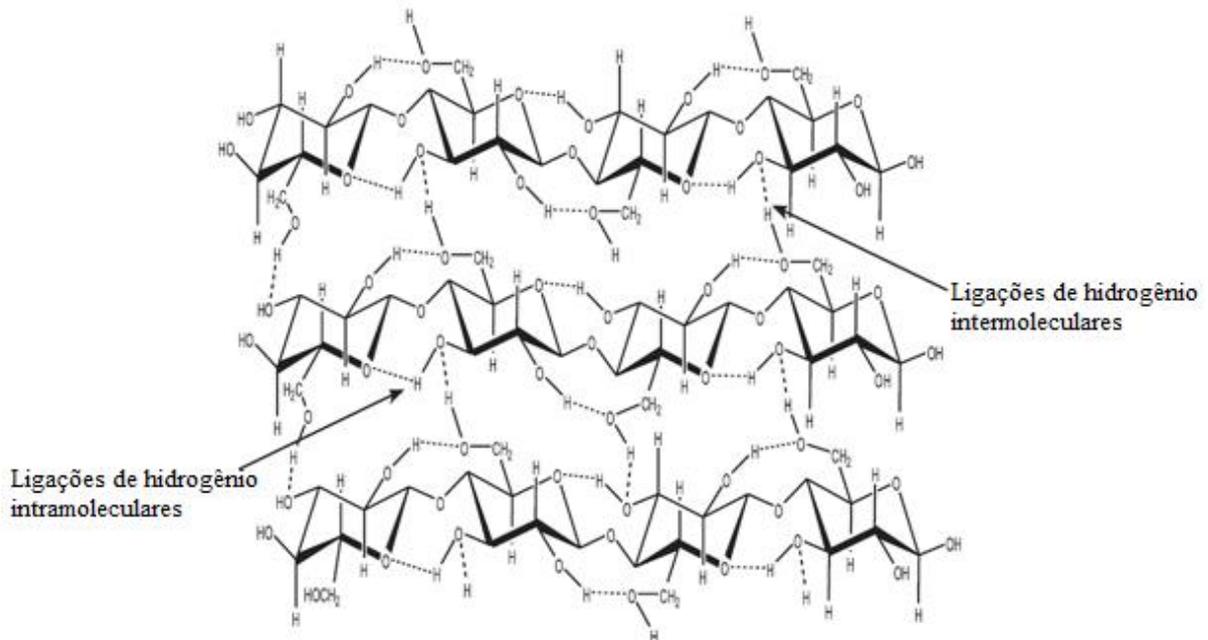


Figura 3. Ligações de hidrogênio inter e intramoleculares da celulose (extraído de Santos *et al.*, 2012).

O 5-HMF é um furaldeído originado de reações de desidratação de hexoses (Figura 4) (Larsson *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2004; Rasmussen *et al.*, 2014; Sehnem *et al.*, 2013). A toxicidade do 5-HMF está associada a danos em células de leveduras, já que a presença do grupo hidroximetil confere ao composto a característica de baixa hidrofobicidade e de permeabilidade à membrana, que acarreta em baixas velocidades de conversão do composto (Sehnem *et al.*, 2013). Segundo Gírio *et al.* (2010), o aumento do tempo e da temperatura de tratamento da biomassa aumenta a quantidade de monômeros hidrolisados e também acelera o processo de degradação dos açúcares de modo significativo. Em temperaturas elevadas a molécula de 5-HMF pode se decompor em ácido levulínico e ácido fórmico (Larsson *et al.*, 1999; Rasmussen *et al.*, 2014; Schuchardt *et al.*, 2001).

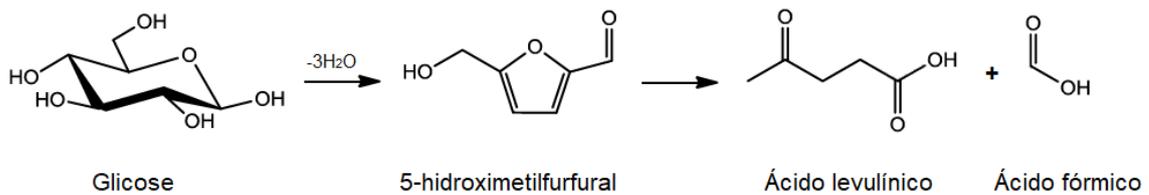


Figura 4. Formação de 5-HMF e dos ácidos levulínico e fórmico (adaptado de Rasmussen *et al.*, 2014).

2.1.1.2 Hemiceluloses

As hemiceluloses são polímeros predominantemente heterogêneos de polissacarídeos de cadeias lineares e ramificadas formados principalmente por unidades de xilose, arabinose, glicose, manose, galactose e ácidos urônicos (Girio *et al.*, 2010; Ramos, 2003). A composição das hemiceluloses varia amplamente entre os diferentes tecidos e espécies vegetais, por exemplo, as hemiceluloses de gramíneas são compostas principalmente por xilose e arabinose, enquanto que nas de árvores coníferas predomina a presença de hexoses (Girio *et al.*, 2010; Ramos, 2003; Saha, 2003; Scheller & Ulvskov, 2010; Sorek *et al.*, 2014). A composição também varia ao longo dos períodos de crescimento, desenvolvimento e maturação de cada planta, o que causa problemas de heterogeneidade para o processamento de cada biomassa (Sorek *et al.*, 2014). As hemiceluloses funcionam como agentes de reticulação da parede celular, ligando-se a celulose, lignina, proteínas da parede celular, pectinas e polissacarídeos não estruturais através de interações covalentes e não covalentes (Sorek *et al.*, 2014).

As xilanas são os polissacarídeos hemicelulósicos mais abundantes em gramíneas como o capim-elefante, angiospermas folhosas como o eucalipto e diversos resíduos agroindustriais, como o bagaço de cana-de-açúcar (Girio *et al.*, 2010; Saha, 2003; Sorek *et al.*, 2014). As xilanas são compostas por uma cadeia linear de unidades de xilose unidas por ligações $\beta(1-4)$ e comumente formam cadeias laterais ligando-se principalmente com a arabinose e os ácidos glucurônico, acético, ferúlico e *p*-cumárico (Figura 5) (Buckeridge & de Souza, 2014; Saha, 2003; Scheller & Ulvskov, 2010; Sorek *et al.*, 2014). As diferentes

conformações existentes da cadeia de xilana resultam em diferenças de solubilidade das hemiceluloses em água e em outros solventes polares, bem como em diferenças nas interações das hemiceluloses com as fibrilas de celulose (Sorek *et al.*, 2014). Conforme as ligações realizadas para além da própria xilose, as xilanas podem ser classificadas como homoxilana, arabinoxilana, glucuronoxilana e glucuronoarabinoxilana (Girio *et al.*, 2010; Saha, 2003). A quantidade e a classificação da xilana presente em cada hemicelulose varia conforme a espécie da biomassa (Saha, 2003; Sorek *et al.*, 2014).

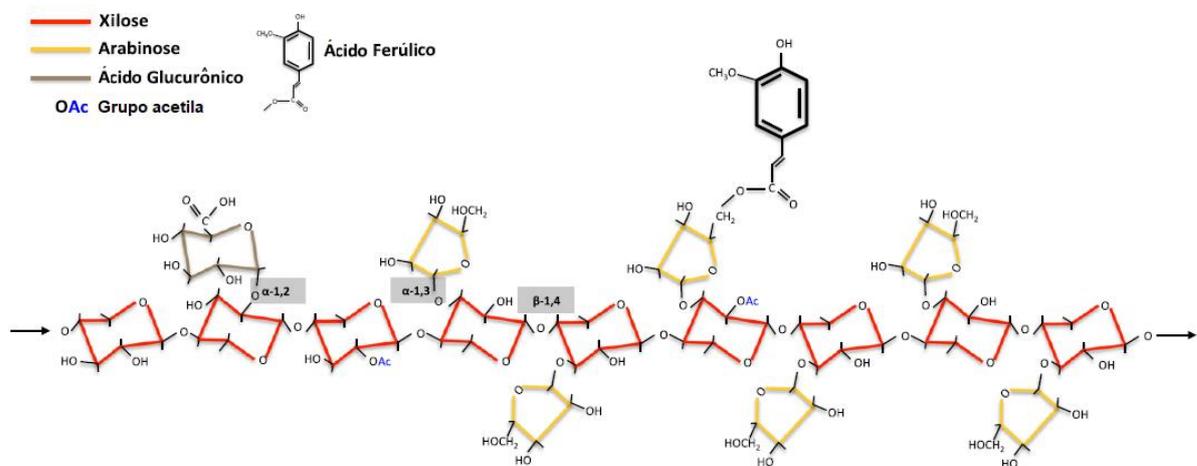


Figura 5. Estrutura da glucuronoarabinoxilana (extraído de Buckeridge & de Souza, 2014).

Por ser a segunda estrutura polissacarídica mais abundante da natureza, as hemiceluloses representam um grande potencial para obtenção de açúcares fermentescíveis (Agbor *et al.*, 2011; Sorek *et al.*, 2014). Porém, a obtenção destes açúcares ainda é um grande desafio, uma vez que existe uma grande variedade deles na composição das hemiceluloses, formando diferentes ligações que auxiliam na manutenção da integridade da parede celular da planta *in situ*, ajudando a proteger as fibras contra a degradação por enzima (Sorek *et al.*, 2014; Zhang, 2008). Devido à realização de ligações com a celulose na parede celular, é proposto que pelo menos 50% das hemiceluloses sejam removidas da estrutura para aumentar a digestibilidade enzimática da celulose (Agbor *et al.*, 2011). No entanto, assim como na celulose, os tratamentos realizados para a desestruturação e remoção das hemiceluloses

podem levar a degradação dos seus monossacarídeos, formando, por exemplo, 5-HMF a partir das hexoses, furfural a partir das pentoses e ácidos orgânicos provenientes da degradação tanto do furfural quanto do 5-HMF (Agbor *et al.*, 2011).

As hemiceluloses possuem menor massa molecular em comparação com a celulose e, devido as suas ramificações de cadeia curta, são mais facilmente hidrolisadas, apresentando-se como mais susceptíveis a alterações térmicas e químicas e respondendo de forma diferente cada tipo de pré-tratamento (Agbor *et al.*, 2011; Reddy & Yang, 2005). Tratamentos ácidos são capazes de romper ligações glicosídicas e despolimerizar as hemiceluloses, ao mesmo tempo em que apresentam maior potencial de desidratação dos monômeros liberados, formando furaldeídos (Sorek *et al.*, 2014). Em pré-tratamentos utilizando água em altas temperaturas e pressões, a água assume características ácidas o suficiente para iniciar a hidrólise das hemiceluloses e provocar a liberação de ácidos como o ferúlico, cumárico, urônico e acético a partir dos constituintes presentes, posteriormente esses ácidos agem como catalisadores de reação, provocando a auto-hidrólise da biomassa (Sorek *et al.*, 2014). Já os pré-tratamentos alcalinos solubilizam os oligômeros das hemiceluloses e hidrolisam as ligações éster, tendo menor efeito sobre as ligações glicosídicas (Sorek *et al.*, 2014).

O furfural é o principal produto de degradação formado a partir da desidratação de pentoses como a xilose e a arabinose (Figura 6) (Choi *et al.*, 2015; de Jong *et al.*, 2012). A degradação do 5-HMF também pode originar furfural, porém a quantidade de furfural a ser formada é muito pequena em relação à quantidade formada pela xilose (Gandini & Belgacem, 1997). O furfural é um composto indesejado no meio de fermentação por causar efeitos inibitórios sobre o crescimento de microrganismos. A adição desse composto tem um efeito imediato sobre o comportamento fisiológico de leveduras em um cultivo, com a diminuição da produção de biomassa, do consumo de glicose e, conseqüentemente, da produção de etanol e glicerol (Lin *et al.*, 2009). Por outro lado, o furfural pode ser convertido em produtos de

interesse comercial como o álcool furfurílico, que é responsável pelo consumo de 60 a 70% das 200.000 toneladas por ano de furfural produzidas mundialmente (Choi *et al.*, 2015; de Jong *et al.*, 2012; Gandini & Belgacem, 1997).

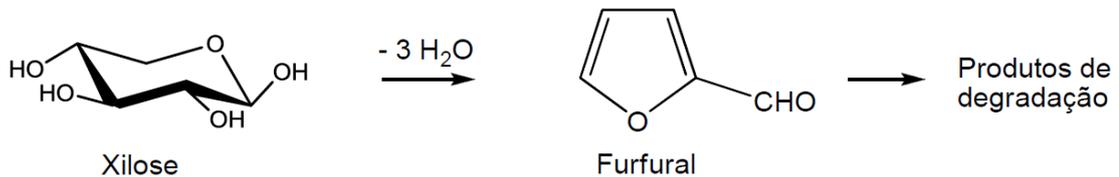


Figura 6. Formação do furfural a partir da xilose (adaptado de Marabezi, 2009)

2.1.1.3 Lignina

A lignina é uma macromolécula complexa, normalmente designada como um heteropolímero fenólico, tendo como unidades monoméricas os monolignóis: álcool *p*-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico (Figura 7) (Agbor *et al.*, 2011; Boerjan *et al.*, 2003; Isikgor & Becer, 2015; Reguly, 1996; Toor *et al.*, 2011; Welker *et al.*, 2015). Esses monolignóis quando incorporados no polímero de lignina (lignificação) são designados como *p*-hidroxifenila (H), guaiacila (G) e siringila (S), respectivamente (Boerjan *et al.*, 2003; Isikgor & Becer, 2015). A lignina é um complexo molecular altamente reticulado com estrutura amorfa e age como cola entre os demais componentes da biomassa lignocelulósica (Agbor *et al.*, 2011; Anwar *et al.*, 2014; Reddy & Yang, 2005). Durante o crescimento das plantas, as unidades monoméricas são secretadas na parede celular formadora, onde se infiltram na matriz polissacarídica e são polimerizadas (Sorek *et al.*, 2014). O resultado é a formação de uma barreira protetora rígida ao redor dos polissacarídeos, que permite o transporte de água, suporta o crescimento vertical e previne a invasão de patógenos, consequentemente protege também as ações de agentes químicos e físicos, acabando por influenciar significativamente nos processos para sacarificação da celulose e hemiceluloses (Reddy & Yang, 2005; Sorek *et al.*, 2014; Vanholme *et al.*, 2008).

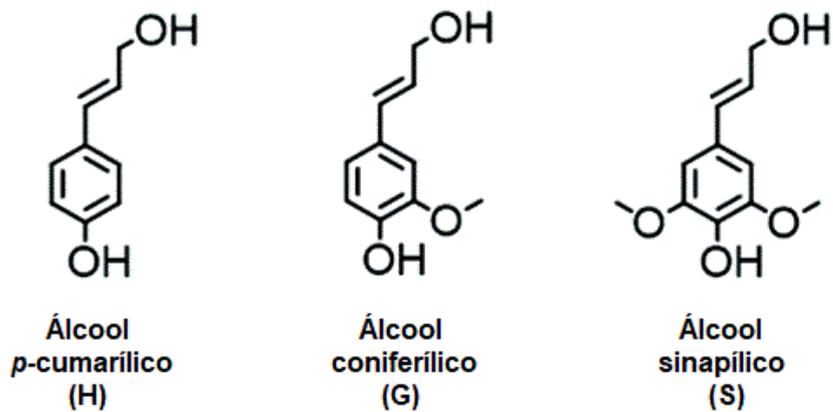


Figura 7. Álcoois precursores da lignina (adaptado de Isikgor & Becer, 2015).

Após os monômeros de lignina serem biossintetizados, eles são translocados para a parede celular, onde são oxidados e posteriormente polimerizados (Vanholme *et al.*, 2008). Este processo depende da exportação dos monômeros, das enzimas oxidantes e da disponibilidade de monômeros na região apoplástica da célula (Welker *et al.*, 2015). Isso faz com que a composição da lignina seja variável em diferentes tipos de células, tecidos e órgãos (Welker *et al.*, 2015). Diferentes espécies de plantas diferem tanto na quantidade total de lignina quanto na estrutura de lignina que contêm (Sorek *et al.*, 2014). A lignina das coníferas são polímeros de resíduos derivados do álcool coniferílico, a lignina das angiospermas são polímeros de resíduos derivados dos álcoois coniferílico e sinapílico, já a lignina das gramíneas e herbáceas são formadas pelos três álcoois precursores (Ramos, 2003; Reguly, 1996). As gramíneas apresentam os menores teores de lignina, já as coníferas são as mais ricas (Canilha *et al.*, 2010).

As biomassas lenhosas podem persistir no meio ambiente por anos devido à dificuldade de quebrar as ligações da lignina, principalmente em condições normais. Durante a lignificação, vários tipos de ligações covalentes são formados entre os monômeros da lignina, incluindo ligações éteres, ésteres e carbono-carbono (Reguly, 1996; Sorek *et al.*, 2014). As ligações intramoleculares mais comuns na lignina são as β -O-aril-éteres formadas

pelo acoplamento do grupo 4-hidroxila do anel benzênico com a cadeia lateral de propanoide de outra subunidade (Sorek *et al.*, 2014).

A lignina pode ser removida das paredes das células vegetais em variadas proporções por pré-tratamentos de alta severidade, que incluem a utilização de ácidos, bases, agentes de oxidação, solventes e agentes físicos como calor e pressão. A maioria dos pré-tratamentos cliva as ligações éster e éter em vários graus (Sorek *et al.*, 2014). As ligações β -O-4-aril-éteres representam 30% a 50% das ligações nas madeiras e até 90% das ligações nas gramíneas, sendo que muitos pré-tratamentos, inclusive os com ácidos diluídos, clivam preferencialmente essas ligações (Sorek *et al.*, 2014; Villaverde *et al.*, 2009). Em contraste, as ligações éster, que aparecem em grandes proporções em algumas gramíneas, são quebradas sob condições alcalinas (Sorek *et al.*, 2014). As ligações carbono-carbono na lignina são as mais recalcitrantes, mas podem ser clivadas por catalisadores oxidativos (Sorek *et al.*, 2014). A lignina realiza ainda ligações com as cadeias dos polissacarídeos ramificados, como as pectinas e as hemiceluloses (Sorek *et al.*, 2014). Essas ligações influenciam diretamente na hidrólise da biomassa lignocelulósica (Sorek *et al.*, 2014). As ligações de natureza covalente entre a lignina e principalmente as hemiceluloses são ligações dos tipos éter e éster (Reguly, 1996; Sorek *et al.*, 2014). Ligações de hidrogênio e forças de dispersão de London atuam como ligações de natureza adsortiva unindo a lignina às hemiceluloses (Reguly, 1996).

2.1.2 As diferentes variedades de biomassa lignocelulósica

As biomassas lignocelulósicas mais comumente avaliadas para conversão em biocombustíveis e produtos podem ser divididas em quatro grandes grupos: resíduos municipais e industriais, resíduos florestais, resíduos agrícolas e culturas energéticas (Maity, 2015).

Os resíduos municipais e industriais compreendem resíduos gerados pelo consumo residencial, comercial e institucional, os quais apresentam uma grande variação na composição, mas que geralmente contêm boas quantidades de materiais orgânicos derivados de plantas que podem ser usados como fonte potencial de biomassa (Maity, 2015). Porém, as diferenças de composição dessa fonte de biomassa, que variam não só pelo processo ou consumo que deu origem a esses resíduos, mas também conforme a cultura de cada região, dificultam o seu aproveitamento, sendo necessária pelo menos mais uma etapa inicial de separação ou triagem.

Os resíduos florestais se referem à biomassa proveniente da madeira durante seu processamento para transformação em produtos comerciais ou ainda da manutenção de florestas em procedimentos como a poda e limpeza (García *et al.*, 2014; Maity, 2015). Fazem parte deste grupo, por exemplo, serragem, cascas e galhos. Conforme reportado por Lima *et al.* (2014), o Brasil possui cerca de 6,5 milhões de hectares de florestas cultivadas ocupadas por eucalipto e pinus. Estima-se que 30% do total de biomassa de eucalipto produzida seja perdida como resíduo quando as árvores são colhidas ao final do ciclo de sete anos (Lima *et al.*, 2014). Estima-se ainda que entre 10 e 12% do total de eucalipto colhido seja casca, resultando em um montante de 15 a 25 t.ha⁻¹.ano⁻¹ (Lima *et al.*, 2014). A casca de eucalipto é uma biomassa rica em extrativos e polifenóis, mas inadequada para produção de polpa de celulose e papel, sendo por isso usualmente utilizada para geração de vapor e eletricidade (García *et al.*, 2014).

Os resíduos agrícolas compreendem caules, folhas e palha que são deixados no campo durante a colheita, bem como uma grande diversidade de resíduos agroindustriais, como os provenientes de vinícolas e indústrias de fabricação de azeite e óleos (García *et al.*, 2014; Maity, 2015). O bagaço de cana-de-açúcar é, sem dúvida, um dos resíduos agrícolas mais importantes do Brasil. Os dados apresentados pela Companhia Nacional de

Abastecimento (Conab) mostram que na safra de 2016/2017 foram produzidos no Brasil mais 657 milhões de toneladas de cana-de-açúcar enquanto que na safra de 2017/2018 a produção chegou a pouco mais de 633 milhões de toneladas (Conab, 2018). Cada tonelada de cana-de-açúcar produz cerca de 140 kg de bagaço (base seca), além de mais 140 kg de palha (base seca) (Lima *et al.*, 2014; Santos *et al.*, 2012). O bagaço de cana-de-açúcar é formado por fragmentos heterogêneos com dimensões que variam de 1 a 25 mm, conforme o trabalho de moagem realizado e a variedade da cana-de-açúcar (Marabezi, 2009). A composição do bagaço apresenta variações em função da variedade da cana empregada e da localização geográfica dos locais de cultivo e apresenta a celulose como componente principal, seguida por hemiceluloses e lignina, respectivamente (Marabezi, 2009). Atualmente, o bagaço de cana-de-açúcar é utilizado para a geração de energia elétrica dentro das próprias usinas de processamento da cana-de-açúcar. Essa prática, além de gerar eletricidade para atender à demanda energética da usina, gera um excedente de energia de cerca de 60% que é vendido para as companhias de eletricidade e abastece a população (JN, 2018). A utilização dos resíduos da cana-de-açúcar para a geração de energia elétrica é responsável por 8% do total de eletricidade consumida entre os meses de abril e novembro, coincidindo com o principal período de estiagem em estados como São Paulo, principal produtor de cana-de-açúcar do Brasil (JN, 2018). A utilização do bagaço de cana-de-açúcar para produção de eletricidade acaba poupando cerca de 15% da água nos reservatórios das hidrelétricas das regiões Sudeste e Centro-Oeste do Brasil (JN, 2018).

Diferentemente das demais fontes de biomassa lignocelulósica, as culturas energéticas são espécies vegetais cultivadas especificamente para produção de grande quantidade de biomassa na qualidade desejada para a conversão em energia, biocombustíveis e outros produtos (Maity, 2015). São normalmente culturas de alto rendimento e de curta rotação, geralmente de baixo custo e com pouca necessidade de manutenção (García *et al.*,

2014; Maity, 2015). As culturas energéticas lignocelulósicas podem ser classificadas em lenhosas e herbáceas (Maity, 2015). As culturas energéticas lenhosas são árvores folhosas de crescimento rápido que são colhidas em 5 a 8 anos de plantação. Um exemplo de cultura de energia lenhosa é a *Paulownia*, uma árvore cujo cultivo, originalmente usado pelos agricultores como barreira florestal para proteger suas plantações contra poeira, tempestades e inundações, expandiu-se enormemente em todo o mundo devido ao seu rápido crescimento e alta produção de biomassa. *Paulownia* inclui entre suas propriedades a capacidade de recuperação do solo, controle e estabilização da erosão, capacidade de fixação do CO₂, potencial de reflorestamento (devido à baixa necessidade de água para o cultivo) (García *et al.*, 2014). As culturas energéticas lenhosas de rotação curta são tradicionalmente usadas para a fabricação de papel e celulose (Maity, 2015). Ao contrário das gramíneas perenes, a produtividade da biomassa lenhosa é pouco afetada pelas variações sazonais (Maity, 2015). Culturas agrícolas como oleaginosas, cereais, culturas açucareiras e de amido, e culturas aquáticas como algas também são consideradas culturas energéticas (Maity, 2015). Entre as herbáceas encontram-se inclusas gramíneas perenes como as dos gêneros *Miscanthus*, *Panicum* e *Pennisetum*. Essas culturas de gramíneas são muito atraentes devido ao alto rendimento, altas taxas de fixação de CO₂ e de crescimento, alto teor de carboidratos fermentescíveis, uso eficiente de água e nutrientes associados aos baixos requerimentos de fertilizantes e herbicidas, alta adaptação e resistência a baixas temperaturas e doenças (García *et al.*, 2014; Mohapatra *et al.*, 2017). Gramíneas principalmente dos gêneros *Miscanthus* e *Panicum*, que por vezes também são designadas como capim-elefante, têm sido propostas como principais culturas para produção de bioenergia na Europa e Estados Unidos (Lima *et al.*, 2014; Mohapatra *et al.*, 2017). Embora espécies desses gêneros também possam ser encontradas e utilizadas no Brasil, existem outras gramíneas já estabelecidas e caracterizadas com potencial de uso como cultura energética (Lima *et al.*, 2014).

2.1.2.1 Capim-elefante

O capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) é uma gramínea originária da África tendo sido introduzido em diversos países por ser reconhecida como uma forrageira de alto valor para a alimentação animal (Mohapatra *et al.*, 2017; Samson *et al.*, 2005). O capim-elefante se encontra atualmente difundido em regiões tropicais e subtropicais do mundo e desenvolvendo-se bem em altitudes que variam do nível do mar até 2400 metros (Angima *et al.*, 2002; Mohapatra *et al.*, 2017; Quesada, 2005). Esta espécie de gramínea chegou ao Brasil na década de 1920 e hoje se encontra adaptada às cinco regiões do país (Quéno *et al.*, 2011).

P. purpureum Schum. pode ser descrito com uma gramínea perene, com elevado potencial produtivo, atingindo mais de 3 metros de altura e possibilitando até 4 colheitas por ano (Strezov *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 2011). Gramínea de hábito de crescimento cespitoso com colmos eretos, dispostos em touceiras abertas ou não e de resistência considerável à seca e ao frio (Morais, 2008; Quesada, 2005). O capim-elefante se desenvolve bem em temperaturas entre 18 e 30 °C em áreas com precipitação de 800 a 4000 milímetros, entretanto, o melhor desenvolvimento se dá em altitudes de até 1500 metros e com temperaturas de 24 °C (Morais, 2008; Quesada, 2005). Como as demais gramíneas de modo geral, é composto principalmente por celulose, hemiceluloses e lignina, sendo que os polímeros de carboidratos formam cerca de dois terços da matéria seca da parede celular, possuindo ainda menores concentrações de vários outros compostos, como proteínas, ácidos, sais e minerais (Mohapatra *et al.*, 2017).

O capim-elefante é uma espécie de alta eficiência fotossintética, ou seja, seu metabolismo é C4, que tem maior eficiência no aproveitamento da luz e na fixação de CO₂ atmosférico, por isso possui uma maior capacidade de produção de matéria seca, otimizando o uso da água do solo e da energia solar, contribuindo com o controle da erosão do solo (Quesada, 2005; Samson *et al.*, 2005; Xie *et al.*, 2011). Devido à fixação de CO₂ altamente eficiente, o capim-elefante possui uma produtividade que chega a 60 t.ha⁻¹.ano⁻¹ de biomassa

seca em condições ótimas, e até 30 t.ha⁻¹.ano⁻¹ de biomassa seca em condições não otimizadas (Mohapatra *et al.*, 2017). Outro aspecto favorável à utilização dessas gramíneas é que elas possuem poucas pragas naturais, podendo ser produzidas com pouca ou nenhuma utilização de pesticidas (Mohapatra *et al.*, 2017; Xie *et al.*, 2011). Samson *et al.* (2005) apresentaram um balanço energético do ciclo de vida da produção de biomassa de capim-elefante na estação de campo da Samarco Mineração SA (Anchieta - ES, Brasil). O balanço energético se mostrou favorável, com uma produção energética 21,3 vezes maior que os gastos, sendo considerado ainda que o balanço poderia ter sido mais favorável se não houvesse a necessidade de inclusão de fertilizantes de nitrogênio em função da variedade utilizada.

O potencial de utilização do capim-elefante como substrato para produção de etanol a partir de sua celulose, bem como fonte de carbono para produção de enzimas, já possui relatos publicados (Menegol *et al.*, 2014; Scholl *et al.*, 2015a; Scholl *et al.*, 2015b; Scholl, 2015). Recentemente, a produção de etanol a partir de capim-elefante também foi associada à produção de ácido lático como forma de aproveitamento das pentoses dessa biomassa favorecendo o balanço econômico do processo (Montipó *et al.*, 2018).

2.2 Processamento da biomassa lignocelulósica

Conforme apresentado nas seções anteriores, os constituintes da biomassa lignocelulósica podem ser convertidos em uma grande diversidade de combustíveis e produtos; porém, a estrutura da matriz lignocelulósica não permite a conversão de forma direta. Deste modo, são necessárias duas etapas de processamento fundamentais para desestruturar a matriz lignocelulósica e liberar seus açúcares constituintes: o pré-tratamento e a hidrólise. A definição da metodologia e das condições operacionais em que cada etapa deverá ser conduzida dependerá dos produtos visados.

Os pré-tratamentos são propostos como primeira etapa com objetivo de desestruturar a matriz lignocelulósica, rompendo as barreiras que impossibilitam a conversão dos componentes destas biomassas em produtos comerciais. A realização de pré-tratamentos adequados, capazes de fracionar os materiais lignocelulósicos, é primordial para a obtenção dos produtos desejados. Apesar disto, o fracionamento ainda é um dos principais gargalos da utilização da biomassa lignocelulósica, merecendo posição de destaque nas pesquisas de desenvolvimento tecnológico.

A hidrólise é o segundo procedimento fundamental para converter os polissacarídeos em açúcares fermentescíveis que possam em seguida ser convertidos nos produtos desejados pela ação de microrganismos. Apesar da hidrólise ácida já ser bastante difundida e apresentar bons resultados, ela apresenta diversos problemas que tornam fundamental a busca pela viabilização da hidrólise enzimática.

Com esse embasamento as seções a seguir apresentam características específicas dessas etapas e de como elas podem ser conduzidas conforme os objetivos traçados.

2.2.1 Pré-tratamento

O pré-tratamento é uma etapa crucial para a bioconversão dos materiais lignocelulósicos, responsável por solubilizar e/ou fracionar os principais componentes da biomassa (celulose, hemiceluloses e lignina) aumentando assim sua digestibilidade enzimática (Menon & Rao, 2012; Ramos, 2003). A escolha do pré-tratamento deve considerar a compatibilidade das matérias-primas, enzimas e organismos que serão utilizados em todas as etapas até a obtenção do(s) produto(s) desejado(s) (Menon & Rao, 2012).

O pré-tratamento não é apenas caro, mas também tem um impacto generalizado no custo de praticamente todas as operações posteriores, principalmente as de processamento biológico, e muitas vezes também faz necessária a inclusão de processos que antecedam o

próprio pré-tratamento para a adequação da biomassa (Menon & Rao, 2012). A redução dos custos do pré-tratamento está vinculada a obtenção de um processo de alto rendimento e recuperação dentro dos objetivos traçados em cada caso, com a realização do menor número de etapas possível, principalmente no que se refere à preparação da biomassa para o pré-tratamento e à purificação dos produtos obtidos, que possibilite a utilização de reatores de baixo custo e em volumes coerentes, com requerimento mínimo de calor e energia e que, preferencialmente, não produza resíduos (Alvira *et al.*, 2010).

De modo geral, os pré-tratamentos tem por objetivo aumentar a área superficial da biomassa, reduzir a polimerização e a cristalização da celulose, modificar ou remover a lignina, degradando o mínimo possível a celulose e as hemiceluloses, facilitando a atividade catalítica de enzimas ou ácidos na hidrólise e resultando em um maior rendimento da conversão em açúcares fermentescíveis (Kumar *et al.*, 2011; Olivier-Bourbigou *et al.*, 2010). Dentro do contexto de biorrefinaria, em referência ao modo de operação das refinarias de petróleo, existe a pretensão de utilizar-se a totalidade da biomassa em processos integrados para produzir combustíveis, energia, produtos químicos e insumos industriais (Isikgor & Becer, 2015). Para tanto, a separação seletiva das frações constituintes da biomassa lignocelulósica – celulose, hemiceluloses e lignina – integra os principais objetivos dos pré-tratamentos (Isikgor & Becer, 2015). Dessa forma cada fração pode ser destinada adequadamente para a obtenção de diversos produtos de interesse comercial, industrial ou energético (Isikgor & Becer, 2015).

Tendo em vista as diferenças estruturais e de composição existentes entre a grande variedade de biomassas lignocelulósicas, torna-se difícil obter um método de pré-tratamento que seja adequado para todos os tipos destes materiais (Alvira *et al.*, 2010; Hamelinck *et al.*, 2005; Menon & Rao, 2012). Durante as últimas décadas, várias abordagens têm sido utilizadas para o desenvolvimento de pré-tratamentos de baixo custo para a liberação dos

açúcares da celulose e das hemiceluloses. Estudos de diferentes pré-tratamentos presentes na literatura são descritos em termos dos mecanismos envolvidos, vantagens e desvantagens e avaliação econômica (Menon & Rao, 2012).

Conforme o mecanismo de ação e efeito causado, os pré-tratamentos podem ser classificados com físicos, químicos, biológicos ou físico-químicos (Agbor *et al.*, 2011; Menon & Rao, 2012). Os pré-tratamentos físicos provocam o aumento da área superficial específica e a diminuição tanto do grau de polimerização quanto da cristalinidade da celulose (Agbor *et al.*, 2011). Porém, estes pré-tratamentos exigem normalmente grande quantidade de energia e são de elevado custo, empregam meios puramente mecânicos para reduzir o tamanho das partículas da matéria-prima, aumentando assim sua área superficial (Laser *et al.*, 2002). O principal pré-tratamento físico é a moagem, que geralmente é utilizada como um componente do pré-tratamento. Ainda fazem parte dos processos físicos de pré-tratamento a variação da temperatura e da pressão, extrusão, secagem e irradiação (raios gama, feixe de elétrons, micro-ondas, etc.) sendo que para cada um deve-se avaliar sua real efetividade (Knauf & Moniruzzaman, 2004; Menon & Rao, 2012).

Os pré-tratamentos biológicos consistem na utilização de microrganismos, tais como fungos e bactérias, que produzem enzimas capazes de degradar a lignina e as hemiceluloses resultando na despolimerização e deslignificação parcial da biomassa lignocelulósica (Agbor *et al.*, 2011; Alvira *et al.*, 2010; Hartmann, 2017; Ramos, 2003). Esses pré-tratamentos são vantajosos por não necessitarem da adição de produtos químicos poluentes, não gerarem resíduos causadores de poluição ambiental e demandarem baixas quantidades de energia (Camassola & Dillon, 2009). A degradação da lignina por fungos de podridão branca é a mais eficaz para o pré-tratamento biológico de materiais lignocelulósicos e ocorre através da ação de enzimas que degradam a lignina como peroxidases e lacases (Alvira *et al.*, 2010; Camassola & Dillon, 2009). As enzimas lignina peroxidase (E.C. 1.11.1.7) e manganês

peroxidase (E.C. 1.11.1.7) são os dois principais componentes do complexo enzimático lignolítico das peroxidases. Neste complexo, a lignina peroxidase degrada as unidades de lignina não fenólicas enquanto que a manganês peroxidase atua tanto nas unidades de lignina fenólica quanto nas não fenólicas através de reações de peroxidação lipídica (Sindhu *et al.*, 2016). As lacases (E.C. 1.10.3.2.), enzimas contendo cobre, agem em conjunto com a lignina peroxidase e manganês peroxidase, levando à completa degradação da lignina (Sindhu *et al.*, 2016). Resultados promissores da redução do teor de lignina são relatados, porém a biodegradação da lignina é um processo muito lento, sendo considerado viável apenas se for aplicado em conjunto com outros métodos físicos e químicos (Ramos, 2003).

Os pré-tratamentos químicos são baseados em metodologias amplamente utilizadas na indústria do papel e celulose para a deslignificação de materiais lignocelulósicos para produzir produtos de papel de alta qualidade (Menon & Rao, 2012). Os pré-tratamentos químicos utilizam ácidos, bases, peróxidos, solventes orgânicos, líquidos iônicos, etc., que atuam no material lignocelulósico possibilitando o aumento do tamanho dos poros, a solubilização da lignina e das hemiceluloses e o aumento da área superficial (Menon & Rao, 2012; Weil *et al.*, 1994). Os produtos químicos mais utilizados neste tipo de pré-tratamento são o ácido sulfúrico (H_2SO_4) e o hidróxido de sódio (NaOH), porém diversos problemas podem ser relacionados a utilização desses produtos, como a corrosão dos equipamentos, a degradação dos açúcares e a necessidade de neutralização após a reação (Menon & Rao, 2012; Mosier *et al.*, 2005). O hidróxido de sódio tem sido extensivamente aplicado há vários anos, sendo capaz de quebrar a estrutura de lignina da biomassa, aumentando a acessibilidade das enzimas à celulose e as hemiceluloses (Menon & Rao, 2012). Os pré-tratamentos alcalinos causam a degradação das ligações éster e glicosídicas das ramificações da cadeia de lignina, resultando na alteração de sua estrutura, o inchaço e a descristalização parcial da celulose e a solvatação parcial das hemiceluloses (Menon & Rao, 2012). As condições para o pré-

tratamento alcalino são geralmente menos severas do que outros pré-tratamentos, podendo ser realizados em temperatura ambiente combinada com longos tempos de residência ou em períodos mais curtos conforme a temperatura é aumentada (Alvira *et al.*, 2010; Menon & Rao, 2012). Após realizada a reação é necessário uma etapa de neutralização para remover a lignina e os inibidores (sais, ácidos fenólicos, furfural e aldeídos) antes da hidrólise enzimática (Menon & Rao, 2012).

Diversos solventes estão sendo propostos e avaliados como opções mais sustentáveis para o pré-tratamento químico dos materiais lignocelulósicos, em substituição aos clássicos reagentes ácidos e alcalinos. Faz parte desse grupo a utilização de solventes orgânicos, como etanol, metanol, acetona, etilenoglicol e diversos ácidos orgânicos, que apresentam potencial para deslignificar a biomassa e promover a recuperação da lignina extraída (Ruiz *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2016a). Os líquidos iônicos são outra classe de solventes promissores, apresentando como principal vantagem a possibilidade de serem desenvolvidos para atender as necessidades específicas do processo (Menon & Rao, 2012). Os líquidos iônicos são compostos de pelo menos um ânion e um cátion e possuem ponto de fusão inferior a 100 °C (Menon & Rao, 2012; Olivier-Bourbigou *et al.*, 2010). O íon imidazólio é precursor de líquidos iônicos mais estudado e por isso a utilização do imidazol fundido também começou a ser avaliada primeiramente como solvente de amido por Jordan *et al.* (2014) e, recentemente, Morais *et al.* (2016) sugeriram sua utilização para o fracionamento e deslignificação de biomassa lignocelulósica (Jordan *et al.*, 2014; Morais *et al.*, 2016). Considerando as vantagens oferecidas pelo uso de solventes orgânicos, líquidos iônicos e a nova possibilidade de pré-tratamento utilizando apenas o imidazol fundido, a seção 2.2.1.1 apresentará dados mais aprofundados sobre esses solventes.

Processos que combinam mecanismos físicos e químicos de ação costumam apresentar os resultados mais promissores (Ramos, 2003). Os principais representantes deste

grupo são os pré-tratamentos hidrotérmicos com ou sem adição de catalisadores, que, dada a importância desses pré-tratamentos, serão mais bem discutidos e aprofundados na seção 2.2.1.2. De modo geral, os pré-tratamentos hidrotérmicos favorecem a dissolução das hemiceluloses e sua recuperação na fração líquida resultante, enquanto que não afeta significativamente a celulose e a lignina na fração sólida (Girio *et al.*, 2010). Por este motivo, os pré-tratamentos hidrotérmicos, também conhecidos por auto-hidrólise, vêm sendo utilizados como primeiro estágio de fracionamento em biorrefinarias para a separação dos mono e oligossacarídeos da fração hemicelulósica, sendo combinados a um segundo estágio de pré-tratamento visando à deslignificação da fração sólida resultante. Pesquisas recentes têm apontado o potencial da combinação do pré-tratamento hidrotérmico com pré-tratamentos organosolv e alcalinos (Kim *et al.*, 2016; Meighan *et al.*, 2017; Romaní *et al.*, 2011; Romaní *et al.*, 2016; Ruiz *et al.*, 2011; Vallejos *et al.*, 2015; Weinwurm *et al.*, 2017).

2.2.1.1 Pré-tratamentos químicos utilizando solventes sustentáveis

Entre os solventes com potencial para pré-tratar a biomassa lignocelulósica e substituir os reagentes químicos como o ácido sulfúrico e o hidróxido de sódio, diminuindo os problemas principalmente ambientais associados a utilização destes produtos, cabe destacar os solventes orgânicos e os líquidos iônicos.

Apesar de já terem sido utilizados como solventes para pré-tratamento de materiais lignocelulósicos a mais de 100 anos, os solventes orgânicos atraem bastante interesse desde a década de 1970 por serem uma alternativa eficiente e ambientalmente correta aos processos químicos convencionais de polpação (Ruiz *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2016a; Zhao *et al.*, 2009). As principais vantagens que esses compostos apresentam como solventes de pré-tratamento são a fácil recuperação por destilação e reaproveitamento e a possibilidade de recuperação seletiva da lignina em um sólido a ser precipitado após o pré-tratamento (Zhao *et*

al., 2009). No pré-tratamento com solvente orgânico (organossolv), as ligações entre lignina e hemiceluloses são quebradas, degradando a lignina e as hemiceluloses em pequenos fragmentos que ficam dissolvidos na fração líquida da reação (Zhang *et al.*, 2016a; Zhao *et al.*, 2009). A fração sólida resultante é rica em celulose e apresenta alta digestibilidade enzimática (Zhang *et al.*, 2016a). Após submeter a fração líquida resultante a um processo de precipitação, obtém-se um sólido rico em lignina enquanto que o licor resultante permanece enriquecido em hemiceluloses, separando assim a biomassa lignocelulósica em suas três principais frações constituintes (Zhang *et al.*, 2016a; Zhao *et al.*, 2009).

Uma ampla variedade de solventes orgânicos (concentrados ou em sistemas aquosos) com ou sem catalisadores tem sido utilizada para avaliar os pré-tratamentos em temperaturas que variam desde a temperatura ambiente até 240 °C (Zhang *et al.*, 2016a). Álcoois com baixos pontos de ebulição, como etanol e metanol, são os mais utilizados devido ao baixo custo e à facilidade de recuperação (Zhang *et al.*, 2016a). Álcoois de alto ponto de ebulição, como etilenoglicol e glicerol, podem ser utilizados em condições de temperatura e pressão mais brandas, porém aumentam o consumo de energia para a recuperação do solvente (Zhang *et al.*, 2016a). Ácidos orgânicos, como o ácido fórmico e o ácido acético, podem ser utilizados à pressão atmosférica, mas causam problemas de corrosão e também de acetilação da celulose (Zhang *et al.*, 2016a). A maioria dos processos com solventes orgânicos é realizada em altas temperaturas – 180-210 °C – e a adição de catalisadores ácidos aumenta a deslignificação e os rendimentos de xilose (Ruiz *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2009).

As principais desvantagens do uso destes solventes para pré-tratamento são a necessidade de recuperação dos solventes, o que aumenta o consumo de energia do processo, e a necessidade de um rigoroso controle do processo para evitar qualquer tipo de vazamento, uma vez que esses compostos apresentam alta volatilidade e alto risco de incêndio e explosão (Zhao *et al.*, 2009).

O interesse em líquidos iônicos (LIs) começou a ser significativo e crescente a partir da década de 1980, sendo que apenas na década de 1990 apareceram os primeiros relatórios sobre a síntese de líquidos iônicos estáveis em ar e água (Wilkes & Zaworotko, 1992). Considerados solventes “verdes”, atualmente os LIs têm sido estudados extensivamente graças às suas propriedades físico-químicas, como pressão de vapor desprezível, alta estabilidade térmica, baixa inflamabilidade, alta condutividade iônica, larga escala eletroquímica, líquidos em uma ampla faixa de temperatura, facilmente reciclável, capacidade de dissolver uma ampla gama de compostos orgânicos e inorgânicos de polaridade variável e são facilmente preparados a partir de reagentes comerciais e por meio de procedimentos sintéticos clássicos (Domanska & Bogel-Lukasik, 2005; Dupont *et al.*, 2000; Earle *et al.*, 2006; Smiglak *et al.*, 2006; Wasserscheid, 2006; Wasserscheid & Welton, 2003; Zhang *et al.*, 2006). Outro diferencial dos LIs em relação aos solventes clássicos é a possibilidade de moldagem destes de acordo com as necessidades da reação, através da escolha adequada do cátion e do ânion, o que permite modelar diversas propriedades físicas e químicas, como miscibilidade com água e solventes orgânicos, ponto de fusão e viscosidade (Bogel-Lukasik *et al.*, 2010; Stracke, 2008; Zakrzewska *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2006).

Os LIs possuem capacidade de dissolver grandes concentrações de sacarídeos e polímeros de carboidratos (Olivier-Bourbigou *et al.*, 2010). O mecanismo de dissolução da celulose em LIs é caracterizado pela atuação do ânion como acceptor de ligação de hidrogênio interagindo com o grupo hidroxila da celulose (Remsing *et al.*, 2008). O cátion, com o seu sistema π aromático rico em elétrons, pode ser visto como um centro de acceptor de elétrons através de interações de elétrons, e, além disso, pode evitar a reticulação da celulose (Dadi *et al.*, 2006). Interações entre celulose e os LIs e a formação dos complexos elétron doador-elétron acceptor (EDA) são possíveis se o ânion e o cátion estão localizados perto o suficiente. Assim sendo, as ligações de hidrogênio entre os monômeros glicosídicos da celulose são

interrompidas, resultando na solubilização (Feng & Chen, 2008). Tal como para a celulose, os LIs são responsáveis pelo rompimento das ligações de hidrogênio da matriz lignocelulósica, principalmente devido a ação dos ânions dos LIs (Zavrel *et al.*, 2009). Porém os cátions desempenham um papel que não deve ser negligenciado na solubilização de toda a matriz lignocelulósica. Kilpeläinen *et al.* (2007) sugerem que existem interações π - π entre o cátion dos LIs e os compostos aromáticos da lignina (Kilpeläinen *et al.*, 2007). Os LIs que tem imidazol como precursor são os mais estudados e demonstraram que tanto o cátion quanto o ânion são importantes no processamento da biomassa, sendo os cátions capazes de formar interações com a lignina que auxiliam na sua solubilização (Janesko, 2011; Kilpeläinen *et al.*, 2007).

Porém, apesar de resultados satisfatórios comprovados com a utilização de líquidos iônicos, a utilização destes reagentes é limitada devido ao seu alto custo, associado principalmente aos processos de síntese e purificação, sendo a recuperação dos LIs importante para a rentabilidade do processo (Morais *et al.*, 2016; Olivier-Bourbigou *et al.*, 2010).

O imidazol, até então utilizado como principal precursor de LIs e como solvente para dissolução de amido, surge como uma alternativa promissora e mais econômica que os líquidos iônicos (Jordan *et al.*, 2014; Moraes *et al.*, 2016). A utilização pioneira do imidazol como novo solvente de pré-tratamento capaz de deslignificar a biomassa lignocelulósica foi descrita por Moraes *et al.* (2016). Em seus resultados para palha de trigo os autores mostraram que a utilização do imidazol como solvente é capaz de remover de 54,5% a 91,4% da lignina inicial, aumentando a deslignificação conforme o aumento da temperatura do pré-tratamento. Os sólidos recuperados após o pré-tratamento com imidazol, ricos em celulose, apresentaram alta digestibilidade enzimática (Morais *et al.*, 2016).

O imidazol é um composto orgânico heterocíclico (Figura 8), de fórmula molecular $C_3H_4N_2$, sólido a temperatura ambiente, solúvel em água e fácil de manusear e reciclar

(Morais *et al.*, 2016). Possui ponto de fusão entre 88,3–89,9 °C, ponto de ebulição entre 267,8–268,1 °C a 1013,3 hPa, e pressão de vapor de 0,00327 hPa a 25 °C (OECD, 2003). O imidazol apresenta potencial para a formação de ligações de hidrogênio sendo amplamente utilizado na indústria química como intermediário na produção de produtos farmacêuticos, pesticidas, corantes intermediários, auxiliares para tingimento e acabamento de tecidos, produtos químicos fotográficos e inibidores de corrosão (Domańska *et al.*, 2002; OECD, 2003).

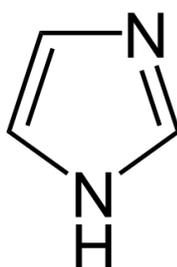


Figura 8. Fórmula estrutural do imidazol (Domanska *et al.*, 2002).

2.2.1.2 Pré-tratamentos hidrotérmicos e a utilização de CO₂ supercrítico como catalisador

O trabalho realizado por Bobleter *et al.* em 1976 foi o pioneiro na utilização de água para pré-tratar a biomassa lignocelulósica de modo a deixá-la mais susceptível a hidrólise enzimática (Ruiz *et al.*, 2013). A partir de resultados prévios obtidos pelo grupo, Bobleter *et al.* montaram um pequeno reator de 0,5 mL com o objetivo de avaliar a degradação “puramente térmica” da celulose e hemiceluloses utilizando a água como meio de extração, procedimento o qual denominaram de “processo hidrotérmico” (Bobleter *et al.*, 1976).

Atualmente o processamento hidrotérmico da biomassa lignocelulósica é considerado uma estratégia eficiente de fracionamento, uma vez que as hemiceluloses são despolimerizadas em produtos solúveis enquanto que os sólidos são enriquecidos em celulose e lignina (Ruiz *et al.*, 2013). O pré-tratamento hidrotérmico causa relocação da lignina na

superfície dos lignocelulósicos e mudanças físicas como o aumento do tamanho dos poros e da área superficial aumentando a acessibilidade das enzimas à estrutura e o potencial de hidrólise da celulose (Ruiz *et al.*, 2013). A utilização desses pré-tratamentos para a produção de etanol de segunda geração a partir da hidrólise da celulose é uma estratégia bastante enfatizada (Ruiz *et al.*, 2013). Um exemplo claro da importância e eficiência do pré-tratamento hidrotérmico é a utilização deste pela empresa Inbicon na Dinamarca, que iniciou seu processo em escala de demonstração e, segundo dados da Embrapa, possuía em 2016 uma capacidade de produção de 75,7 milhões de litros de etanol de lignocelulósicos por ano (Larsen *et al.*, 2012; Machado *et al.*, 2016).

Nos pré-tratamentos hidrotérmicos a biomassa lignocelulósica é exposta a água, no estado líquido ou gasoso ou ambos, em elevadas temperaturas e pressões (Laser *et al.*, 2002; Ruiz *et al.*, 2013). Essas condições físicas alteram as propriedades químicas da água. Temperaturas elevadas, como as utilizadas nesses pré-tratamentos na ordem de 150 a 230 °C, permitem a autoionização da água em íons H_3O^+ , que atuam como catalisadores, e íons OH^- (Garrote *et al.*, 1999; Ruiz *et al.*, 2013). Na região subcrítica da água, em temperaturas entre 100 °C e 374 °C, a constante de ionização da água (K_a) aumenta com a temperatura, ou seja, mais íons são formados e conseqüentemente maior a força ácida da água (Ruiz *et al.*, 2013). Como efeito disso, o $\text{p}K_a$ da água, que é inversamente proporcional ao K_a , diminui e o seu pH também, obtendo-se, por exemplo, na temperatura de 200 °C um pH de aproximadamente 5,0 (Mosier *et al.*, 2005). Com essas alterações, a água e seus produtos de ionização são capazes de penetrar na estrutura celular da biomassa, hidratar a celulose e clivar as ligações éter e éster favorecendo a hidrólise das hemiceluloses, em oligômeros e monômeros, e sua dissolução no meio líquido (Garrote *et al.*, 1999; Gupta & Demirbas, 2010; Ruiz *et al.*, 2013). A hidrólise das hemiceluloses leva a formação de ácidos orgânicos como o ácido acético a partir dos grupos acetil e o ácido urônico, que contribuem para a acidificação do meio (Girio *et al.*,

2010; Mosier *et al.*, 2005; Ruiz *et al.*, 2013). A liberação destes ácidos contribui para catalisar a formação de oligossacarídeos e sua hidrólise a açúcares monoméricos; porém, em condições mais severas, também favorecem a degradação destes a ácidos alifáticos e aldeídos de furanos capazes de inibir a fermentação dos açúcares gerados (Jonsson *et al.*, 2013; Mosier *et al.*, 2005).

Variáveis operacionais como a temperatura, o tempo de residência, a granulometria da biomassa, a razão líquido/sólido e o pH influenciam no fracionamento dos lignocelulósicos e devem ser considerados para maximizar o rendimento dos pré-tratamentos hidrotérmicos (Ruiz *et al.*, 2013). Em temperaturas variando de 120 °C a 200 °C a água remove as hemiceluloses do material lignocelulósico através de uma combinação de dissolução e auto-hidrólise, sendo que estas podem ser parcial ou completamente removidas (Mosier *et al.*, 2005; Weil *et al.*, 1994). As hemiceluloses são decompostas em produtos solúveis valiosos como oligossacarídeos, monossacarídeos, produtos de degradação dos açúcares como furfural e 5-HMF, ácido acético (Ruiz *et al.*, 2013). Nas temperaturas na faixa de 180 a 220 °C, em curtos períodos de reação, além da dissolução das hemiceluloses em água, diferentes quantidades de lignina podem ser extraídas (de 35 a 60% do total de lignina) (Bobleter, 1994; Mosier *et al.*, 2005). Durante o processamento hidrotérmico a lignina e as ligações lignina-hemiceluloses podem sofrer degradação, despolimerização parcial e relocação (Ruiz *et al.*, 2013). A solubilização da lignina envolve a quebra das ligações lignina-carboidrato e as reações de despolimerização, sendo a fração de lignina solubilizada dependente das condições operacionais e da matéria-prima (Garrote *et al.*, 1999; Wörmeyer *et al.*, 2011). Ainda, com o aumento do tempo e da temperatura de reação, o grau de polimerização da celulose pode diminuir, podendo-se ter uma perda de até 22% do total de celulose presente (Bobleter, 1994; Mosier *et al.*, 2005).

Entre as principais vantagens dos pré-tratamentos hidrotérmicos pode-se destacar o fato de não ser necessária a adição e a recuperação de qualquer outro produto químico diferente de água, o que faz com que o processo tenha baixo problema de corrosão, reduzindo custos operacionais e de capital, além de ser mais favorável ao meio ambiente (Girio *et al.*, 2010; Ruiz *et al.*, 2013). Adicionalmente, a utilização de um catalisador ácido mesmo que em pequenas quantidades pode favorecer a hidrólise da biomassa durante o pré-tratamento (Montipó *et al.*, 2018). Para Montipó *et al.* (2018), a concentração de 1% de H₂SO₄ foi suficiente para aumentar a hidrólise no pré-tratamento do capim-elefante por explosão a vapor, resultando num licor contendo 19,64 g.L⁻¹ de xilose (oligômeros e monômeros), enquanto que o pré-tratamento realizado sem a utilização do ácido resultou em um licor contendo apenas 2,99 g.L⁻¹ de xilose total (oligômeros e monômeros).

A utilização de dióxido de carbono (CO₂) como um catalisador dos pré-tratamentos hidrotérmicos surge como uma opção mais favorável ao meio-ambiente e ao processo como um todo, uma vez que, apesar de propiciar a formação de ácido carbônico, não apresenta as desvantagens típicas observadas na utilização de ácido sulfúrico (Morais *et al.*, 2015). O CO₂ é um reagente barato, amplamente disponível, atóxico e não apresenta riscos de contaminação ao produto (Clark *et al.*, 2009; Moraes *et al.*, 2015). Além disso, o CO₂ necessita de menor quantidade de energia quando comparado com outros solventes para atingir a condição de fluido supercrítico uma vez que essa condição é atingida na temperatura de 31,1 °C e pressão de 73,8 bar (Morais *et al.*, 2015; Sheldon, 2005). O CO₂ como um composto apolar apresenta-se como um bom e seletivo solvente para materiais apolares, apresentando características favoráveis a sua utilização como solvente de monômeros, com rápida impregnação na estrutura de materiais lignocelulósicos (Morais *et al.*, 2015). Em conjunto com a água o CO₂ age como um catalisador que em condições supercríticas leva a altas difusividades e promove o intumescimento da biomassa. O sistema binário H₂O/CO₂ leva a formação de ácido

carbônico que se dissocia em duas etapas: na primeira se dissociando em HCO_3^- e H_3O^+ e na segunda dissociando o HCO_3^- em CO_3^{2-} e H_3O^+ (Morais *et al.*, 2015). Quando ocorre a formação do ácido carbônico observa-se um aumento na concentração de íons hidrônio devido à dissociação do ácido, contribuindo para a redução do pH do meio reacional. Dessa forma, a utilização do CO_2 supercrítico catalisa a dissolução da biomassa lignocelulósica, ajudando a promover a dissolução e hidrólise das hemiceluloses em seus açúcares constituintes e contribuindo ainda para o aumento da digestibilidade enzimática da celulose (Morais *et al.*, 2015). Uma vez concluída a reação, ao resfriar-se e despressurizar-se o reator, remove-se o CO_2 presente e o pH da solução volta a aumentar (Morais *et al.*, 2015).

Trabalhos utilizando CO_2 supercrítico e água como meio de pré-tratamento da palha de trigo mostram um aumento na concentração de xilose, tanto na forma monomérica quanto como oligossacarídeo, no licor resultante da reação (Magalhães da Silva *et al.*, 2014; Morais *et al.*, 2014). Esses autores observaram ainda que o aumento da temperatura, e conseqüente aumento da severidade da reação, provoca o aumento na concentração de xilose e xilo-oligossacarídeo na solução e também o aumento na digestibilidade enzimática da celulose (Magalhães da Silva *et al.*, 2014; Morais *et al.*, 2014).

2.2.2 Hidrólise enzimática

Para serem submetidos à conversão em produtos por fermentação, os açúcares constituintes da biomassa lignocelulósica precisam ser hidrolisados a açúcares simples que possam ser metabolizados pelos microrganismos desejados. A reação de hidrólise (1) pode ser catalisada por duas vias principais: a via química, utilizando principalmente ácidos, diluídos ou concentrados, e a via bioquímica, utilizando enzimas (Balat, 2011; Balat *et al.*, 2008). Balat *et al.* sugerem ainda a possibilidade de hidrólise da biomassa lignocelulósica utilizando irradiação de raios gama ou feixe de elétrons e irradiação micro-ondas, porém essas

metodologias não são usualmente abordadas para a hidrólise da celulose e hemiceluloses (Balat, 2011; Balat *et al.*, 2008).



A hidrólise ácida é uma das tecnologias mais antigas e aplicadas para a conversão de lignocelulose em açúcares fermentescíveis, sendo inclusive referenciada como técnica convencional (Balat & Balat, 2009; Haldar *et al.*, 2016). Para a hidrólise ácida, o ácido sulfúrico (H_2SO_4) é o ácido mais utilizado devido ao seu baixo custo e grande disponibilidade, porém outros ácidos também podem ser utilizados, como o clorídrico, sulfuroso, fluorídrico e nítrico (Haldar *et al.*, 2016). Existem dois tipos básicos de processos de hidrólise ácida comumente utilizados, a hidrólise com ácido diluído, a altas temperaturas (200 – 240 °C), e com ácido concentrado, em temperaturas mais brandas (Balat & Balat, 2009; El-Zawawy *et al.*, 2011; Haldar *et al.*, 2016). Apesar de efetivas, as hidrólises ácidas apresentam grandes desvantagens, como a degradação dos monossacarídeos, o que reduz a recuperação dos açúcares com a formação de compostos capazes de inibir os processos de fermentação, e a corrosão dos equipamentos, sendo necessário alto investimento em reatores de materiais não corroíveis (Haldar *et al.*, 2016; Larsson *et al.*, 2000).

Diante dos problemas apresentados pela hidrólise ácida, a hidrólise enzimática é considerada a opção mais adequada para a obtenção de açúcares fermentescíveis a partir da biomassa lignocelulósica. Essa consideração é baseada principalmente no fato da hidrólise enzimática ser um processo específico para cada substrato, não provocando a degradação dos açúcares hidrolisados, e ser conduzida em condições mais brandas com temperaturas variando normalmente entre 45 e 50 °C, o que propicia a diminuição dos custos totais, economizando energia para o aquecimento e, também na manutenção dos equipamentos por não proporcionar problemas com corrosão (Balat *et al.*, 2008; El-Zawawy *et al.*, 2011; Howard *et al.*, 2004). O principal custo da hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos são as

enzimas. Para resolver este problema, faz-se necessário desenvolver estudos buscando o entendimento dos mecanismos das enzimas, das interações entre estas e as proporções de aplicação, visando o desenvolvimento de coquetéis enzimáticos eficientes e econômicos, bem como o desenvolvimento de processos de fermentação e a utilização de substratos alternativos para baixar os custos de produção dessas enzimas (Banerjee *et al.*, 2010).

As celulasas são enzimas que constituem um complexo enzimático capaz de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise e são consideradas como uma ferramenta em potencial para sacarificação industrial de biomassa (Castro & Pereira Jr, 2010; Singh *et al.*, 2009). Essas enzimas são biocatalisadores altamente específicos e sensíveis a mudanças de pH e de temperatura que atuam em sinergia para a liberação de açúcares, sendo entre estes a glicose a unidade que desperta maior interesse industrial, devido à possibilidade de sua conversão em etanol (Castro & Pereira Jr, 2010). As enzimas do complexo celulolítico são hidrolases que clivam ligações glicosídicas. Devido a sua ação hidrolítica, as celulasas atacam diretamente a estrutura da celulose, causando perda de massa e diminuindo seu grau de polimerização.

Conforme os métodos de separação de moléculas e os estudos sobre a ação dos componentes das celulasas têm mostrado, o complexo enzimático das celulasas caracteriza-se como um conjunto de três enzimas hidrolíticas: endo- β -1,4-glucanases (EC 3.2.1.4); exo- β -1,4-glucanases (EC 3.2.1.91); e β -1,4-glucosidases (EC 3.2.1.21) (Castro & Pereira Jr, 2010; Dillon, 2004; Dillon *et al.*, 2008; Medve, 1997). As endoglucanases hidrolisam as ligações glicosídicas aleatoriamente em vários locais internos nas regiões amorfas da fibra de celulose abrindo esses locais para a subsequente ação das exoglucanases (Dillon, 2004). As exoglucanases, ou celobiohidrolases, são o principal componente do sistema de celulasas de fungos contabilizando de 40-70 % do total de proteínas capazes de hidrolisar a celulose altamente cristalina (Howard *et al.*, 2004). As exoglucanases agem nas extremidades

reductoras e não reductoras geradas pela ação das endoglucanases liberando principalmente celobiose (Dillon, 2004). As β -glucosidases hidrolisam a celobiose e oligossacarídeos solúveis à glicose (Dillon, 2004; Howard *et al.*, 2004). Essas enzimas atuam de forma sinérgica na hidrólise da celulose, apresentando assim um rendimento melhor do que a soma dos rendimentos individuais, ou seja, quando atuam isoladas umas das outras (Dillon, 2004).

As celulasas são encontradas em secreções de microrganismos, como fungos e bactérias, e estão presentes também no sistema digestório de algumas espécies de gastrópodes (Kubicek *et al.*, 1993; Rolle, 1998). *Trichoderma reesei* e seus mutantes são amplamente utilizados para a produção comercial de celulasas e hemicelulasas. Isto se dá, em parte porque o *T. reesei* foi um dos primeiros organismos celulolíticos isolados, ainda na década de 1950, e serviu de organismo modelo para os estudos de celulasas. De certa forma, esse fato influenciou os processos de produção industrial de celulasas para que fossem desenvolvidos com este organismo ao longo dos anos em vários países (Howard *et al.*, 2004). O complexo enzimático do *T. reesei* contém grande quantidade de endoglucanases e exoglucanases que correspondem a aproximadamente 80% do total de proteínas secretadas, porém sua atividade de β -glucosidase é muito baixa (Martins *et al.*, 2008).

Os complexos de celulasas secretadas por fungos do gênero *Penicillium* são conhecidos por exibir as atividades relativamente elevadas de β -glucosidases (Martins *et al.*, 2008). Singh *et al.* (2009), após a triagem de um grande número de culturas, selecionou uma linhagem *Penicillium* como uma fonte de celulasas com alta atividade de β -glucosidase. Os autores relatam uma comparação do desempenho da hidrólise utilizando celulasas de *Penicillium* e uma celulase comercial (Accellerase™ 1000®) a partir do *Trichoderma reesei* geneticamente modificado. Em virtude da atividade de β -glucosidase alta no complexo de celulasas do *Penicillium*, a hidrólise rendeu maior proporção de glicose como o principal produto final. *Penicillium echinulatum* tem sido caracterizado como um fungo promissor para

a produção de celulases porque a sua capacidade secretora é quase equivalente as melhores estirpes de fungos reportados na literatura (Camassola & Dillon, 2010; Dillon *et al.*, 2011; Dillon *et al.*, 1992; Dillon *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2013). O complexo enzimático das celulases secretadas pelo *P. echinulatum* apresenta maior atividade em pH ácido, estabilidade de 50°C, maior proporção de β -glucosidase e FPA que o *T. reesei* (Camassola *et al.*, 2004; Martins *et al.*, 2008).

P. echinulatum apresenta produção simultânea de celulases e xilanases, condições que favorecem a hidrólise enzimática de lignocelulósicos (Camassola & Dillon, 2010). As xilanases são um grupo de enzimas capazes de hidrolisar as xilanas, as quais são um dos principais constituintes das hemiceluloses e desempenham um importante papel na integridade estrutural das paredes celulares através da realização de ligações covalentes e não covalentes (Girio *et al.*, 2010; Saha, 2003). As xilanases microbianas incluem principalmente endo- β -1,4-xilanase, que cliva o esqueleto da xilana produzindo xilo-oligossacarídeos, e β -xilosidase, que hidrolisa os xilo-oligossacarídeos e a xilobiase liberando xilose (Michelin *et al.*, 2012).

Celulases e xilanases são enzimas glicosil hidrolases (GHs), também conhecidas como hidrolases glicolíticas, responsáveis pela hidrólise e/ou rearranjo de ligações glicosídicas, resultando na degradação dos polissacarídeos contidos nas paredes celulares dos vegetais. Porém, além delas, outras enzimas e proteínas que também apresentam atividade sobre polissacarídeos auxiliam nas modificações destes e são chamadas de enzimas acessórias. Entre as enzimas e proteínas acessórias, podem-se citar as transferases sacarídicas (xiloglicano transferase), as expansinas (swoleninas) e as feruloil esterases (corboxilesterases). A swolenina, também identificada no secretona do *P.echinulatum*, se destaca entre as enzimas acessórias por ser caracterizada como uma proteína relacionada à expansina das plantas e, como esta proteína, é capaz de afrouxar a parede celular pelo

enfraquecimento das ligações de hidrogênio e assim auxiliar na degradação enzimática da biomassa lignocelulósica (Ribeiro *et al.*, 2012; Saloheimo *et al.*, 2002). A swolenina apresenta forte sinergismo com as enzimas de degradação da xilana e desta forma enfraquece a estrutura lignocelulósica facilitando principalmente a hidrólise enzimática da xilana e, conseqüentemente, aumenta o acesso das enzimas à celulose, porém sozinha esta proteína resulta em baixos níveis de liberação de monômeros e oligômeros, o que faz dela uma enzima acessória (Gourlay *et al.*, 2013).

2.3 Biorrefinarias

Conforme comentado em diversos trechos nas seções anteriores, após o pré-tratamento e hidrólise, obtém-se diferentes frações oriundas dos constituintes da biomassa lignocelulósica. A celulose, por exemplo, pode ser hidrolisada principalmente a oligossacarídeos e monossacarídeos de glicose que, conforme a severidade das condições de processamento, podem ser degradados a compostos como 5-HMF e ácidos orgânicos como o levulínico e o fórmico. Já as hemiceluloses, que são formadas, entre outros compostos, por variadas hexoses e pentoses, podem ser hidrolisadas a oligossacarídeos e monossacarídeos dos seus açúcares constituintes, bem como produtos de degradação desses açúcares como furfural e 5-HMF, ácido acético a partir da hidrólise dos grupos acetil, e outros ácidos orgânicos provenientes da degradação dos compostos formados.

Apesar de a grande maioria dos trabalhos apresentar estudos com biomassa lignocelulósica visando à produção de etanol ou outros biocombustíveis, uma grande variedade de produtos pode ser obtida utilizando esse tipo de material como matéria-prima. Muitos dos produtos de degradação citados anteriormente, que normalmente são indesejados para obtenção de etanol devido ao potencial de inibição das etapas de hidrólise enzimática e fermentação, são produtos químicos que apresentam valor comercial.

A diversidade de produtos que pode ser produzida está diretamente relacionada aos componentes da biomassa lignocelulósica e também a variação existente em cada espécie. Geralmente, a produção de determinado produto está relacionada à conversão de um ou uma parte dos constituintes da biomassa lignocelulósica, sendo o restante da estrutura considerado um resíduo deste processamento. Porém, todas as partes da planta, conforme o processamento a que são submetidas, podem levar a formação de produtos de interesse comercial. Tendo ciência dessa possibilidade, chega-se ao conceito de biorrefinaria que foi introduzido inicialmente no final da década de 1990 e para o qual existem diversos enunciados, todos eles conduzidos no mesmo sentido (Maity, 2015). Segundo reportado por Maity (2015) por exemplo, para o Laboratório Nacional Americano de Energia Renovável (NREL) a definição de biorrefinaria é “uma instalação que integra processos e equipamentos de conversão de biomassa para produzir combustíveis, energia e produtos químicos a partir da biomassa” (Maity, 2015).

O conceito de biorrefinaria é baseado no atual modo de operação das refinarias de petróleo que realizando diversos procedimentos sequenciais levam a obtenção de um amplo leque de produtos químicos e combustíveis. A partir disto, objetiva-se integrar processos que possam originar produtos a partir de um completo aproveitamento da matéria-prima, de modo a gerar a mínima quantidade possível de rejeitos com máximo aproveitamento de gastos energéticos, tornando o processo sustentável econômica e ambientalmente. Esses conceitos são as bases que fundamentam as duas principais metas de uma biorrefinaria, a primeira é uma meta de base energética de substituir a dependência do petróleo pela utilização de matérias-primas renováveis, a segunda meta tem base econômica de estabelecer uma robusta indústria de base renovável (Bozell & Petersen, 2010). A produção exclusiva de biocombustíveis como etanol, biodiesel e butanol apresenta uma barreira significativa para a sustentação da meta econômica de uma biorrefinaria (Bozell & Petersen, 2010). Isto ocorre

porque, apesar de ser utilizado em enormes quantidades, o combustível é um produto de baixo valor, que não apresenta o retorno necessário sobre os investimentos em operações de produção (Bozell & Petersen, 2010). Essa demanda pode ser sanada, por exemplo, pela produção associada de produtos químicos de alto valor, mesmo que produzidos em menores volumes (Bozell & Petersen, 2010).

Os materiais lignocelulósicos ocupam lugar de destaque dentro do conceito de biorrefinaria, sendo que depois de fracionados servem de base para a produção de biocombustíveis e uma infinidade de produtos químicos, alimentícios, farmacológicos, entre outros. Para tal fim diversos exemplos de combinação de processos e produtos podem ser apresentados.

Muitos produtos de alto valor podem ser obtidos diretamente na etapa de pré-tratamento, conforme as condições operacionais utilizadas. Um exemplo disto é a obtenção de oligossacarídeos na fração líquida provenientes dos pré-tratamentos hidrotérmicos, com ou sem o uso de catalisadores. Entre estes oligossacarídeos, os xilo-oligossacarídeos (XOS) são uma possibilidade de produto comercial que possui diversas aplicações (Figura 9), principalmente na indústria alimentícia e farmacêutica. Os XOS se destacam por possuírem características físico-químicas favoráveis, como resistência ao calor, estabilidade em condições ácidas e baixo valor calórico (Vazquez *et al.*, 2000).

Entre todas as possibilidades e aplicações cabíveis aos XOS, o mercado com maior potencial de desenvolvimento é no ramo alimentício. Neste ramo, os XOS apresentam inúmeras vantagens, quando comparados com os outros oligossacarídeos em termos de estabilidade e efeitos à saúde, como o estímulo ao crescimento de probióticos (principalmente *Lactobacillus* sp. e *Bifidobacterium bifidum*), juntamente à inibição do crescimento de microrganismos patogênicos, promovendo uma série de benefícios ao organismo (Ragagnin de Menezes & Durrant, 2008).

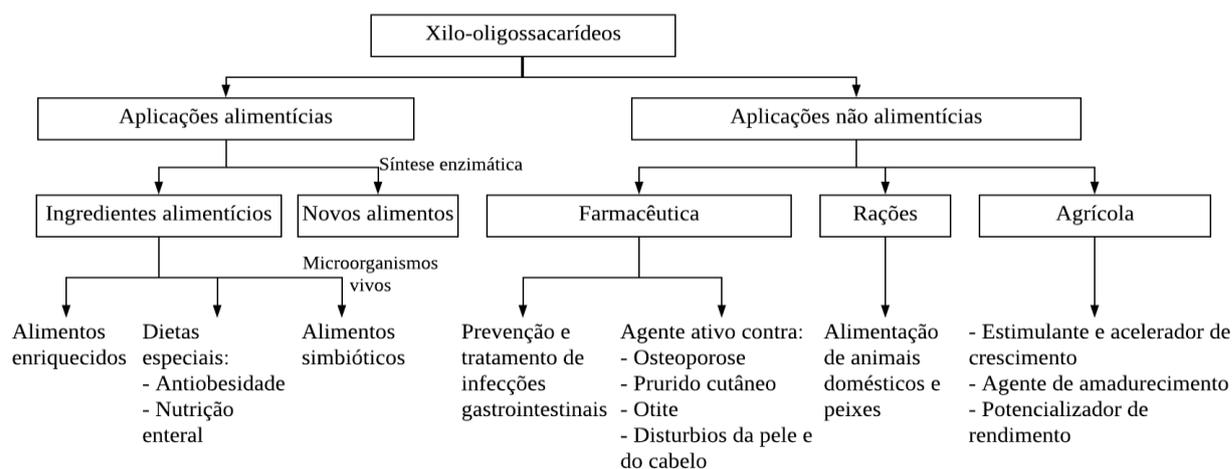


Figura 9. Aplicações dos xilo-oligossacarídeos (adaptada de Vázquez *et al.*, 2000).

Outro exemplo de produto que pode ser obtido diretamente do processo de pré-tratamento é o ácido levulínico, que pode ser obtido principalmente pela hidratação do 5-HMF proveniente de hexoses (Choi *et al.*, 2015). O ácido levulínico é um dos principais produtos químicos selecionados como blocos de construção pelo Departamento de Energia dos Estados Unidos, estando incluso tanto no relatório de 2004 quanto na revisão deste documento realizada em 2010 (Bozell & Petersen, 2010; Choi *et al.*, 2015; Werpy & Petersen, 2004). Essa importância se dá devido às diversas possibilidades de aplicações do ácido levulínico, incluindo produtos farmacêuticos, plastificantes, aditivos de combustíveis, entre outros (Choi *et al.*, 2015; Rodrigues, 2011). Alguns dos intermediários valiosos que podem ser produzidos a partir do ácido levulínico estão apresentados na Figura 10 (Rodrigues, 2011). Um dos principais intermediários químicos do ácido levulínico é a γ -valerolactona, produzida pela hidrogenação do ácido levulínico (Choi *et al.*, 2015). Além de ser um potencial aditivo para a gasolina, a γ -valerolactona serve de plataforma para a produção de outros derivados como 1,4-pentadiol, 2-metiltetraidrofurano e diferentes alcanos (Choi *et al.*, 2015).

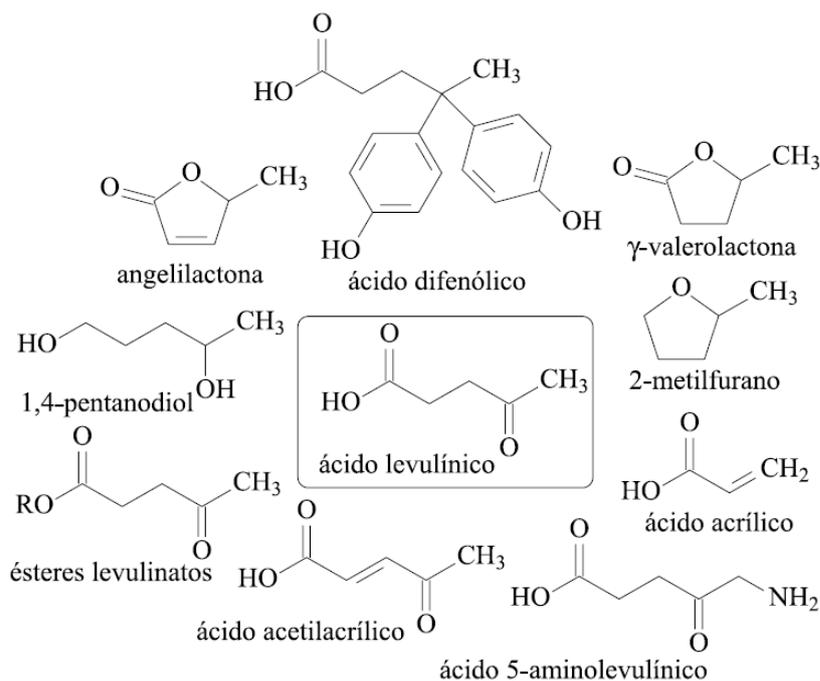


Figura 10. Intermediários químicos que podem ser obtidos a partir do ácido levulínico (extraída de Rodrigues, 2011).

O relatório de 2004 do Departamento de Energia dos Estados Unidos apresentou uma lista de doze principais blocos de construção de base biológica que podem ser utilizados para obtenção de vários outros produtos químicos ou materiais de alto valor agregado (Kamm & Kamm, 2007; Werpy & Petersen, 2004). Os quatorze produtos químicos englobados entre os doze blocos de construção selecionados podem ser obtidos a partir de açúcares por meio de conversões químicas e biológicas (Kamm & Kamm, 2007). Fazem parte destes blocos produtos como o xilitol, o sorbitol, o glicerol e diversos ácidos orgânicos (Kamm & Kamm, 2007; Rodrigues, 2011; Werpy & Petersen, 2004). Alguns produtos como o etanol e o ácido láctico foram omitidos da lista proposta em 2004 por terem sido considerados produtos em estado avançado de desenvolvimento e utilização (Rodrigues, 2011). Porém uma revisão deste relatório feita no ano de 2010 incluiu tanto o etanol como o ácido láctico como promissores blocos de construção (Bozell & Petersen, 2010). A revisão descreveu um grupo de quinze estruturas principais que podem ser produzidas a partir de carboidratos de biorrefinaria, apesar

de coloquialmente o relatório ser conhecido como “Top 10” (Bozell & Petersen, 2010). O novo relatório também fez a inclusão dos furanos provenientes da degradação de hexoses e pentoses, o 5-HMF e o furfural, descritos nas seções 2.1.1.1 e 2.1.1.2, respectivamente.

Montipó *et al.* (2018) apresentaram um exemplo de processo integrado para a produção de etanol e ácido láctico a partir de capim-elefante pré-tratado por explosão a vapor, no qual o conteúdo sólido recuperado após o pré-tratamento foi destinado à hidrólise e fermentação para obtenção de etanol enquanto que o licor de pré-tratamento rico em pentoses e hexoses foi destinado à fermentação para produção de ácido láctico. Apesar da grande maioria do etanol produzido ser utilizada como combustível, o etanol pode ser convertido em diversos produtos através diferentes reações químicas (Choi *et al.*, 2015). Por exemplo, a desidratação do etanol leva a formação de etileno, que pode ser utilizado para produção de diversos polímeros como o polietileno (PE), o PET, o polivinilacetato (PVA), o polivinilcloreto (PVC), entre outros (Choi *et al.*, 2015). O ácido láctico por sua vez é um produto químico de grande demanda global, com uma taxa de crescimento anual média de 10% (de Jong *et al.*, 2012). O ácido láctico possui aplicações clássicas no setor de alimentos e bebidas como conservante e para o ajuste de pH, bem como é utilizado nas indústrias farmacêutica e química como solvente e para a produção de lactato (de Jong *et al.*, 2012). O ácido láctico também é utilizado como ingrediente em produtos de higiene pessoal devido suas propriedades de hidratação, regulação de pH e auxílio no clareamento da pele (de Jong *et al.*, 2012). Porém as grandes taxas de crescimento de demanda previstas tem como base principal a utilização do ácido láctico na produção de polímeros biodegradáveis (de Jong *et al.*, 2012). O ácido polilático (PLA) é um polímero biodegradável proveniente do ácido láctico e atualmente é utilizado em diversos tipos de embalagens alimentares, filmes e sacos de lixo, assim como em fibras para roupas, tapetes e aplicações industriais (de Jong *et al.*, 2012).

A lignina por sua vez, apesar de ser geralmente destinada a queima para produção de energia, é o único dos três principais constituintes da biomassa lignocelulósica que possui anéis aromáticos, podendo ser utilizada para obtenção de um grande número de produtos (de Jong *et al.*, 2012; Holladay *et al.*, 2007; Schuchardt *et al.*, 2001). Alguns exemplos destes produtos que podem ser obtidos a partir da lignina são apresentados na Figura 11 (De Bhowmick *et al.*, 2017; de Jong *et al.*, 2012; Holladay *et al.*, 2007; Schuchardt *et al.*, 2001).

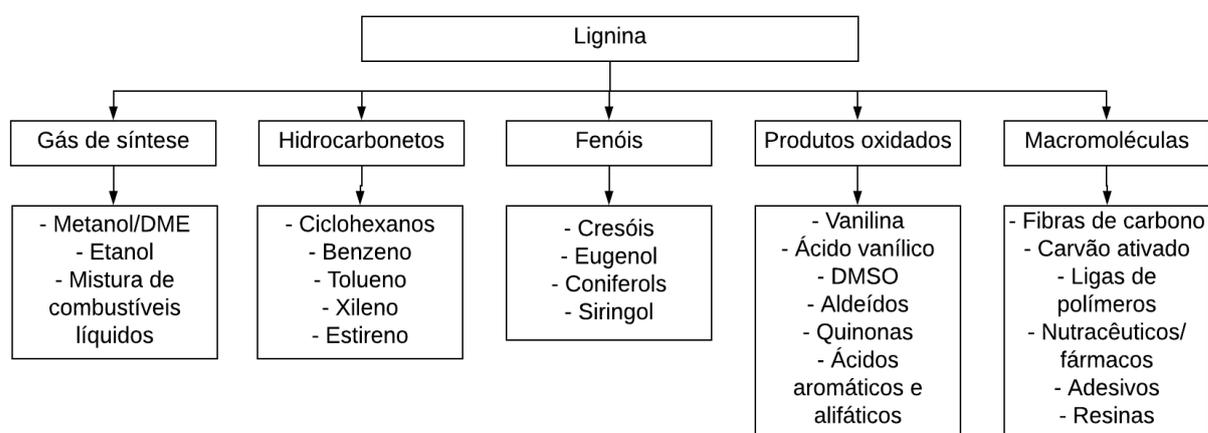


Figura 11. Exemplos de produtos que podem ser obtidos a partir da lignina (adaptado de De Bhowmick *et al.*, 2017; de Jong *et al.*, 2012; Holladay *et al.*, 2007; Schuchardt *et al.*, 2001)

3. MATERIAL E MÉTODOS

A descrição dos materiais e das metodologias utilizadas para a realização do trabalho experimental é apresentada no decorrer do Capítulo 4 como parte integrante da construção de três artigos científicos que compilam os resultados e a discussão desta tese. Porém, de modo a complementar a descrição das etapas desenvolvidas e também para introduzir e facilitar o entendimento do escopo geral do trabalho, as Figuras 12 e 13 apresentam fluxogramas dos procedimentos experimentais idealizados para atender os objetivos propostos e possibilitar uma melhor avaliação para a proposição de uma combinação sequencial de pré-tratamentos capaz de maximizar o fracionamento do capim-elefante.

A Figura 12 apresenta uma visão geral da metodologia utilizada na realização dos pré-tratamentos de alta pressão utilizando H_2O e CO_2 , empregados para o capim-elefante e o bagaço de cana-de-açúcar, para avaliar os efeitos desse pré-tratamento e as diferenças de resultados decorrentes das diferenças de composição de ambas as biomassas utilizadas.

A estrutura experimental utilizada para a realização dos pré-tratamentos com imidazol a fim de atender o terceiro e quarto itens dos objetivos específicos deste trabalho é apresentada na Figura 13. Os pré-tratamentos com imidazol seguiram um planejamento experimental do tipo delineamento composto central rotacional, com uma repetição no ponto central.

Os principais passos das análises realizadas para a caracterização da composição das frações sólidas obtidas são apresentados na Figura 14. Esta mesma metodologia também foi utilizada para caracterizar as biomassas lignocelulósicas sem pré-tratamento.

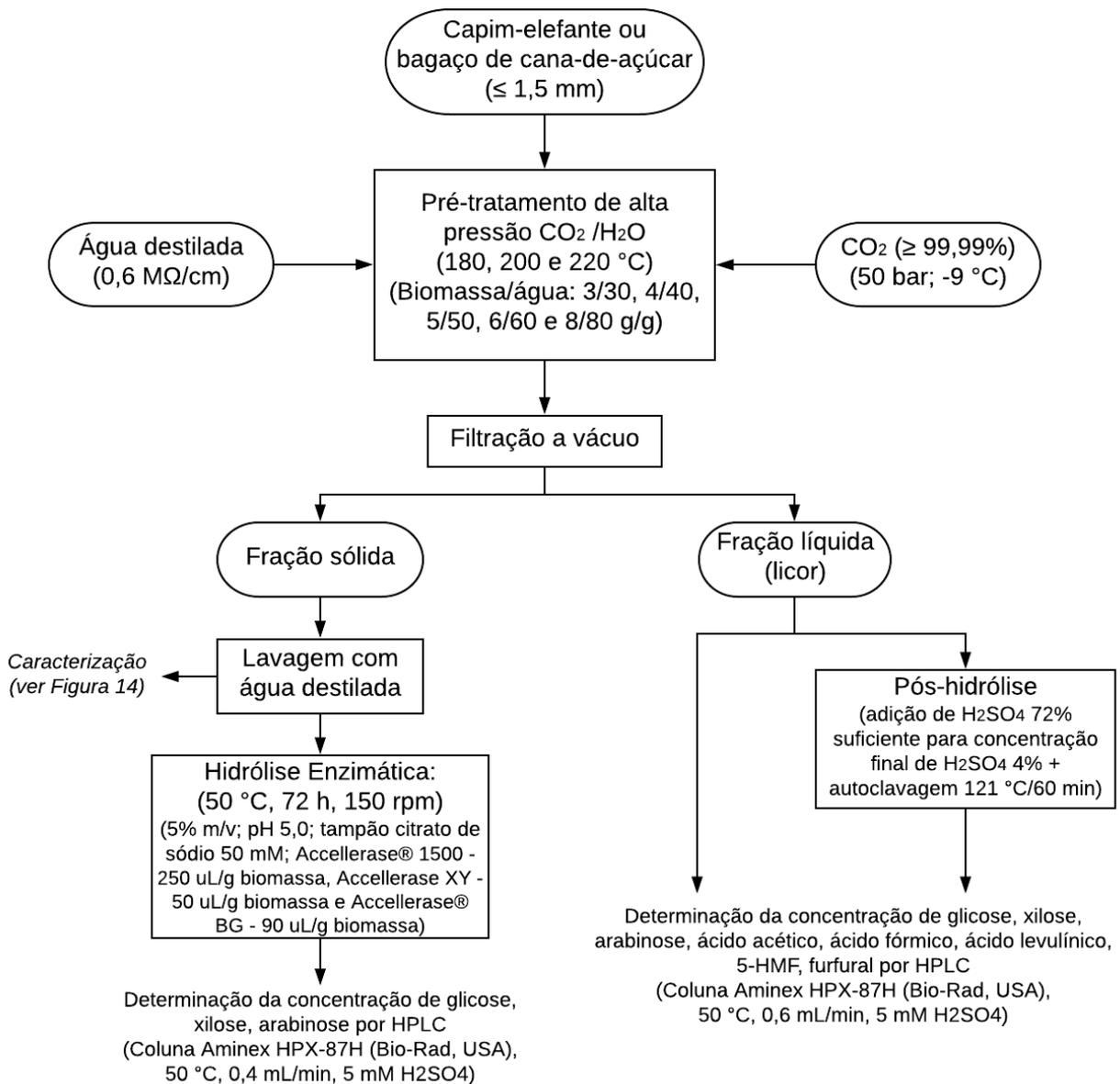


Figura 12. Fluxograma experimental do pré-tratamento de alta pressão utilizando H₂O e CO₂ e da caracterização dos produtos

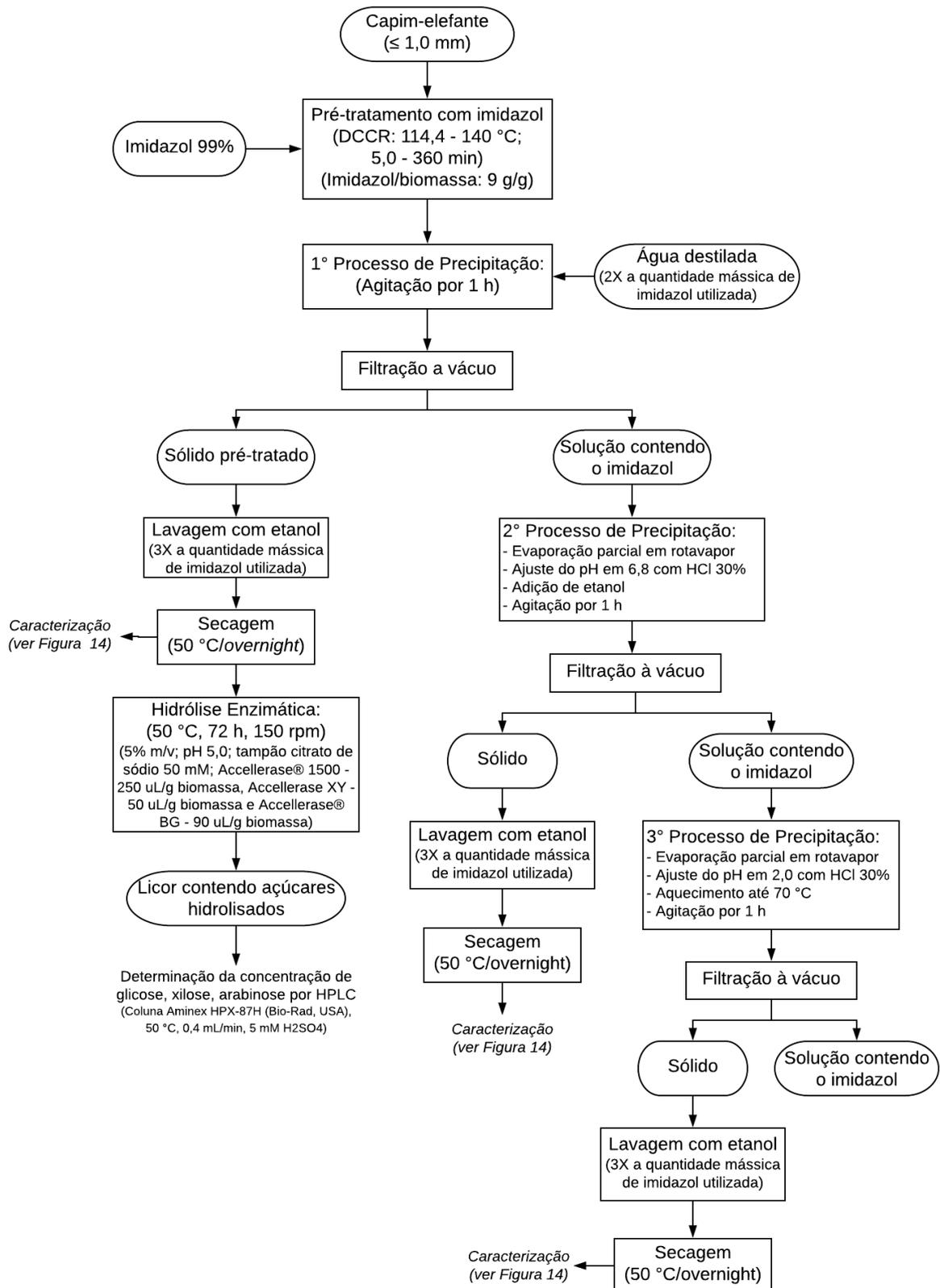


Figura 13. Fluxograma experimental do pré-tratamento com imidazol e da caracterização dos produtos.

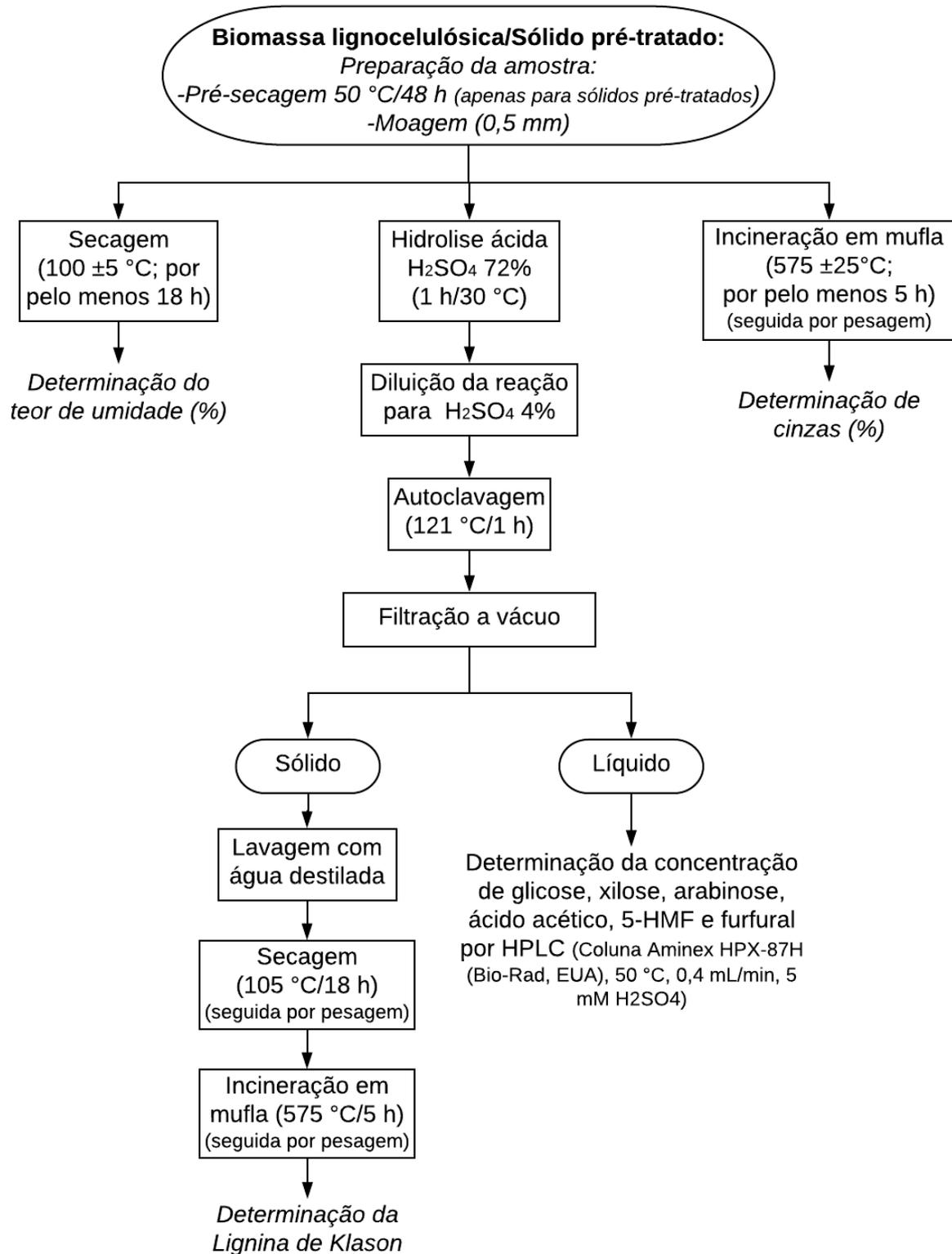


Figura 14. Fluxograma da caracterização básica da composição das biomassas com e sem pré-tratamentos realizada em todas as amostras sólidas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O capítulo 4 está dividido em três artigos seguidos por uma discussão geral dos resultados. O primeiro artigo apresenta uma avaliação dos efeitos dos pré-tratamentos de alta pressão utilizando H₂O e CO₂ na biomassa do capim-elefante, que foram comparados com os efeitos na biomassa de bagaço de cana-de-açúcar quando submetida às mesmas condições de pré-tratamento. Este artigo encontra-se publicado na revista *Bioresource Technology* e, por isso, apesar de estar inserido no formato de texto corrido, apresenta configurações como numeração das figuras e tabelas, abreviações e referências no formato utilizado pela revista. Com a publicação do primeiro artigo também foi publicado um arquivo eletrônico com informações de suporte (ESI). O arquivo ESI encontra-se apresentado na íntegra no Anexo I, no final deste documento.

O segundo artigo apresenta os resultados obtidos para o pré-tratamento utilizando imidazol como solvente para o fracionamento da biomassa de capim-elefante. Este trabalho apresenta um estudo de otimização para a deslignificação com a utilização de imidazol. Este segundo artigo se encontra publicado na revista *Industrial & Engineering Chemistry Research* e, assim como o primeiro artigo, está redigido conforme as configurações da revista na publicação.

O terceiro artigo apresenta uma nova proposta de pré-tratamento com a combinação de duas etapas sequenciais, a primeira constituída de um pré-tratamento hidrotérmico para a separação das hemiceluloses e, como segunda etapa, a realização de um pré-tratamento com imidazol para a deslignificação da fração sólida resultante do primeiro tratamento. Este terceiro artigo encontra-se em fase de revisão para submissão a um periódico internacional.

4.1 Artigo 1: High-pressure carbon dioxide/water pre-treatment of sugarcane bagasse and elephant grass: assessment of the effect of biomass composition on process efficiency

Bioresource Technology 224 (2017) 639–647



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Bioresource Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biortech



High-pressure carbon dioxide/water pre-treatment of sugarcane bagasse and elephant grass: Assessment of the effect of biomass composition on process efficiency



Andréia Toscan^{a,b}, Ana Rita C. Morais^{a,c}, Susana M. Paixão^a, Luís Alves^a, Jürgen Andreas^d, Marli Camassola^b, Aldo José Pinheiro Dillon^b, Rafal M. Lukasik^{a,*}

^a Unidade de Bioenergia, Laboratório Nacional de Energia e Geologia, I.P., Estrada do Paço do Lumiar 22, 1649-038 Lisboa, Portugal

^b Universidade de Caxias do Sul – Instituto de Biotecnologia, Laboratório de Enzimas e Biomassa, 95070-560 Caxias do Sul, RS, Brazil

^c LAQV/REQUIMTE, Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2829-516 Caparica, Portugal

^d Departamento de Química, Universidade Regional de Blumenau, 89030-903 Blumenau, SC, Brazil

High-pressure carbon dioxide/water pre-treatment of sugarcane bagasse and elephant grass: assessment of the effect of biomass composition on process efficiency

Andréia Toscan^{a,b}, Ana Rita C. Morais^{a,c}, Susana M. Paixão^a, Luís Alves^a, Jürgen Andreaus^d, Marli Camassola^b, Aldo José Pinheiro Dillon^b and Rafal M. Lukasik^{a*}

^a Unidade de Bioenergia, Laboratório Nacional de Energia e Geologia, I.P., Estrada do Paço do Lumiar 22, 1649-038 Lisboa, Portugal.

*e-mail: rafal.lukasik@lneg.pt; Fax: +351217163636; phone +351210924600 ext. 4224

^b Universidade de Caxias do Sul – Instituto de Biotecnologia, Laboratório de Enzimas e Biomassa, 95070-560 Caxias do Sul, RS, Brazil

^c LAQV/REQUIMTE, Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2829-516 Caparica, Portugal

^d Departamento de Química, Universidade Regional de Blumenau, 89030-903 Blumenau, SC, Brazil

Abstract

The performance of two lignocellulosic biomasses was studied in high-pressure carbon dioxide/water pre-treatment. Sugarcane bagasse and elephant grass were used to produce C₅-sugars from hemicellulose and, simultaneously, to promote cellulose digestibility for enzymatic saccharification. Different pre-treatment conditions, with combined severity factor ranging from -1.17 to -0.04, were evaluated and maximal total xylan to xylose yields of 59.2 wt.% (34.4 wt.% xylooligomers) and 46.4 wt.% (34.9 wt.% xylooligomers) were attained for sugarcane bagasse and elephant grass, respectively. Furthermore, pre-treated biomasses were

highly digestible, with glucan to glucose yields of 77.2 mol% and 72.4 mol % for sugarcane bagasse and elephant grass, respectively. High-pressure carbon dioxide/water pre-treatment provides high total C₅-sugars and glucose recovery from both lignocellulosic biomasses; however it is highly influenced by composition and intrinsic features of each biomass. The obtained results confirm this approach as an effective and greener alternative to conventional pre-treatment processes.

Keywords

Supercritical CO₂; biomass; lignocellulose; biorefinery; hydrolysis

1. Introduction

The increasing demands for energy and mitigation of environmental changes have generated a strong awareness of the use of more sustainable, renewable and alternative carbon sources. Taking into account these challenges, lignocellulosic biomass is one of the most promising renewable feedstock. Lignocelluloses are abundant and as long as do not compete with food and feed production have been considered as relevant feedstock for a wide variety of commodities including biofuels, chemicals and other valuable products within the frame of biorefinery concept (Geddes *et al.*, 2011). Lignocellulose is mainly composed of carbohydrates, *i.e.* cellulose (22-50 wt.%) and hemicelluloses (15-35 wt.%) and polyaromatic lignin (5-30 wt.%) (Huber *et al.*, 2006).

Sugarcane bagasse (SCB) and elephant grass (EG) (*Pennisetum purpureum* Schum.) are examples of plentiful and widespread lignocellulosic feedstocks (Ferreira-Leitao *et al.*, 2010; Fontoura *et al.*, 2015). However, the effective conversion of these materials into carbohydrate-derived sugars and other compounds requires a more extensive pre-treatment step, increasing the process complexity and long-term costs (Brandt *et al.*, 2010). Till today many biomass pre-treatments have been developed to effectively deconstruct the structure of

lignocellulosic biomass; however most of them are not providing an ideal economic and sustainable performance (Kumar *et al.*, 2009; Mohanram *et al.*, 2013). In an effort to explore the full potential of lignocellulosic materials, greener technologies for their processing are needed. One of the possible solutions is the processing of biomass with more sustainable solvents, *i.e.* water and CO₂. No greener and more natural solvents than these two are available, since both are non-toxic, non-flammable and inexpensive. Recently, high-pressure CO₂/H₂O biphasic mixture has been attracting growing interest for sustainable processing of lignocellulosic and starch-based biomass in the production of a wide-range of value-added products (Morais *et al.*, 2015, 2016; Relvas *et al.*, 2015a; Zetzl *et al.*, 2011). In CO₂/H₂O process, the partial dissolution of CO₂ in water produces carbonic acid *in-situ*, which due to its unstable nature dissociates increasing the concentration of hydronium ion. The resultant decrease in pH of the reaction mixture enhances the hydrolysis of the hemicellulose fraction of biomass (Morais *et al.*, 2014; Relvas *et al.*, 2015b). Additionally, this acidification does not represent an environmental problem because CO₂ is removed during the depressurisation step and the pH of the residual solution rises. Besides, the use of CO₂ is particularly interesting because it can be easily recovered and reused and does not cause corrosion problems, as encountered in industrial processes with mineral acids. Miyazawa and Funazukuri compared the hydrolysis of xylan into xylose under high-pressure CO₂/H₂O to water-only reaction, at 200 °C for 15 min (Miyazawa and Funazukuri, 2005). In water-only reaction, the final yield was approximately 5% (on a carbon weight basis), whereas in the case of high-pressure CO₂/H₂O (0.2 g of CO₂), a yield of 15% was achieved. The benefits of using high-pressure CO₂ in the processing of wheat straw (Magalhães da Silva *et al.*, 2014), sugarcane bagasse (Gurgel *et al.*, 2014), cornstalk (Pang *et al.*, 2011) and Eucalyptus chips (Zhang and Wu, 2014a) were also reported. King *et al.* explored the effect of high-pressure CO₂/H₂O mixtures at moderate temperatures and high pressures (up to 190 °C and 450 bar) in the processing of

corn stover and switchgrass (King *et al.*, 2012). Pre-treatment with high-pressure CO₂/H₂O mixture yielded only 13 wt.% less sugars than more severe mineral acid hydrolysis. Kim and Hong also compared the enzymatic digestibility of southern yellow pine (softwood) and aspen wood (hardwood), after pre-treatment with CO₂/H₂O at 165 °C, 214 bar, 30 min and moisture content of 73 wt.% (Kim and Hong, 2001). The highest theoretical sugar yields were 27.3% and 84.7% for southern yellow pine and aspen wood, respectively.

The aim of the current work was to assess, for the first time, the effect of the composition of two distinct lignocellulosic biomasses (SCB and EG) on the performance and efficiency of high-pressure CO₂/H₂O technology under various process severities (CS_{pCO_2}). Although SCB pre-treatment with CO₂/H₂O has already been studied before (Gurgel *et al.*, 2014), this is the first work reporting on the performance of high-pressure CO₂/H₂O pre-treatment of EG, and with direct comparison to the pre-treatment of SCB under the same condition. Both materials were analysed considering the efficiency of hydrolysis of the hemicellulosic fraction into C₅-sugars and enzymatic digestibility of the processed solids.

2. Material and methods

2.1. Raw materials and chemicals

SCB was kindly provided by Brazilian Bioethanol Science and Technology Laboratory (CTBE), State of São Paulo, Brazil. EG (mixture of stem and leaves) was obtained from Nova Petropolis, Rio Grande do Sul, Brazil. Prior to use, both raw materials were subject to mechanical particle size reduction in a knife mill (IKA® WERKE, MF 10 basic, Germany) to a particle size smaller than 1.5 mm and later were stored at room temperature in a closed containers. The CO₂ with a purity $\geq 99.99\%$ (w/w) used in high-pressure CO₂/H₂O experiments was bought from Air Liquide, AlphaGaz™ gamma, Paris, France. Additionally, distilled water (0.6 MΩ/cm) was produced by the PURELAB Classic Elga system. For

chemical analysis and compositional characterisation of both native and processed materials, aqueous solution of 72% (w/w) H₂SO₄ prepared from 96% (w/w) H₂SO₄ supplied by Panreac Química, Barcelona, Spain was used. For post-processing filtrations, paper filters (Ø = 150 mm, no. 1238) from Filter-Lab, Microchip Technology Inc., Arizona, USA were used. For the enzymatic saccharification, an enzyme cocktail was prepared using three commercial enzymes (Accellerase® 1500 - 250 µL/g biomass, Accellerase XY - 50 µL/g biomass and Accellerase® BG - 90 µL/g biomass), kindly provided by Genencor, DuPont Industrial Biosciences (Palo Alto, CA, USA).

2.2. Methodologies

2.2.1. High-pressure CO₂/H₂O mixture experimental set-up

All biomass processing experiments were performed in a 160 mL stainless steel high-pressure reactor (series 4655, Parr Instruments Company, Moline, IL, USA) coupled with Parr 4842 unit used to monitor and control the reaction conditions, such as temperature, pressure and stirring speed. The high-pressure CO₂/H₂O experiments were carried out at temperatures of 180 °C, 200 °C and 220 °C with a constant initial CO₂ pressure of 50 bar. Different biomass loadings of 3 g, 4 g, 5 g, 6 g and 8 g of dry biomass with fixed water/biomass ratio (w/w) of 10 were used and resulted in changes in the CO₂ charged into the high pressure reactor. Aiming to calculate the initial mixture composition, the conditions at which CO₂ was introduced into the reaction system were fixed to minimise CO₂ density variations caused by initial temperature changes. For this purpose the reactor was pressurised with CO₂ (until 50 bar of initial pressure and at a temperature of -9 °C) and reactions were started when temperature of the reaction mixture in the reactor achieved 21 °C and CO₂ pressure stabilised. Next, the reaction mixture was heated under continuous stirring until the desired temperature was achieved. Heating and pressure profiles are given in the Electronic

Supplementary Information (ESI). Once the required temperature was achieved, the reactor was cooled down using tap water to quench the reaction. When temperature of the mixture was at room temperature, the reactor was slowly depressurised. The depressurisation step was carried out at controlled temperature and flow rate to minimise losses of volatile products. The obtained liquid (liquor) and solid (processed materials) phases were separated by vacuum filtration. The recovered processed materials were washed with distilled water at room temperature and oven-dried at 50 °C for at least 48 h. The chemical analyses of both liquid and solid fractions were performed according to the procedures presented below.

2.2.2. Enzymatic hydrolysis

The washed (after water and ethanol extractives removal according to method presented elsewhere (Sluiter *et al.*, 2005b)) and unwashed dry native SCB and EG as well as dry processed solids, after being autoclaved at 121°C for 15 min, were subject to enzymatic hydrolysis experiments with a solid loading of 5% (w/v) in 4 mL total volume (sterile 50 mM sodium citrate buffer, pH 5.0, containing the enzymatic cocktail). The enzymatic saccharification was performed in 15 mL Falcon tubes, on an orbital shaker, at 50 °C and 150 rpm for 72 h. The control samples for both washed and unwashed biomasses (solids without enzyme cocktail; enzyme cocktail in buffer without biomass) were incubated under the same conditions. After the desired reaction time, the enzymatic liquors were centrifuged (15000 rpm for 15 min) and the supernatants were analysed by HPLC as described in 2.3.2 Section. The amount of glucose released (g/L) and glucan to glucose yields were calculated according to formulas described in ESI. All assays were performed in duplicate.

2.3. Chemical analyses

2.3.1. Characterisation of raw materials and recovered processed materials

The knife mill ground material was analysed to determine the moisture content using oven-drying at 100 ± 5 °C to a constant weight. Both biomasses, as well as recovered processed materials were characterised for cellulose (as glucan), xylan, arabinan and acetyl groups contents according to standard methods presented elsewhere (Browning, 1967). The monosaccharides (glucose, xylose and arabinose) and acetic acid present in hydrolysates were analysed using HPLC. The set conditions of the column (Aminex HPX-87H, Bio-Rad, USA) were: 50 °C, 0.4 mL/min flow rate with 5 mM H₂SO₄ as mobile phase. A refractive index (RI) detector was used to inspect sugars and acetic acid content. The acid insoluble residue was considered as Klason lignin after correction for acid insoluble ash, which was determined at 550 °C for 5 h (Sluiter *et al.*, 2006). The ash content in materials was established using NREL/TP-510-42622 standard method (Sluiter *et al.*, 2005a). Water and ethanol extractives were determined according to an established method (Sluiter *et al.*, 2005b). Protein quantification was carried out by Kjeldahl method using the $N \times 6.25$ conversion factor (ISO, 2014). All samples were analysed in duplicate.

2.3.2. Characterisation of liquors, post-hydrolysate and enzymatic liquors

Liquors, post-hydrolysate and enzymatic liquors were analysed using the same HPLC equipment as presented above. The set conditions of the column were as follow: 50 °C and 0.6 mL/min flow rate with 5 mM H₂SO₄ as mobile phase. A RI detector was used to examine sugars and organic acids content. For furfural (furan-2-carbaldehyde) and 5-HMF (5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde \equiv 5-hydroxymethylfurfural) analyses UV/Vis detection at 280 nm was carried out. The content of oligosaccharides in the liquors was calculated from the increase of monosaccharides' concentration after post-hydrolysis procedure (Duarte *et al.*,

2004). All samples were analysed in duplicate.

2.4. Error analysis

Standard uncertainty (u) was determined for all obtained results. Each weighing was made considering a $u(m) = 0.1$ mg. All pre-treatments were made with a $u(T) = 1$ °C and a $u(p) = 1$ bar. All experimental errors related to measurements described above pertain solely to the calibration technique used to quantify the concentrations of products and an arbitrary error of 10% of measured value was determined for all analyses.

The macromolecular composition of processed solids and the results of enzymatic hydrolysis are presented in the corresponding figures with standard deviation of each data.

3. Results and Discussion

3.1 Chemical characterisation of sugarcane bagasse and elephant grass

The lignocellulosic biomass composition depends on species, location and cultivation conditions; hence it is indispensable to relate process performance to actual composition of examined raw materials. The macromolecular compositions of both raw materials are listed in Table 1. The moisture content of SCB and EG was determined as 6.1 ± 0.1 and 7.1 ± 0.3 wt.%, respectively.

Both SCB and EG disclosed high polysaccharide contents of 63.8 wt.% and 54.1 wt.%, respectively, which highlights them as potential sugar sources for subsequent chemical or biochemical conversion towards value-added products and biofuels. Cellulose, as the major chemical constituent of biomasses, represents 40.1 wt.% and 34.6 wt.% of SCB and EG, respectively. The cellulose content in SCB does not differ greatly from other agro-industrial residues *e.g.* wheat straw (39 wt.%) (Magalhães da Silva *et al.*, 2014), corn stover (33-36 wt.%) (Uppugundla *et al.*, 2014 ; Wyman *et al.*, 2005) or rice straw (34-39 wt.%) (Cheng *et*

al., 2011; Kim *et al.*, 2014). The cellulose content of EG was found to be similar to other energy crops, *e.g.* cardoon (*Cynara cardunculus*) (34-39 wt.%) (Ballesteros *et al.*, 2008; Shatalov and Pereira, 2011).

Table 1. Average macromolecular composition of SCB and EG (% of dried weight).

| Component | Raw materials | |
|----------------------------|-------------------|----------------|
| | Sugarcane bagasse | Elephant grass |
| Cellulose ^a | 40.1 ± 0.1 | 34.6 ± 0.1 |
| Hemicelluloses | 32.3 | 24.3 |
| Xylan | 20.6 ± 0.4 | 16.3 ± 0.4 |
| Arabinan | 3.1 ± 0.7 | 3.2 ± 0.2 |
| Acetyl groups | 8.6 ± 0.1 | 4.8 ± 0.6 |
| Klason lignin ^b | 20.3 ± 0.2 | 15.7 ± 0.2 |
| Protein | 1.9 ± 0.3 | 2.1 ± 0.0 |
| Ash | 4.5 ± 0.0 | 10.1 ± 0.1 |
| Water extractives | 5.5 ± 0.3 | 18.7 ± 0.4 |
| Ethanol extractives | 2.2 ± 0.1 | 3.2 ± 0.0 |

^a determined as glucan; ^b acid-insoluble lignin

The hemicellulose content of both SCB and EG consisted mainly of xylan (64 wt.% and 67 wt.% of hemicellulose, respectively) comprises about 1/3 of total polysaccharides in both feedstocks. Arabinan is the third most present polysaccharide in both raw materials, however its amount is low and does not exceed 6 wt. % of total polysaccharide content either in SCB or in EG. One of the major differences in the chemical composition of both examined feedstocks is the content of acetyl groups. SCB comprises 8.6 wt.% of acetyl groups that is almost twofold higher than in EG. Klason lignin constitutes a significant fraction of SCB and EG corresponding to 20.3 wt.% and 15.7 wt.%, respectively. Another difference between SCB and EG is the ash content. The percentage of ash in EG was more than twice that in SCB and is comparable to that found in other agro-industrial residues, such as rice straw and corn

stover, with ash contents as high as 10.6 wt.% (Moniz *et al.*, 2014) and 7.1 wt.% (Wyman *et al.*, 2005), respectively. It is worth to highlight that high ash content causes diverse problems in biomass processing, *e.g.* lowers the heating value of biomass (BioenergyNet.com, 2016). Besides, due to its chemical composition (chiefly minerals), it has buffering properties which may constrain the effectiveness of pre-treatment processes (van Walsum and Shi, 2004). From this perspective, low ash content in SCB can be expected to be more beneficial for the pre-treatment with high-pressure CO₂/H₂O mixture.

To sum up, the found chemical compositions (*i.e.* cellulose, hemicelluloses and lignin) of SCB and EG are in good agreement with those reported in literature (Sholl *et al.*, 2015a; Yu *et al.*, 2013) permitting to expect differences in the hydrolytic process promoted by high-pressure CO₂/H₂O technology.

3.2. Effect of high-pressure CO₂/H₂O pre-treatment severity on liquors' composition

In an effort to evaluate the effectiveness and selectivity of high-pressure CO₂/H₂O mixture in the conversion of xylan polysaccharide to C₅-sugars for SCB and EG, series of experiments under variable operational conditions were performed. As explained above, the combined severity factor concept CS_{pCO_2} was applied to describe the process conditions with a single parameter encompassing pre-treatment temperature, reaction time, pH and partial CO₂ pressure in the system, and to permit the comparison of the obtained results. For each set of final temperature and pressure, the determined CS_{pCO_2} differed for each raw material because, besides specific heating and pressure profiles, the CS_{pCO_2} is influenced indirectly by the intrinsic characteristics of the lignocellulosic biomass. One of the critical limitations of CS_{pCO_2} is lack of numerical representation of the influence of formed aliphatic acids on the pH value and, consequently on the CS_{pCO_2} value. Thus, in this work, CS_{pCO_2} was considered as nothing else than a representation of the operational conditions.

3.2.1. Production of sugars

High-pressure CO₂/H₂O pre-treatments of SCB and EG resulted in liquors containing a mixture of C₅-sugars, *i.e.* xylose and arabinose mainly in oligomeric form (xylooligomers (XOs) and arabinooligomers (AOs)) and C₆-sugars produced from cellulose hydrolysis, such as glucooligomers (GOs) and glucose monomers. As it can be concluded from data presented in Table 2, the XOs yield is strongly dependent on the operational conditions and biomass nature. For instance, when SCB was processed at $CS_{pCO_2} = -0.60$, a maximal xylan to XOs yield of 38.7 wt.% was achieved. Zhang and Wu reported that 45.2 wt.% of original xylan present in SCB was hydrolysed into XOs under high-pressure CO₂/H₂O batch conditions at 160 °C, 50 bar of CO₂ pressure for 80 min of residence time (Zhang and Wu, 2013). Gurgel *et al.* also studied the sugarcane bagasse pre-treatment with high-pressure CO₂/H₂O and found a maximum yield of XOs of 11.03 wt.% over 100 °C, 68 bar of initial CO₂ pressure for 30 min (Gurgel *et al.*, 2014). One of the reasons of such moderate results might be low pre-treatment temperatures (93.8 °C - 130 °C) which are far below those tested used in this study.

For EG, under similar operational conditions to those for SCB (200 °C, $CS_{pCO_2} = -0.61$), pre-treatment of EG resulted in 22.4 wt.% of XOs yield, which represents a decrease by 42% in comparison to SCB. Even under the most severe operational conditions for EG, the XOs yield (34.9 wt.%) was still lower than that obtained at milder severity for SCB, *e.g.* $CS_{pCO_2} = -0.66$ (37.7 wt.%). These results are surprising since such a high severity is usually enough to promote detectable hydrolysis of XOs into xylose resulting in an increase of xylose yield. However, analysing the profiles of XOs and xylose for both biomasses given in Fig. 1, it can be observed that both XOs and xylose profiles of EG are shifted towards higher CS_{pCO_2} when compared to SCB. SCB XOs yield peaks around $CS_{pCO_2} = -0.60$ and starts to decay at higher severities that is counterbalanced by a sharp increase in xylose yield. In the case of EG, the XOs yield increases, however, apparently in the range of studied conditions, the maximum

Table 2. Yield of oligomeric, monomeric and total sugars (g/100 g of the initial amount of polysaccharide present in the feedstock calculated using Eq. 4 and Eq. 5 in ESI) in the liquors from SCB and EG under different high-pressure CO₂/H₂O pre-treatment conditions.

| Operational conditions/ Components | Lignocellulosic feedstocks | | | | | | | | | | | |
|--|----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | Sugarcane bagasse | | | | | | Elephant grass | | | | | |
| T (°C) | 180 | | 200 | | 220 | | 180 | | 200 | | 220 | |
| SLR (w/w) | 4/40 | 3/30 | 5/50 | 3/30 | 8/80 | 3/30 | 6/60 | 3/30 | 4/40 | 5/50 | 3/30 | 3/30 |
| m _{CO₂} /m _{biomass} ^a | 4.1 | 5.8 | 2.9 | 5.8 | 1.2 | 6.0 | 2.2 | 6.1 | 4.2 | 2.9 | 6.8 | 6.7 |
| CS _{pCO₂} ^b | -1.17 | -1.13 | -1.08 | -0.66 | -0.60 | -0.06 | -1.14 | -1.13 | -1.10 | -0.61 | -0.56 | -0.04 |
| Final pH ^c | 3.80 | 3.76 | 3.77 | 3.56 | 3.67 | 3.26 | 4.82 | 4.70 | 4.63 | 4.44 | 4.39 | 3.80 |
| Xylose | | | | | | | | | | | | |
| Oligomers | 17.1 | 23.6 | 21.6 | 37.7 | 38.7 | 34.4 | 5.6 | 7.3 | 11.2 | 22.4 | 26.8 | 34.9 |
| Monomers | 6.6 | 7.1 | 6.7 | 9.3 | 8.2 | 24.8 | 10.8 | 11.3 | 10.8 | 9.2 | 8.5 | 11.5 |
| Arabinose | | | | | | | | | | | | |
| Oligomers | 17.9 | 20.5 | 17.8 | 19.2 | 22.1 | 2.1 | 23.2 | 29.4 | 35.2 | 41.1 | 31.5 | 42.5 |
| Monomers | 29.8 | 33.0 | 33.0 | 43.6 | 40.1 | 46.0 | 16.3 | 17.2 | 14.4 | 17.3 | 24.9 | 27.1 |
| Glucose | | | | | | | | | | | | |
| Oligomers | 2.6 | 5.1 | 4.8 | 6.3 | 6.1 | 5.6 | 6.1 | 6.3 | 5.5 | 6.5 | 7.0 | 7.6 |
| Monomers | 0.7 | 1.3 | 1.3 | 1.3 | 1.2 | 2.3 | 4.2 | 4.8 | 4.6 | 3.1 | 2.5 | 0.4 |

SLR – solid to liquid ratio; ^a m_{CO₂}/m_{biomass} loaded into the reactor ratio; ^b calculated according to Eq. 3 in ESI; ^c pH of liquors measured after depressurisation.

yield of XOs was still not achieved and, consequently the increase of xylose yield is barely visible. This confirms that SCB is more susceptible to hydrolysis at less severe reaction conditions to produce liquors with compositions similar to those obtained from EG pre-treated under much severer reaction conditions.

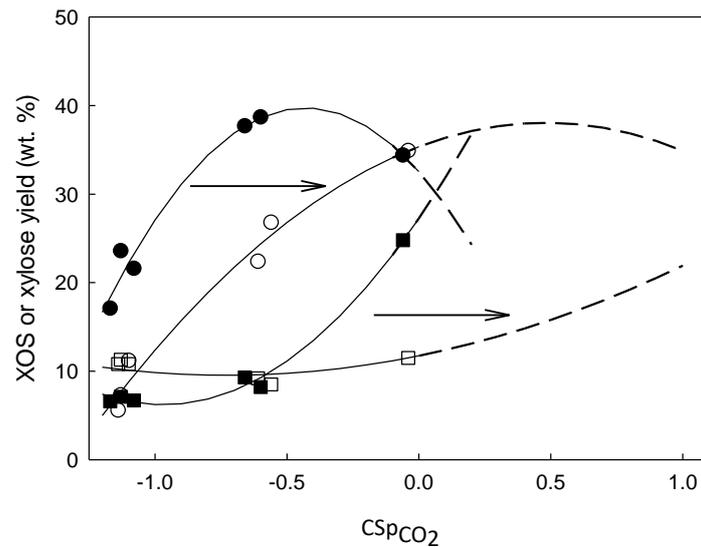


Fig. 1. The XOs (circle) or xylose (square) yields as a function of CS_{pCO_2} obtained in liquors from pre-treatment of SCB (black symbols) and EG (white symbols). Solid and dashed lines are designed as guide for the eye. Dashed lines illustrate the potential tendency of XOs and xylose yields for more severe reaction conditions. Arrows indicate the shift of XOs or xylose yields from SCB to EG over CS_{pCO_2} .

For xylose, the maximal yields of 24.8 wt.% and 11.5 wt.% were observed at $CS_{pCO_2} = -0.06$ and -0.04 for SCB and EG, respectively. The observed differences for SCB and EG in the pre-treatment efficiency indicate that the conversion of xylan to XOs as well as XOs to xylose is strongly influenced by the intrinsic features of each lignocellulosic biomass. For instance, Morais *et al.* observed that the use of high-pressure CO_2/H_2O under $225\text{ }^\circ\text{C}$, 50 bar of initial CO_2 pressure was severe enough to promote the hydrolysis of wheat straw XOs into monomers, resulting in xylan to xylose yield of 24.2 wt.% (Morais *et al.*, 2014). One possible

explanation is the difference in the content of acetyl groups of biomasses. Indeed, SCB contains about 80% more acetyl groups than EG, wherein depolymerisation of highly acetylated hemicelluloses leads to production of acetic acid that could act as an additional acid catalyst in the process. King *et al.* investigated the hydrolysis of switchgrass and corn stover in high-pressure CO₂/H₂O process (King *et al.*, 2012). They found a xylose yield varying between 12.5 and 13.1 wt.% for corn stover and switchgrass, respectively. Although the differences between both results are negligible, it is worth to highlight that they were achieved at different conditions, especially the residence time (150 min vs. 60 min for corn stover and switch grass, respectively). Hence, it was concluded that the biomass properties have a significant impact on the selection of optimal experimental conditions and by this on the efficiency of the pre-treatment.

Other C₅-sugar, AOs and arabinose showed similar patterns to those found for XOs and xylose. Under the reaction conditions for maximum XOs yield in SCB, the yield of released AOs and arabinose were 22.1 wt.% and 40.1 wt.% ($CS_{pCO_2} = -0.60$), whereas in the case of EG, the yields were 41.1 wt.% and 17.3 wt.% ($CS_{pCO_2} = -0.61$), respectively.

Among C₆-sugars, GOs and glucose were detected in the liquors. Low yields of total C₆-sugars, up to 8 wt.% for both SCB and EG were detected in all process liquors, indicating low cellulose depolymerisation efficiency under the examined high-pressure CO₂/H₂O pre-treatment severities. This low formation of C₆-sugars may have its origin in depolymerisation of non-crystalline cellulose, which is highly susceptible to hydrolytic processes.

3.2.2. Production of aliphatic acids and their effect on acidity of reaction medium

One of the most important factors examined in the presented work is the acidity of the produced liquors. As mentioned above, due to the pre-treatment conditions (high pressure and temperature), it is impossible to measure the pH of reactional medium directly during the

reaction. On the basis of experimental data, van Walsum proposed an empirical formula, given as Eq. (2) in ESI, to estimate the pH for systems composed of high-pressure CO₂ and H₂O (van Walsum, 2001). One of the shortcomings of this empirical formula is that it does not encompass the contribution of other pre-treatment products, *e.g.* organic acids. As an alternative, pH can be measured after the reaction. However, in this case, the acidification effect of *in-situ* carbonic acid is not fully considered as the great part of CO₂ is vented out during the depressurisation step, increasing the pH of the liquor. Furthermore, the pH measurement after the reaction implicates additional uncertainty. Directly after depressurisation, the remaining reaction liquor is in non-equilibrium conditions because part of the CO₂ remains still dissolved in the liquid phase and it will take some time to attain equilibrium between CO₂ concentration in the liquid and partial pressure of CO₂ in the environment. Considering all these limitations, it is clear that there is no *aurea mediocritas* and, hence the analyses of the pH of liquors have to be performed with special attention. Nevertheless, the examination of the obtained data allows drawing some relevant conclusions. At first glance, the pH values of liquors from SCB are lower than those of EG. The difference between them, depending on conditions, varies from 1.02 to 0.54 for the least and the most severe conditions, respectively. For both substrates, with increasing process severity, the pH of the liquor decreases while concentrations of acetic and formic acid increase (Fig. 2), showing a good relation between pH of liquors and organic (acetic and formic) acid formation. On the other hand, the concentration of both acids at the less severe pre-treatment condition was almost the same and its increase with increasing process severity was very similar for both biomasses, which does not explain the big pH differences between liquors of SCB and EG. So, the concentration of acetic acid obtained for SCB, under the most severe reaction conditions, was only 0.4 g/L higher than that for EG. The formic acid concentration of the EG liquor was even higher than that of SCB. The answer could lie in the ash content.

EG contains twofold more ash than SCB and according to literature reports, ash is alkaline and has buffering capacity (van Walsum and Shi, 2004). Therefore, the real effect of organic acids (acetic and formic) on the pH of the liquors can be masked by a high ash content, as in the case of EG.

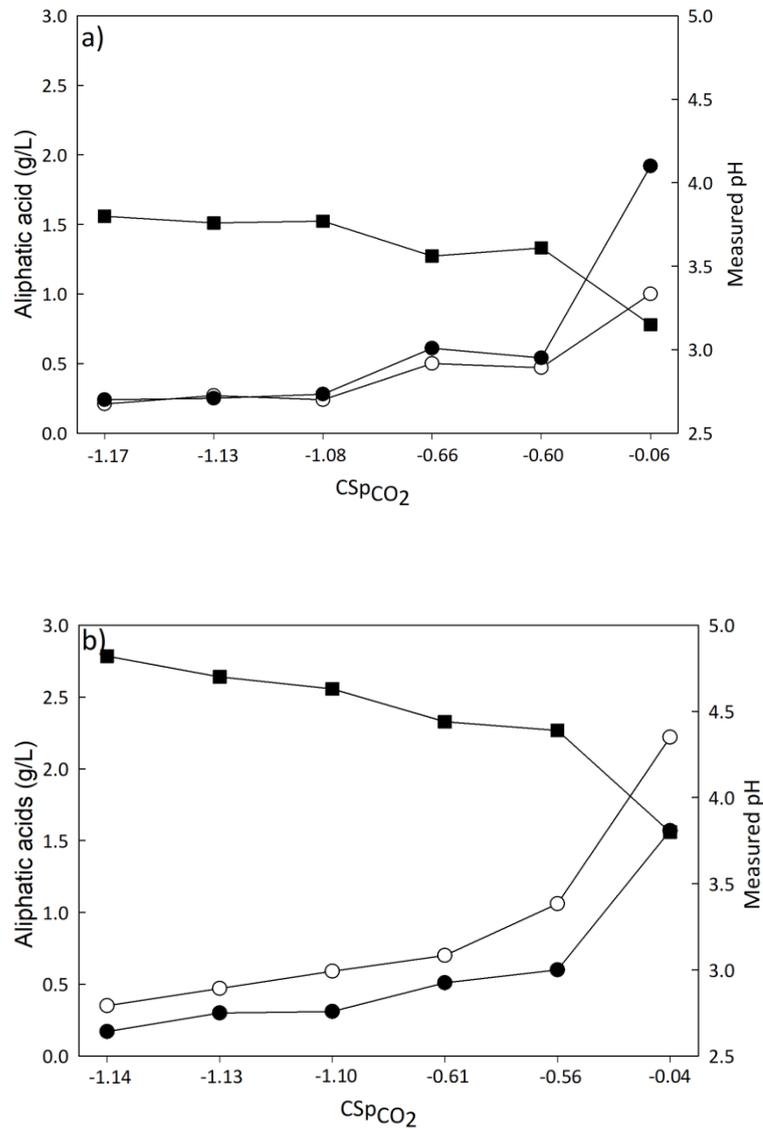


Fig. 2. The relation of acetic (black circle) and formic (white circle) acid concentrations in liquors produced from SCB (a) and EG (b) and the pH value (black square) of the liquors as a function of CS_{pCO_2} .

3.2.3. Production of degradation products

The main degradation products found in the liquid fractions from high-pressure CO₂/H₂O pre-treatment of both biomasses were formic acid, furfural and 5-HMF. The influence of CS_{pCO_2} on the concentration of these products is depicted in Fig. 3. As expected, higher CS_{pCO_2} resulted in an increase formation of degradation products. As it can be observed from Fig. 3, the concentration of formic acid was higher than that of the other two degradation products (furfural and 5-HMF), with exception of furfural concentration at the most severe reaction conditions for SCB. Furfural, the dehydration product from pentoses out of hemicelluloses, was found in liquors from SCB and EG only for experiments performed under more severe conditions. For SCB, furfural could only be detected for CS_{pCO_2} higher than -0.66 and its concentration increased up to 0.8 g/L under the most severe pre-treatment conditions tested in this study. In the EG liquor, furfural was only detected at the most severe operational conditions *i.e.* $CS_{pCO_2} = -0.04$, at a concentration that was 2.5-times lower than in the SCB liquor at $CS_{pCO_2} = -0.06$. The degradation of glucose leads to 5-HMF, which was found in minimal amounts in liquors obtained from both biomasses and only under the harshest pre-treatment conditions. The obtained results show that even at very severe reaction conditions, the degradation products constitute just a small fraction of the respective polysaccharides.

3.3. Effects of high-pressure CO₂/H₂O pre-treatment severity on processed materials

3.3.1. Dissolution degree

Biomass pre-treatment with high-pressure CO₂/H₂O mixture resulted in hydrolysis of biomass, whose extent was highly dependent on the severity of the process as expressed by CS_{pCO_2} . Fig. 4 depicts the gradual, albeit slight, continuous increase of the dissolution of SCB and EG, as a function of CS_{pCO_2} .

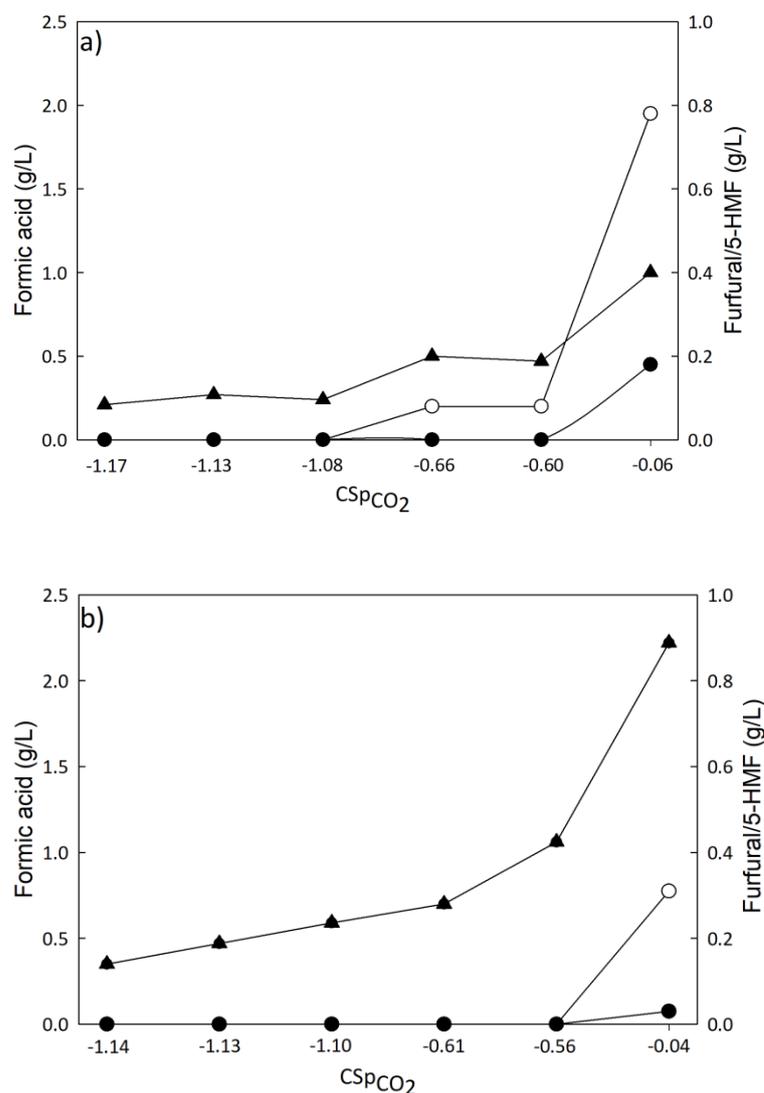


Fig. 3. The formic acid (black triangle), furfural (white circle) and 5-HMF (black circle) concentrations in liquors produced from SCB (a) and EG (b) as a function of CS_{pCO_2} .

The dissolution degree, calculated according to Eq. (6) in ESI, was low for both biomasses under the mildest pre-treatment conditions, starting for SCB at 6.1 wt.% and reaching 23.5 wt.% under the most severe conditions used in this work *i.e.* $CS_{pCO_2} = -0.06$, while the pH dropped to its lowest value of 3.26. The degree of dissolution of EG biomass augmented gradually from 8.7 wt.% at a $CS_{pCO_2} = -1.14$ to 32.5 wt.% at a CS_{pCO_2} of -0.04, which is 38% higher than that obtained for SCB. One possible reason for such an extensive

EG dissolution in comparison to SCB could be the high content of water extractives of EG which were found to be three times higher than that of SCB.

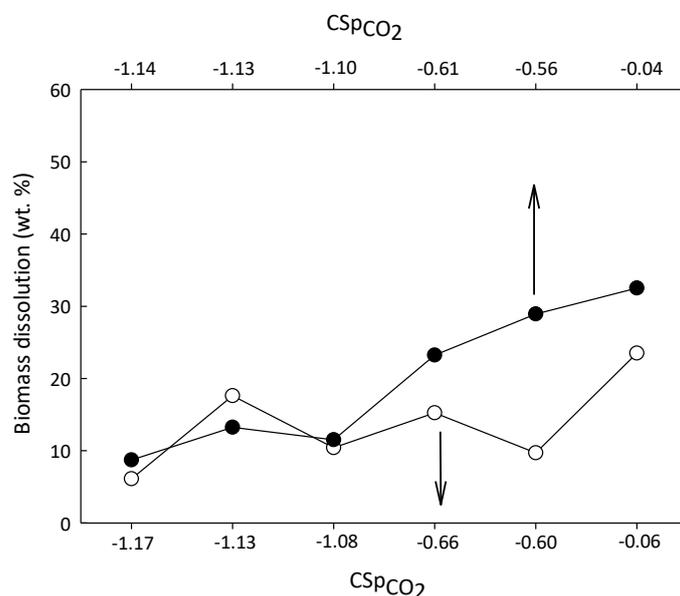


Fig. 4. The dependence of SCB (white circle) and EG (black circle) dissolution on CS_{pCO_2} .

3.3.2. Chemical composition

The composition of the pre-treated materials obtained at the different combined severity factors are shown in Fig. 5. Pre-treatment of both biomasses removed only less than 10% of original cellulose (data not shown).

As it can be seen from Fig. 5, the cellulose content (determined as glucan) increased from 40 wt.% and 34.6 wt.% in native SCB and EG up to 55.1 wt.% and 49.1 wt.%, respectively. This data suggest that crystalline cellulose, at least under the investigated severities, was not affected by high-pressure CO_2/H_2O pre-treatment. The cleavage of hydrogen bonds present in crystalline structure of cellulose typically involves the use of concentrated acids and/or high temperatures (Xiang *et al.*, 2003). As already known from other pre-treatments (Silveira *et al.*, 2015), the cellulose content of the processed biomasses rises with increasing pre-treatment severity, as result of hemicellulose removal and its relative recalcitrance to high-pressure CO_2/H_2O technology. Analogously to cellulose but less

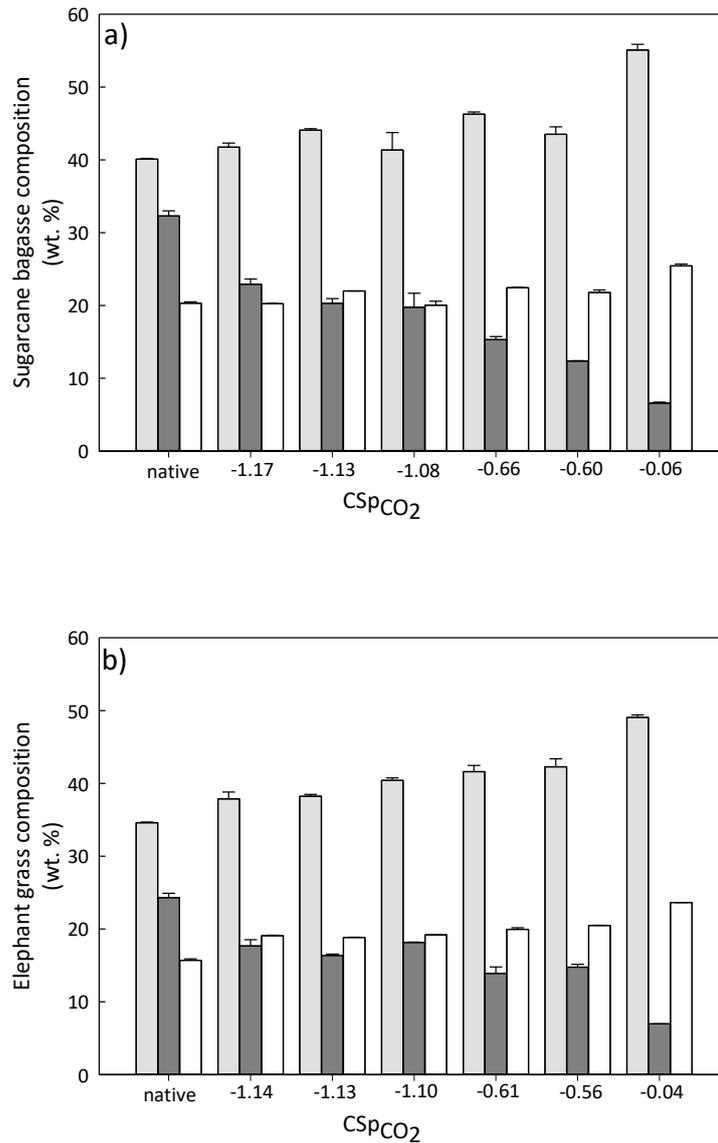


Fig. 5. Cellulose (light grey); hemicelluloses (grey) and lignin (white) content of native and processed SCB (a) and EG (b) as a function of CS_{pCO_2} .

pronounced, lignin content increased with increasing process severity, indicating that it is not very susceptible to hydrolysis or degradation reactions under the studied experimental conditions. However, it shows a low, but perceptible, dissolution under the most severe conditions for both biomasses. As an example, for the most severe operational conditions ~4% and 7% of lignin from SCB and EG, respectively, were dissolved (data not shown). In

contrast, hemicellulose content was dramatically reduced and dropped to below 7 wt.% under the most severe pre-treatment conditions for both biomasses. The disappearance of hemicellulose was accompanied by the recovery of sugars in oligomeric and monomeric forms in the produced liquors, as discussed above. A significant removal of hemicellulose from both biomasses could already be observed at the less severe pre-treatment conditions applied in this study. It can be expected that for less severe reaction conditions the hydrolysis of xylosidic bonds is slow, which, depending on the desired end products, might be beneficial, since a low hydrolysis rate hampers the formation of further degradation products, *e.g.* furfural, due to the limited production of monomers.

3.3. Enzymatic hydrolysis

The efficiency of pre-treatment can also be analysed by the extent of enzymatic digestibility of the pre-treated materials. Fig. 6 presents the glucan to glucose yields from native (unwashed) and processed SCB and EG after 72 h of enzymatic hydrolysis. These results reveal that pre-treatment improves the glucan to glucose hydrolysis yield for both biomasses and that higher pre-treatment severities lead to a better digestibility. In the case of SCB, even the least severe pre-treatment condition ($CS_{pCO_2} = -1.17$) allowed to increase the glucan to glucose yield by 60%. However, the enhancement of enzymatic hydrolysis yield for EG was not as notable as for SCB. Bearing in mind that around 21 wt.% of dry weight of native EG are extractives (both water and ethanol extractives), whereas SCB contains only about one third (7.7 wt.%) of that amount (see Table 1), both biomasses were washed before being submitted to enzymatic hydrolysis. Towards an adequate analysis, firstly the washed biomasses were analysed against the glucan content. As expected, glucan content in washed biomasses increased from 40.1 ± 0.1 wt.% and 34.6 ± 0.1 wt.% up to 45.2 ± 0.7 wt.% and to 47.0 ± 0.4 wt.% for SCB and EG, respectively. Hence, the enzymatic hydrolyses of both

washed native biomasses were performed and revealed a decrease of enzymatic hydrolysis yields. However, the drop in glucan to glucose yield for SCB was minimal (19.2 mol% to 16.9 mol% for unwashed and washed native biomasses), whereas for washed EG a striking drop in enzymatic hydrolysis yield was observed. Washed native EG reduced the glucan to glucose yield from 41.2 mol% to 31.6 mol%. This could indicate that to a certain extent extractives are constituted by apparently easily hydrolysable hexose sugars and only part of glucose produced during the enzymatic hydrolysis comes from cellulose.

Enzymatic hydrolysis of both biomasses also demonstrated that glucan to glucose yield increased along pre-treatment temperature and, for the constant temperature, is slightly dependent on $m_{CO_2}/m_{biomass}$ ratio. The increase in glucan to glucose yield with temperature could be expected as it was already reported for various biomasses and types of pre-treatments (Silveira *et al.*, 2015). However, the influence of CO_2 /biomass ratio on the enzymatic hydrolysis is not a straightforward conclusion. A possible explanation for this behaviour can be found in a previous work related to pre-treatment of wheat straw using high-pressure CO_2/H_2O . These results showed that CO_2 has at least a dual role. Firstly, CO_2 dissolves and depolymerises hemicellulose and secondly, due to its diffusion properties, CO_2 penetrates into the porous structure of biomass and improves the susceptibility of processed biomass to enzymatic attack (Morais *et al.*, 2014). Hence, more CO_2 would improve the hemicellulose removal and, simultaneously, enhance the enzymatic digestibility of biomass. Thus, the achieved glucan to glucose yield increase could also be ascribed to an increase in the CO_2 /biomass ratio and not only as a function of CS_{pCO_2} (insets in Fig. 6). According to the data depicted in Fig. 6, the highest pre-treatment temperature resulted in the maximal enzymatic hydrolysis yields of 77.2 mol% (220 °C, $m_{CO_2}/m_{biomass} = 6.0$; $CS_{pCO_2} = -0.06$) and 72.4 mol% (220 °C, $m_{CO_2}/m_{biomass} = 6.7$; $CS_{pCO_2} = -0.04$) for processed SCB and EG, respectively. For constant temperature, an increase in $m_{CO_2}/m_{biomass}$ ratio contributed

positively to enhance the glucan to glucose yield, as it can be especially observed for higher temperature, *i.e.* 200 °C.

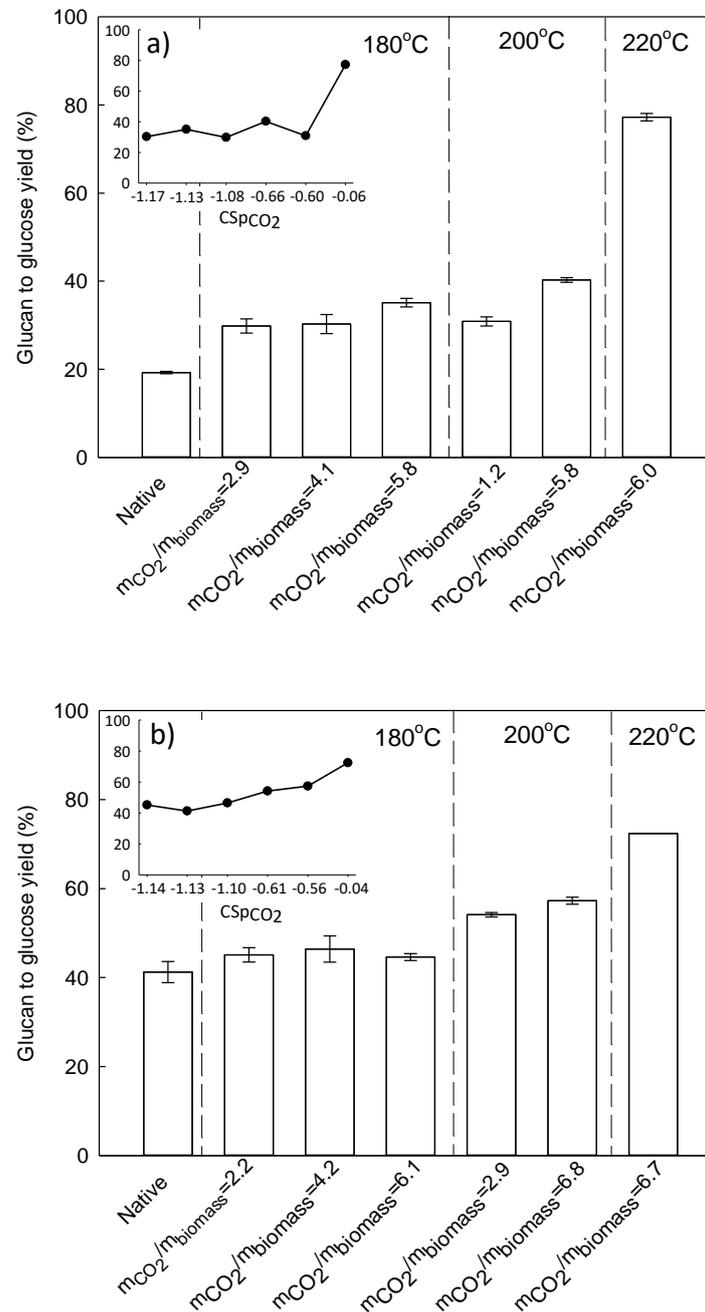


Fig. 6. Glucan to glucose yield for native (unwashed) and pre-treated SCB (a) and EG (b) after 72 h of enzymatic hydrolysis. Bars show the glucan to glucose yield as a function of temperature and $m_{CO_2}/m_{biomass}$ (given in Table 2). The inset graph shows the correlation between glucan to glucose yield of the samples and CS_{pCO_2} .

The achieved enzymatic digestibility yields are in a good agreement with those presented in literature. For instance, Phan *et al.* studied the supercritical CO₂ pre-treatment of sugarcane bagasse over 180 °C and 206 bar within 60 min and obtained a maximum yield of 61.3 mol% (Phan and Tan, 2014), whereas another literature report demonstrates that SCB processed at the same temperature at only 50 bar and for 100 min yielded 93 wt.% of glucan to glucose conversion (Zhang and Wu, 2014b). Moreover, the results obtained in this work are in a good agreement to enzymatic hydrolysis of other lignocellulosic biomasses using high-pressure CO₂/H₂O mixture (Morais *et al.*, 2015, 2014) as well as to other conventional and less sustainable *e.g.* acid, alkali or hydrothermal pre-treatments of sugarcane bagasse (Pietrobon *et al.*, 2011; Pirota *et al.*, 2014; Rezende *et al.*, 2011; Scholl *et al.*, 2015b; Visser *et al.*, 2015).

To the best of our knowledge, this is the first report on EG high-pressure CO₂/H₂O pre-treatment, so there are no literature data available for comparison of the obtained glucan to glucose yields. Nevertheless, the results presented herein can be matched to those obtained for steam-explosion pre-treated EG samples for which conversion through enzymatic hydrolysis, was quantified as total reducing sugar yields (Scholl *et al.*, 2015b). Taking into account that the enzymatic hydrolysis was not optimised for either SCB or EG, the results obtained from these preliminary assays can be considered satisfactory.

4. Conclusions

The use of high-pressure CO₂/H₂O mixture for pre-treatment of SCB and EG allows to explore their intrinsic features (especially acetyl group and ash contents) which have a significant impact on effectiveness of biomass processing. Under the investigated operational conditions, CS_{pCO_2} of -0.06 and -0.04 gave the highest total xylose yield of 59.2 wt.% and 46.4 wt.% for SCB and EG, respectively. Additionally, the highest enzymatic hydrolysis yields of

77.2 mol% and 72.4 mol% for SCB and EG were achieved for solids pre-treated at the severest operational conditions.

Acknowledgements

This work was supported by the Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT/MEC, Portugal) through SFRH/BD/94297/2013, IF/00424/2013 grants and by BBRI - Biomass and Bioenergy Research Infrastructure (ROTEIRO/0189/2013) and the Associated Laboratory for Sustainable Chemistry - Clean Processes and Technologies - LAQV which is financed by national funds from FCT/MEC (UID/QUI/50006/2013) and co-financed by the ERDF under the PT2020 Partnership Agreement (POCI-01-0145-FEDER - 007265). Authors wish to thank to FCT/MEC and CAPES (Brazil) for financing Bilateral Cooperation Portugal/Brazil project (FCT/1909/27/2/2014/S and CAPES 371/14, AUXPE Nr 0005/2015, project 23038.002463/2014-98). J.A., M.C. and A.J.P.D. would like to thank CNPq for their Research Grants. Authors also wish to thank to Belina Ribeiro for help in enzymatic hydrolysis analyses and Maria do Céu Penedo for support of laboratory activities.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.101>.

References

- Ballesteros, L., Ballesteros, M., Manzanares, P., Negro, M.J., Oliva, J.M., Saez, F., 2008. Dilute sulfuric acid pretreatment of cardoon for ethanol production. *Biochem. Eng. J.* 42, 84-91.
- BioenergyNet.com. 2016. Significant biomass properties. Part 2: Ash content.
- Brandt, A., Hallett, J.P., Leak, D.J., Murphy, R.J., Welton, T., 2010. The effect of the ionic liquid anion in the pretreatment of pine wood chips. *Green Chem.* 12, 672-679.

- Browning, B.L., 1967. Chemistry of wood. In: Sarkanen, K.V., Ludwig, C.H. (Eds.), *Methods in Wood Chemistry*. John, Wiley & Sons. New York, pp. 795-798.
- Cheng, J., Su, H.B., Zhou, J.H., Song, W.L, Cen, K.F., 2011. Microwave-assisted alkali pretreatment of rice straw to promote enzymatic hydrolysis and hydrogen production in dark- and photo-fermentation. *Int. J. Hydrogen Energy* 36, 2093-2101.
- Duarte, L.C., Cavalheiro, F., Lopes, S., Marques, S., Parajo, J.C., Girio, F.M., 2004. Comparison of two posthydrolysis processes of brewery's spent grain autohydrolysis liquor to produce a pentose-containing culture medium. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 113, 1041-1058.
- Ferreira-Leitao, V., Gottschalk, L.M.F., Ferrara, M.A., Nepomuceno, A.L., Molinari, H.B.C., Bom, E.P.S., 2010. Biomass residues in Brazil: availability and potential uses. *Waste Biomass Valori.* 1,65-76.
- Fontoura, C.F., Brandão, L.E., Gomes, L.L., 2015. Elephant grass biorefineries: towards a cleaner Brazilian energy matrix? *J. Clean. Prod.* 96, 85-93.
- Geddes, C.C., Nieves, I.U., Ingram, L.O., 2011. Advances in ethanol production. *Curr. Opin. Biotechnol.* 22, 312-319.
- Gurgel, L.V.A., Pimenta, M.T.B., da Silva Curvelo, A.A., 2014. Enhancing liquid hot water (LHW) pretreatment of sugarcane bagasse by high pressure carbon dioxide (HP-CO₂). *Ind. Crop Prod.* 57, 141-149.
- Huber, G.W., Iborra, S., Corma, A., 2006. Synthesis of transportation fuels from biomass: chemistry, catalysts, and engineering. *Chem. Rev.* 106, 4044-4098.
- ISO, 2014. Milk and Milk Products – Determination of Nitrogen Content – Part 1: Kjeldahl Principle and Crude Protein Calculation. ISO 8968-1:2014.
- Kim, I., Rehman, M.S.U., Han, J.I., 2014. Fermentable sugar recovery and adsorption potential of enzymatically hydrolyzed rice straw. *J. Clean. Prod.* 66, 555–561.
- Kim, K.H., Hong, J., 2001. Supercritical CO₂ pretreatment of lignocellulose enhances enzymatic cellulose hydrolysis. *Bioresour. Technol.* 77, 139–144.
- King, J.W., Srinivas, K., Guevara, O., Lu, Y.W., Zhang, D.F., Wang, Y.J., 2012. Reactive high pressure carbonated water pretreatment prior to enzymatic saccharification of biomass substrates. *J. Supercrit. Fluid* 66, 221–231.
- Kumar, P., Barrett, D.M., Delwiche, M.J., Stroeve, P., 2009. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Ind. Eng. Chem. Res.* 48, 3713–3729.
- Magalhães da Silva, S.P., Morais, A.R.C., Bogel-Lukasik, R., 2014. The CO₂-assisted autohydrolysis pre-treatment of wheat straw. *Green Chem.* 16, 238–246.
- Miyazawa, T., Funazukuri, T., 2005. Polysaccharide hydrolysis accelerated by adding carbon dioxide under hydrothermal conditions. *Biotechnol. Prog.* 21, 1782–1785.
- Mohanram, S., Amat, D., Choudhary, J., Arora, A., Nain, L., 2013. Novel perspectives for evolving enzyme cocktails for lignocellulose hydrolysis in biorefineries. *Sustain. Chem. Process* 1, 1.
- Moniz, P., Pereira, H., Duarte, L.C., Carvalho, F., 2014. Hydrothermal production and gel filtration purification of xylo-oligosaccharides from rice straw. *Ind. Crop Product.* 62, 460–465.

- Morais, A.R.C., da Costa Lopes, A.M., Bogel-Lukasik, R., 2015. Carbon dioxide in biomass processing: contributions to the green biorefinery concept. *Chem. Rev.* 115, 3–27.
- Morais, A.R.C., Mata, A.C., Bogel-Lukasik, R., 2014. Integrated conversion of agroindustrial residue with high pressure CO₂ within the biorefinery concept. *Green Chem.* 16, 4312–4322.
- Morais, A.R.C., Matuchaki, M.D.J., Andraus, J., Bogel-Lukasik, R., 2016. A green and efficient approach of selective conversion of xylose and biomass hemicellulose into furfural in aqueous media using high-pressure CO₂ as sustainable catalyst. *Green Chem.* 18, 2985–2994.
- Pang, J.F., Zheng, M.Y., Wang, A.Q., Zhang, T., 2011. Catalytic hydrogenation of corn stalk to ethylene glycol and 1,2-propylene glycol. *Ind. Eng. Chem. Res.* 50, 6601–6608.
- Phan, D.T., Tan, C.-S., 2014. Innovative pretreatment of sugarcane bagasse using supercritical CO₂ followed by alkaline hydrogen peroxide. *Bioresour. Technol.* 167, 192–197.
- Pietrobon, V.C., Monteiro, R.T.R., Pompeu, G.B., Lopes, M.L., Amorim, H.V.D., Cruz, S.H.D., Viégas, E.K.D., 2011. Enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse pretreated with acid or alkali. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 54, 229–233.
- Pirota, R., Delabona, P., Farinas, C., 2014. Enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse using enzyme extract and whole solid-state fermentation medium of two newly isolated strains of *Aspegillus oryzae*. *Chem. Eng. Trans.* 38, 259–264.
- Relvas, F.M., Morais, A.R.C., Bogel-Lukasik, R., 2015a. Kinetic modelling of hemicellulose-derived biomass hydrolysis using high-pressure CO₂-H₂O mixture technology. *J. Supercrit. Fluid* 99, 95–102.
- Relvas, F.M., Morais, A.R.C., Bogel-Lukasik, R., 2015b. Selective hydrolysis of wheat straw hemicellulose using high-pressure CO₂ as catalyst. *RSC Adv.* 5, 73935–73944.
- Rezende, C.A., De Lima, M.A., Maziero, P., Ribeiro deAzevedo, E., Garcia, W., Polikarpov, I., 2011. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. In: *Biotechnol. Biofuels* 4, 1.
- Scholl, A.L., Menegol, D., Pitarelo, A.P., Fontana, R.C., Zandoná, A., Ramos, L.P., Dillon, A.J.P., Camassola, M., 2015a. Elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum.) pretreated via steam explosion as a carbon source for cellulases and xylanases in submerged cultivation. *Ind. Crop Prod.* 70, 280–291.
- Scholl, A.L., Menegol, D., Pitarelo, A.P., Fontana, R.C., Zandoná Filho, A., Ramos, L.P., Dillon, A.J.P., Camassola, M., 2015b. Ethanol production from sugars obtained during enzymatic hydrolysis of elephant grass (*Pennisetum purpureum*, Schum.) pretreated by steam explosion. *Bioresour. Technol.* 192, 228–237.
- Shatalov, A.A., Pereira, H., 2011. Biorefinery of energy crop cardoon (*Cynara cardunculus* L.)-hydrolytic xylose production as entry point to complex fractionation scheme. *J. Chem. Eng. Process Technol.* 2, 118.
- Silveira, M.H.L., Morais, A.R.C., da Costa Lopes, A.M., Oleksyszyn, D.N., Bogel-Lukasik, R., Andraus, J., Pereira Ramos, L., 2015. Current pretreatment technologies for the development of cellulosic ethanol and biorefineries. *ChemSusChem* 8, 3366–3390.

- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., 2005a. Determination of Ash in Biomass. National Renewable Energy Laboratory –NREL. NREL/TP-510-42622.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., 2006. Determination of Sugars, Byproducts, and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples – Laboratory Analytical Procedure (LAP). National Renewable Energy Laboratory – NREL. NREL/TP-510-42623.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., 2005b. Determination of Extractives in Biomass – Laboratory Analytical Procedure (LAP). National Renewable Energy Laboratory – NREL. NREL/TP-510-42619.
- Uppugundla, N., Sousa, L.D., Chundawat, S.P.S., Yu, X.R., Simmons, B., Singh, S., Gao, X.D., Kumar, R., Wyman, C.E., Dale, B.E., Balan, V., 2014. A comparative study of ethanol production using dilute acid, ionic liquid and AFEX (TM) pretreated corn stover. *Biotechnol. Biofuels* 7, 72.
- van Walsum, G.P., 2001. Severity function describing the hydrolysis of xylan using carbonic acid. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 91–93, 317–329.
- van Walsum, G.P., Shi, H., 2004. Carbonic acid enhancement of hydrolysis in aqueous pretreatment of corn stover. *Bioresour. Technol.* 93, 217–226.
- Visser, E.M., Leal, T.F., de Almeida, M.N., Guimarães, V.M., 2015. Increased enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse from enzyme recycling. *Biotechnol. Biofuels* 8, 1.
- Wyman, C.E., Dale, B.E., Elander, R.T., Holtzapple, M., Ladisch, M.R., Lee, Y.Y., 2005. Comparative sugar recovery data from laboratory scale application of leading pretreatment technologies to corn stover. *Bioresour. Technol.* 96, 2026–2032.
- Xiang, Q., Kim, J.S., Lee, Y.Y., 2003. A comprehensive kinetic model for dilute-acid hydrolysis of cellulose. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 105, 337–352.
- Yu, Q., Zhuang, X.S., Yuan, Z.H., Qi, W., Wang, W., Wang, Q., Tan, X.S., 2013. Pretreatment of sugarcane bagasse with liquid hot water and aqueous ammonia. *Bioresour. Technol.* 144, 210–215.
- Zetzl, C., Gairola, K., Kirsch, C., Perez-Cantu, L., Smirnova, I., 2011. High Pressure Processes in Biorefineries. *Chem. Ing. Tech.* 83, 1016–1025.
- Zhang, H., Wu, S., 2014a. Pretreatment of eucalyptus using subcritical CO₂ for sugar production. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 90, 1640–1645.
- Zhang, H.D., Wu, S.B., 2014b. Enhanced enzymatic cellulose hydrolysis by subcritical carbon dioxide pretreatment of sugarcane bagasse. *Bioresour. Technol.* 158, 161–165.
- Zhang, H.D., Wu, S.B., 2013. Subcritical CO₂ pretreatment of sugarcane bagasse and its enzymatic hydrolysis for sugar production. *Bioresour. Technol.* 149, 546–550.

4.2 Artigo 2: Effective extraction of lignin from elephant grass using imidazole and its effect on enzymatic saccharification to produce fermentable sugars



Research Note

pubs.acs.org/IECR

Effective Extraction of Lignin from Elephant Grass Using Imidazole and Its Effect on Enzymatic Saccharification To Produce Fermentable Sugars

Andréia Toscan,^{†,‡} Ana Rita C. Morais,^{†,§} Susana M. Paixão,[†] Luís Alves,[†] Jürgen Andreas,^{||} Marli Camassola,[‡] Aldo José Pinheiro Dillon,[‡] and Rafal M. Lukasik^{*,†} 

[†]Unidade de Bioenergia, Laboratório Nacional de Energia e Geologia, I.P., Estrada do Paço do Lumiar 22, 1649-038 Lisboa, Portugal

[‡]Laboratório de Enzimas e Biomassa de Caxias do Sul–Instituto de Biotecnologia, Caxias do Sul, Rio Grande do Sul 95070-560, Brazil

[§]LAQV/REQUIMTE, Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2829-516 Caparica, Portugal

^{||}Departamento de Química, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, Santa Catarina 89030-903, Brazil

Received: December 20, 2016

Revised: February 22, 2017

Accepted: April 12, 2017

Published: April 12, 2017

DOI: 10.1021/acs.iecr.6b04932
Ind. Eng. Chem. Res. 2017, 56, 5138–5145

Effective extraction of lignin from elephant grass using imidazole and its effect on enzymatic saccharification to produce fermentable sugars

Andréia Toscan^{a,b}, Ana Rita C. Morais^{a,c}, Susana M. Paixão^a, Luís Alves^a, Jürgen Andraeus^d, Marli Camassola^b, Aldo José Pinheiro Dillon^b and Rafal M. Lukasik^{a*}

^a Unidade de Bioenergia, Laboratório Nacional de Energia e Geologia, I.P., Estrada do Paço do Lumiar 22, 1649-038 Lisboa, Portugal.

*e-mail: rafal.lukasik@lneg.pt; Fax: +351217163636; phone +351210924600 ext. 4224

^b Universidade de Caxias do Sul – Instituto de Biotecnologia, Laboratório de Enzimas e Biomassa, 95070-560 Caxias do Sul, RS, Brazil

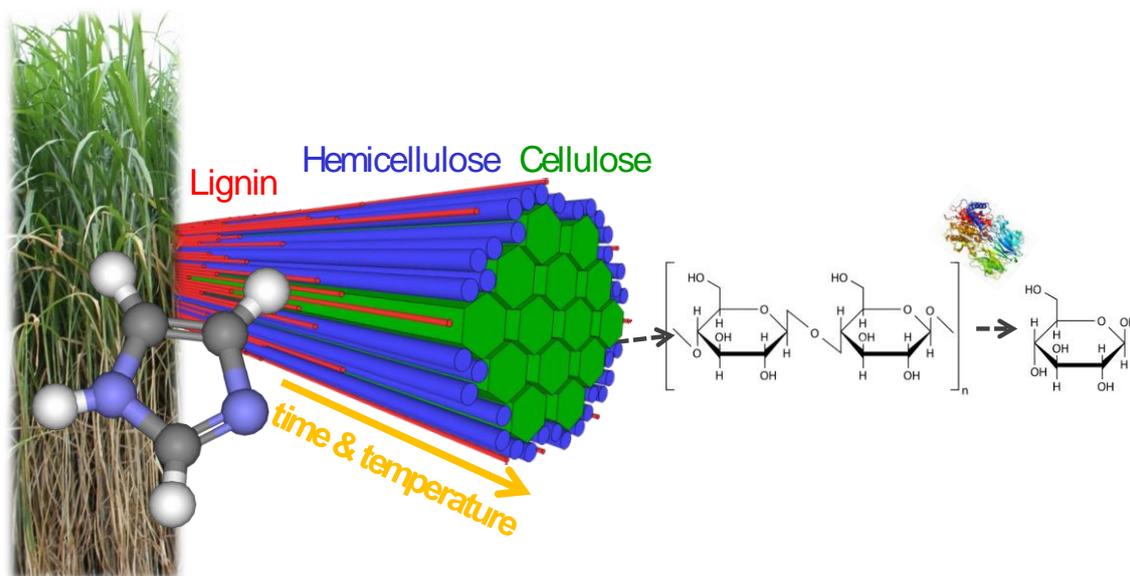
^c LAQV/REQUIMTE, Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2829-516 Caparica, Portugal

^d Universidade Regional de Blumenau, Departamento de Química, 89030-903 Blumenau, SC, Brazil

Abstract

Elephant grass (*Pennisetum purpureum Schum.*) is an energy crop ready to be used as a source of fermentable sugars. Imidazole was proposed as a new solvent for biomass fractionation to facilitate disruption of the lignocellulosic matrix and production of a polysaccharide lignin-free material highly susceptible to enzymatic saccharification. Approximately 82% w·w⁻¹ of lignin was extracted from elephant grass under the optimised operational condition (135.6 °C for 308.4 min). For similar conditions the recovered polysaccharide-rich materials demonstrated enzymatic digestibility with glucan to glucose yields as high as 80.6 mol %.

Abstract graphic



1. Introduction

Growing concerns about environmental changes and energy security have been increasing the demand for alternative carbon sources. Lignocellulosic biomass has attracted much attention as the most sustainable and carbon-neutral energy resource for the production of biofuels, biochemicals and biomaterials.^{1,2} However, the sustainable use of this abundant and renewable material is only achieved by following the principles of the biorefinery concept, considering the cascade valorisation approach, that is, the valorization of all biomass fraction. For an efficient fractionation of lignocellulosic feedstock adequate pretreatment procedures are needed.³ Different pretreatment approaches are available at industrial level and their selection depends on the target product.⁴⁻⁸ Most of the traditional methods of biomass pretreatment are either inefficient in biomass fractionation or too energy intensive. For these reasons, in current industrial second generation ethanol plants, pretreatment is the second most cost expenditure process after enzymatic hydrolysis. Therefore, the pretreatment step is one of the most important stages in biomass conversion.^{4,6} An ideal pretreatment process should occur at the lowest possible temperature (preferentially below 100 °C), without the

need of hazardous chemicals and only with environmentally benign solvents. Furthermore, it should produce high quality cellulose, hemicellulose and lignin fractions in order to reduce or even eliminate the need of posthydrolysis to easily upgradable products. At the momentary state of art, this is unfortunately still wishful-thinking and specific single or combined pretreatments are needed to satisfy at least some of those requirements. Organosolv processes, that involve the use of organic solvents, initially developed in the pulp and paper industries, are nowadays an industrial practice. One of the advantages of organosolv processes is the efficient delignification of biomass. In some cases high purity, low sulphur, and condensate lignin contents can be obtained.⁹ Up to now, short chain alcohols (*e.g.* ethanol), polyols (*e.g.* glycerol), organic acids (*e.g.* formic acid) and acetone were used. Furthermore, some researches with alkylene carbonates, ketones (*e.g.* methyl isobutyl ketone), 2-methyltetrahydrofurfural and some processes with ionic liquids have been reported recently.⁹ Imidazole is one of the most recently explored alkaline solvents.¹⁰ Contrary to other organosolv reagents, imidazole fractionates biomass into its respective polysaccharide and is able to depolymerise lignin leading to diverse mono- and polyphenolic compounds.¹⁰ Imidazole-based pretreatment can be performed at a much lower temperature than classical pretreatments (>200 °C) and without the need of additional catalysts that require (later) neutralization. Additionally, imidazole has a high boiling point and consequently low vapour pressure¹¹ like ionic liquids, however imidazole is far more cheaper than ionic liquids. One of the drawbacks of using imidazole might be a higher workup needed to recovery it in comparison to other volatile solvents such as ethanol.

This work is a continuation of previous research on biomass pretreatment using imidazole¹⁰ and is focused on the extraction of lignin from elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum.), and its effect on enzymatic digestibility of the produced fractions.

2. Materials and Methods

2.1 Materials

Elephant grass (mixture of stem and leaves) was obtained from Nova Petropolis, Rio Grande do Sul, Brazil. Lignocellulosic biomass was ground in a knife mill (IKA® WERKE, MF 10 basic, Germany) to a particle size below 1.0 mm in diameter. This fraction was collected and stored at room temperature in a closed plastic vessel. For the elephant grass pretreatment, imidazole with purity of 99% (Alfa Aesar, Karlsruhe, Germany) was used. For the polysaccharide fraction precipitation, distilled water ($0.6 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$) produced by PURELAB Classic Elga system was used. Aqueous 25% w·w⁻¹ HCl solution (Merck, Darmstadt, Germany) was used to adjust pH of the postreaction solutions. The solid fractions of polysaccharides and recovered lignin were washed with ethanol 96% v·v⁻¹ (AGA-Álcool e Géneros Alimentares, S.A., Prior Velho, Portugal). The solid precipitates were separated from supernatant using membranes ($\varnothing=150 \text{ mm}$, n. 1238 from Filter-Lab, Filtros Anovia, S.A., Barcelona, Spain). For the chemical characterisation of both native and processed materials, aqueous solution of 72% w·w⁻¹ H₂SO₄ prepared from 96% w·w⁻¹ H₂SO₄ supplied by Panreac Química, Barcelona, Spain was used. For the enzymatic saccharification, an enzyme cocktail was prepared using three commercial enzymes: Accellerase® 1500 (250 $\mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$ biomass, corresponding to an endoglucanase activity of at least 578 CMC U·g⁻¹ biomass, where CMC U are carboxymethylcellulose units), Accellerase® XY (50 $\mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$ biomass, corresponding to a xylanase activity of at least 1160 ABX U·g⁻¹ biomass, where ABX U are acid birchwood xylan units) and Accellerase® BG (90 $\mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$ biomass, corresponding to a β -glucosidase activity of at least 311 pNPG U·g⁻¹ biomass, where pNPG U are p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside units). These enzymes were kindly provided by Genencor, DuPont Industrial Biosciences (Palo Alto, CA, USA). The information of the main enzymatic activity of each commercial enzyme complex used was provided by the supplier.

2.2 Biomass fractionation

Elephant grass fractionation was performed according to the method presented recently by Morais *et al.*¹⁰ A short description is given as follows: a constant imidazole/biomass ratio of 9 w·w⁻¹ was placed to a 250 mL SCHOTT DURAN® flask under continuous stirring. Experiments were conducted in an oil bath at the desired reaction temperature and time according to the experimental design presented below. The reaction time started to be counted when the reactional mixture reached the desired temperature. After reaction, the flask containing reaction mixture was removed from the oil bath, cooled down and 90 mL of distilled water were added. Next, the entire solution was stirred for 1 h to promote the precipitation and recovery of biomass components (mainly polysaccharides). Then, the mixture was filtrated under vacuum and the precipitated solid was separate and washed with 135 mL of EtOH 96% (v·v⁻¹) to remove any residues of imidazole from the recovered fraction. The recovered fractions were dried overnight at 50 °C in an oven. The liquid phase containing distilled water and imidazole as well as residual amounts of polysaccharides and lignin, either depolymerised or not, was treated according to a procedure reported in literature¹⁰ in order to recover imidazole for future reuse. The hemicellulose and lignin (delignification) removal was calculated using eqs 1 and 2.

$$\text{hemicellulose removal} = 1 - \frac{m_{\text{processed biomass}} \times (\text{hemicellulose content}_{\text{recovered material}})}{m_{\text{biomass}} \times (\text{hemicellulose content}_{\text{biomass}})} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{lignin removal} = \text{delignification} = 1 - \frac{m_{\text{processed biomass}} \times (\text{lignin content}_{\text{recovered material}})}{m_{\text{biomass}} \times (\text{lignin content}_{\text{biomass}})} \times 100 \quad (2)$$

where $m_{\text{recovered biomass}}$ is the dry weight of recovered biomass recovered after pretreatment (g), m_{biomass} is the dry weight of biomass subjected to pretreatment (g), $(\text{hemicellulose content}_{\text{recovered material}})$ is the hemicellulose (*i.e.* sum of xylan, arabinan and acetyl groups) content in recovered material (% of dried weight),

(*hemicellulose content*_{biomass}) is the hemicellulose (*i.e.* sum of xylan, arabinan and acetyl groups) content in biomass subjected to pretreatment (% of dried weight), *lignin content*_{recovered biomass} is the lignin content in the pretreated biomass (% of dried weight) and *lignin content*_{biomass} is the lignin content in biomass subjected to pretreatment (% of dried weight).

2.3 Enzymatic saccharification

The recovered polysaccharide-rich fractions were autoclaved at 121 °C for 15 min and then used in enzymatic hydrolysis assays using with the enzymatic cocktail prepared as described above. These experiments were performed with a solid loading of 5% w·v⁻¹ in 4 mL total volume (sterile 50 mM sodium citrate buffer, pH 5.0, containing the enzymatic cocktail with an overall activity of at least: (578 CMC U + 1160 ABX U + 311 pNPG U) per gram of pre-treated biomass). The enzymatic saccharification was performed in 15 mL Falcon tubes, on an orbital shaker, at 50 °C and 150 rpm for 72 h. Control samples containing recovered solids in buffer without enzyme cocktail and enzyme cocktail in buffer without biomass were also incubated. After 72 h the enzymatic liquors were centrifuged (15000 rpm for 15 min) and the supernatants were analysed by high-performance liquid chromatograph (HPLC) as described in section 2.5. The enzymatic hydrolysis yield or more precisely glucan to glucose yield was calculated using the formula presented in eq 3.

$$\text{Glucan to glucose yield (mol \%)} = \frac{162/180 \times [\text{glucose}] \times V}{m_{\text{recovered material}} \times \text{glucan content}} \times 100 \quad (3)$$

where $[\text{glucose}]$ is the glucose concentration detected in the hydrolysate in g·L⁻¹, V is the volume of the solution in L, $m_{\text{recovered material}}$ is the dry weight of biomass used in the enzymatic hydrolysis expressed in g, and *glucan content* is the glucan fraction in recovered material

(% of dried weight) prior to enzymatic hydrolysis.

2.4 Analytical methods

2.4.1 Characterization of elephant grass and recovered materials

The composition of elephant grass was previously described elsewhere¹² and was as follows: cellulose, considered as glucan, $34.6 \pm 0.1\%$ w·w⁻¹; hemicellulose, as the sum of xylan ($16.3 \pm 0.4\%$ w·w⁻¹) arabinan ($3.2 \pm 0.2\%$ w·w⁻¹) and acetyl groups ($4.8 \pm 0.6\%$ w·w⁻¹), $24.3 \pm 0.6\%$ w·w⁻¹; Klason lignin as acid-insoluble lignin, $15.7 \pm 0.2\%$ w·w⁻¹; ash, $10.1 \pm 0.1\%$ w·w⁻¹; proteins, $2.1 \pm 0.0\%$ w·w⁻¹; water-soluble extractives, $18.7 \pm 0.3\%$ w·w⁻¹ and ethanol-soluble extractives, $3.2 \pm 0.0\%$ w·w⁻¹; moisture, $7.3 \pm 0.3\%$ w·w⁻¹.

Recovered polysaccharide fractions were ground in a knife mill to a particle size smaller than 0.5 mm. Moisture content was determined by drying at 100 ± 5 °C for at least 18 h to a constant weight. All recovered materials were characterised for cellulose (as glucan) and hemicellulose (as sum of xylan, arabinan and acetyl groups) contents which were determined after treatment with 72% w·w⁻¹ H₂SO₄ following the procedure presented elsewhere.¹³ HPLC was used to examine the sugars and acetic acid contents. The HPLC Agilent 110 series (Santa Clara, CA, USA) equipped with Bio-Rad Aminex HPX-87H column (Hercules, CA, USA) and a refractive index (RI) detector were used. The set conditions of the column were 50 °C, 0.4 mL·min⁻¹ flow rate with 5 mM H₂SO₄ as mobile phase. The injection volume was 20 µL with a run of 30 min. The acid insoluble residue was considered as Klason lignin after correction for the acid insoluble ash.¹⁴ Water and ethanol extractives were determined according to the standard methods.¹⁵ Protein quantification was carried out by Kjeldahl method using the $N \times 6.25$ conversion factor.¹⁶ Ash content in the materials was determined according to the NREL/TP-510-42622 standard method.¹⁷

2.4.2 Characterisation of enzymatic liquors

Enzymatic liquors were analysed using the same HPLC as described above at 50 °C with 0.6 mL·min⁻¹ flow rate and 5 mM H₂SO₄ as mobile phase and a refractive index detector to inspect sugar content. All samples were analysed in duplicate.

2.5 Experimental design and statistical analysis

Response surface methodology was used for statistical treatment of the results of pretreatment, namely delignification yield. For this purpose, the multiple regression analysis was employed using Microsoft Excel software. The 2² central composite circumscribed design made of a factorial design and axial points was used. The variable values were coded and normalised in unitary values; -1 is defined as the lowest value of a variable and +1 is defined as the highest value. From these extreme variable values, the central point (coded 0) was set and assayed in duplicate. The axial points were distributed at a distance of $n^{1/2}$ from the central point, where $n = 2$ and is the number of variables as presented in Figure 1. Reaction temperature (°C) and time (min) were selected as independent variables. The experimental design domain was determined based on previous work.¹⁰ A second-order polynomial model (eq 4) was used to fit of the experimental data and to model the optimal reaction conditions.

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{12}X_1X_2 \quad (4)$$

where Y is the predicted response (delignification yield), X₁ and X₂ are independent variables (temperature and time), b₀ is a regression coefficient at central point, b₁ and b₂ are the linear coefficients of temperature (variable 1) and time (variable 2), b₁₁ and b₂₂ are quadratic coefficients of X₁ and X₂, b₁₂ = b₂₁ is the interaction coefficient between variables 1 and 2.

The statistical significance of regression coefficients and effects was verified using analysis of variance (ANOVA).

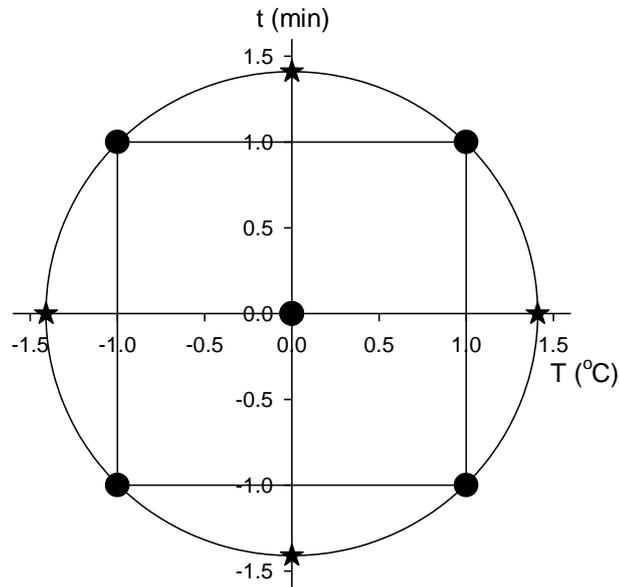


Figure 1. Factorial experimental design (square domain) plus axial points (circular domain) of rotational central composite design.

2.6 Errors

Standard uncertainty (u) was determined for all obtained results. Each weighing was made with a $u(m) = 0.1$ mg. All pretreatments were made with a $u(T) = 1$ °C and a $u(p) = 1$ bar. All other experimental errors related to measurements depended on the calibration technique used to quantify the concentrations of products and an arbitrary error of 10% of measured value was estimated for all analyses.

3. Results and discussion

3.1 Effect of pretreatment on the composition of recovered solids and biomass delignification

The use of imidazole as solvent for elephant grass fractionation resulted in a polysaccharide fraction, composed mostly by cellulose. Figure 2 presents the influence of

reaction temperature and time on the polysaccharide fraction composition. As it can be observed, the cellulose and lignin contents vary depending on temperature and time. The cellulose content (Figure 2a) increases with an increase of reaction temperature and time from 40.3% $w\cdot w^{-1}$ (114.4 °C and 57 min) to 52.5% $w\cdot w^{-1}$ (135.6 °C and 308 min), whereas lignin content (Figure 2b) drops from 9.4% $w\cdot w^{-1}$ at 125.0 °C and 5.0 min to 4.6% $w\cdot w^{-1}$ at 135.6 °C and 308 min.

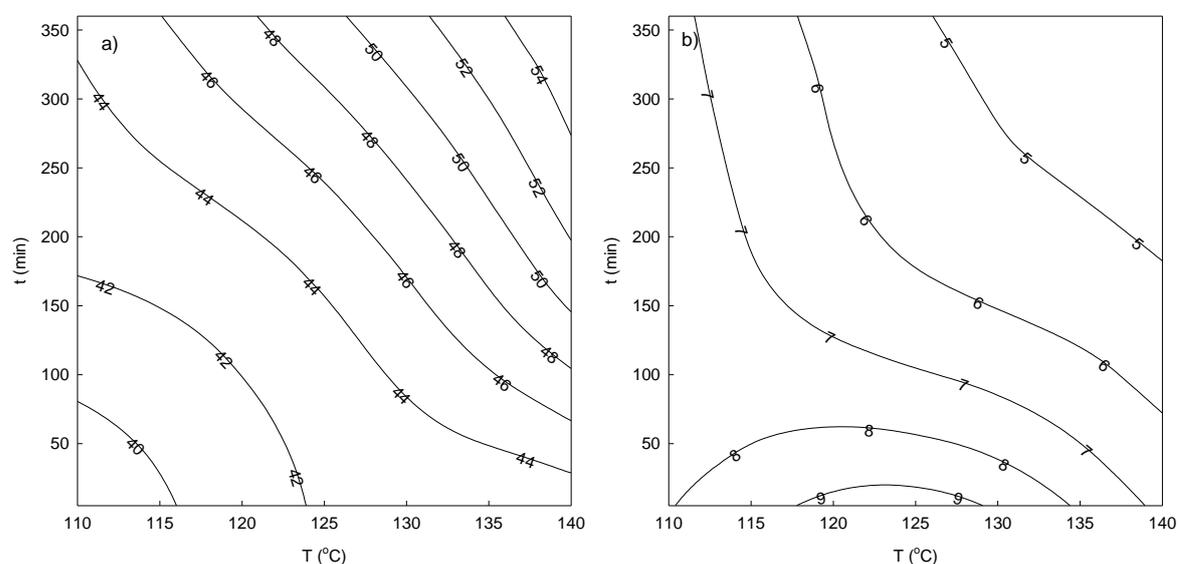


Figure 2. Cellulose (a) and lignin (b) contents (% $w\cdot w^{-1}$) in polysaccharide-rich fraction as function of the reaction conditions.

Similar to cellulose, more severe reaction conditions contributed to higher lignin extraction yield as depicted in Figure 2b). It can be also observed that even under milder reaction conditions, for example, 125.0 °C and 5 min, 50.7% $w\cdot w^{-1}$ of initial lignin was removed. For severer conditions, such as 135.6 °C and 308.4 min, 81.8% $w\cdot w^{-1}$ of initial lignin was extracted. It is important to point out that similar phenomena has been reported for wheat straw processing with imidazole.¹⁰ For conditions comparable to those studied in this work, that is, 110.0 °C and 120 min, 54.5% $w\cdot w^{-1}$ and 15.8% $w\cdot w^{-1}$ extraction of initial lignin

and hemicellulose, respectively, was reported. Morais *et al.* showed also that further increase in temperature augmented biomass delignification up to 92.8% w·w⁻¹ at 170.0 °C and 60 min of reaction time. The authors also investigated the imidazole processing under similar conditions to those studied in this work, that is, 140 °C and 120 min. They reported an lignin extraction of 83.7% w·w⁻¹ of initial lignin content¹⁰ which is in an agreement with data found for elephant grass presented in this work (81.0% w·w⁻¹ of initial lignin content obtained at 140 °C and 182.5 min). When comparing this data to those obtained for the most commonly used ethanol-assisted organosolv processes, it can be stated that the imidazole-based process is effective for delignification of biomass. For instance, wheat straw pretreatment with 50% w·w⁻¹ EtOH at 190 °C for 60 min and 30 mM H₂SO₄, resulted in 75.8% w·w⁻¹ of delignification.¹⁸ Obama *et al.* investigated the effect of 80% v·v⁻¹ of EtOH and 1% w·w⁻¹ H₂SO₄ in lignin extraction from *Miscanthus x giganteus*.¹⁹ The authors reported a delignification yield as high as 93% w·w⁻¹, under 170 °C for 60 min, which is comparable to those obtained in the present work. Additionally, under similar operational conditions and with 0.5% w·w⁻¹ H₂SO₄ as catalyst, Brosse *et al.* reported a delignification yield of 70.0% w·w⁻¹.²⁰ It is important to highlight that in both above-referred works, temperature was much higher than that used in this work and additional external catalysts were used. Hence, comparing the literature data to those obtained in this work, it can be concluded that imidazole is an efficient delignification solvent, even at mild temperatures and with no need of catalyst. It is also worth to point out that Koo *et al.* obtained in a process with 1% of H₂SO₄ and 50% w·w⁻¹ of EtOH at 140 °C and 50 min a maximal delignification of 43.4% w·w⁻¹ for *Liriodendron tulipifera*.²¹ Further increase in temperature to 150 °C in the EtOH organosolv process catalysed by 95 mM H₂SO₄, resulted in the highest lignin extraction of 79.1% w·w⁻¹ of initial lignin content in *Liriodendron tulipifera*.²² Concerning other systems reported in literature,⁸ none of the reported organosolv processes is so efficient at low temperatures as

this with imidazole, except those using organic acids and catalysed by mineral acids or oxygenated water.⁸ The main advantage of those systems is the use of mild temperatures (<100 °C) and delignification yields are similar or superior to those presented herein (up to 96.9% w·w⁻¹).²³⁻²⁷ However, it is worth to highlight that in such systems, extensive downstream processing is required making the process costly and less environmentally acceptable.

Additionally, imidazole, as precursor of ionic liquids, can also be considered as a cheaper alternative to ionic liquids in biomass processing.^{10,11} Hence, it is important to compare data obtained in this work to those reported for ionic liquids. For instance, Li *et al.* obtained a delignification yield of 69.2% w·w⁻¹ in the pretreatment of switchgrass (*Panicum virgatum L.*) with 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate (0.3 g of biomass and 9.7 g of ionic liquid, that is, 3% w·w⁻¹) at 160 °C and 3 h.²⁸ Another work, the pretreatment of wheat straw with the same ionic liquid at 120 °C and 6 h produced a cellulose-rich fraction composed by only 13.8% w·w⁻¹ of lignin present in the native biomass.²⁹ These examples show that imidazole is an equally efficient alternative to classical organosolv processes as well as to novel solvents, such as ionic liquids.

The obtained results showed an additional interesting behaviour concerning the hemicellulose content in the polysaccharide fraction. In the range of the examined reaction conditions, the hemicellulose content in the recovered polysaccharide fraction varied less than 3% w·w⁻¹ (22.5% w·w⁻¹ for 110.0 °C and 182.5 min vs. 25.0% w·w⁻¹ for 125.0 °C and 5.0 min), while for the same range of reaction conditions, cellulose content increases by 12.2% w·w⁻¹. This fact suggests that hemicellulose is less susceptible than cellulose to imidazole processing. However, to analyse it thoroughly, a comparison of the polysaccharide fraction composition and the solid recovery yield is required. Similar to cellulose and lignin contents in polysaccharide fraction, the solid recovery is highly dependent on the reaction conditions

decreasing with an increase of reaction severity (Figure 3). The highest recovery yield (82.4% $w \cdot w^{-1}$) was found for the experiments performed at 114.4 °C and 57 min, while for severer conditions (140 °C and 182.5 min) the obtained solid recovery yield was only 59.9% $w \cdot w^{-1}$.

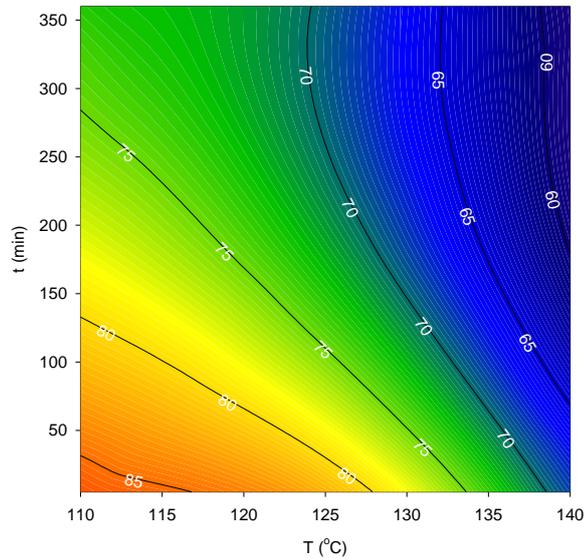


Figure 3. Solid fraction recovery yield (% $w \cdot w^{-1}$) as a function of reaction temperature and time.

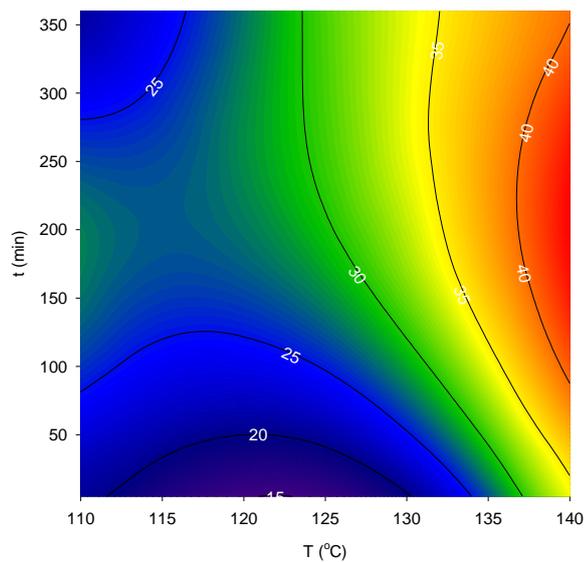


Figure 4. Hemicellulose extraction (% $w \cdot w^{-1}$) as a function of reaction time and temperature.

As aforementioned above, although hemicellulose content in the recovered polysaccharide fraction varied less than 3% $w \cdot w^{-1}$, the hemicellulose recovery yield has changed considerably. The effective hemicellulose removal is shown in Figure 4 confirming that hemicellulose removal varied from 15% $w \cdot w^{-1}$ to more than 40% $w \cdot w^{-1}$ of initial hemicellulose content in the native elephant grass.

3.2 Modelling of biomass delignification

Statistical approach to model delignification of elephant grass with imidazole was done using response surface methodology.³⁰ As above-mentioned, to determine the influence of independent variables (temperature and time, X_1 and X_2 , respectively), a 2^2 central composite circumscribed design was used. The goodness-of-fit model was very high and equalled 0.957. It confirms the adequateness of the selected model to the experimental data. Figure 5 presents the Pareto chart of standardised linear, quadratic, and interaction effects of the independent process variables according to the absolute magnitude in relation to the statistical significance (p -level < 0.05).

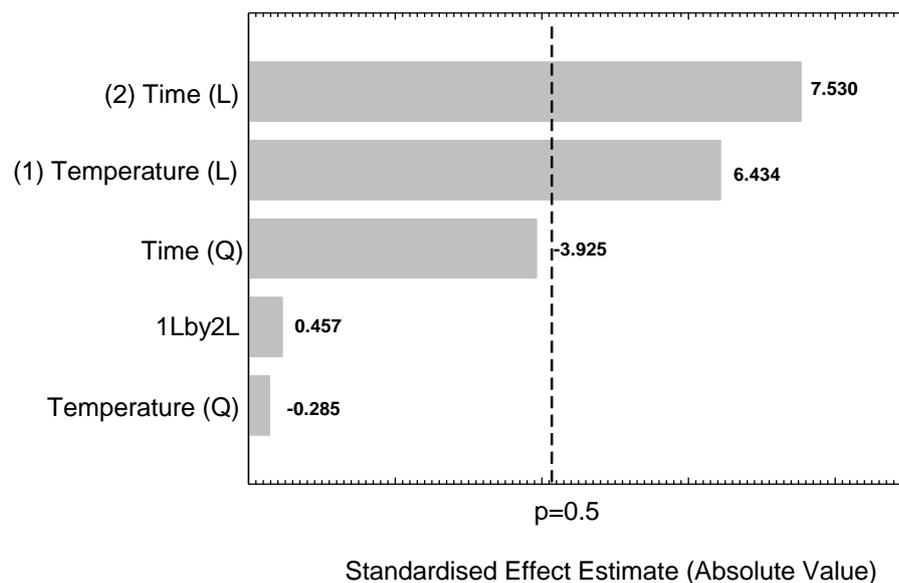


Figure 5. Pareto chart of standardised effects for delignification yield.

As it can be observed in Figure 5, delignification yield is highly influenced by reaction temperature (linear) and time (linear). The quadratic effect of reaction time is slightly below the confidence level of 95% as its p-value = 0.055, however, as observed in Figure 6, it has a clear influence on the delignification yield. The statistical significance of estimated effects was verified by analysis of variance (ANOVA) as presented in Table 1.

Table 1. ANOVA of estimated linear, quadratic, and interaction effects for delignification yield.

| Factor | Estimated effect | t-Test | p |
|---|------------------|---------|--------|
| Temperature (b ₁) | 6.4340 | 5.8297 | 0.0043 |
| Time (b ₂) | 7.5301 | 6.8229 | 0.0024 |
| Temperature ² (b ₁₁) | -0.2852 | -0.1954 | 0.8546 |
| Time ² (b ₂₂) | -3.9248 | -2.6882 | 0.0548 |
| Temperature x Time (b ₁₂) | 0.4570 | 0.2928 | 0.7842 |

The low p-values ($p < 0.01$) of the main effects, temperature and time, indicate strong statistical significance of the estimated relations between variables within a 99% confidence interval. To determine the optimum conditions to obtained high delignification yield, the second-order polynomial model (eq 5) was fitted to experimental data and regression coefficients were calculated by multiple regression analysis. Figure 6 shows the three-dimensional response surface and the corresponding contour plots obtained on the basis of eq 4. This illustrates modeled effect of reaction temperature and time on the delignification yield.

$$Y = 72.894 + 6.434X_1 + 7.530X_2 - 0.285X_1^2 - 3.925X_2^2 + 0.457X_1X_2 \quad (5)$$

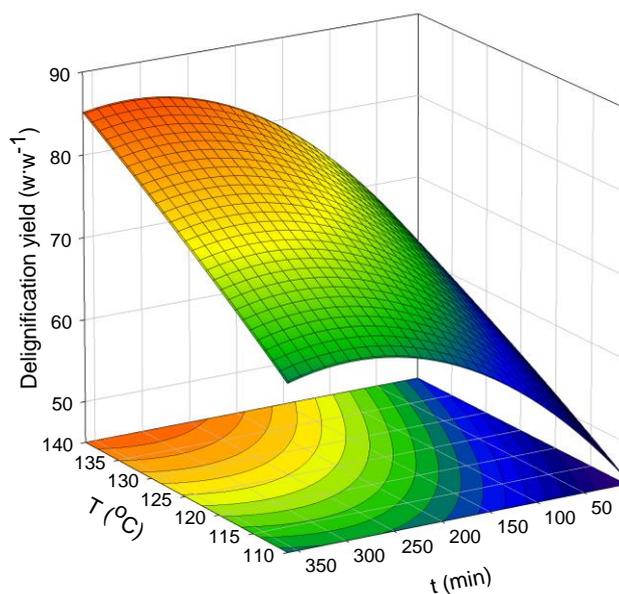


Figure 6 Response surfaces and contour plots of modelled delignification yield as a function of reaction time and temperature.

Analysing the statistical modelling data, it can be concluded that both reaction temperature and time have a strong positive linear influence on the delignification yield. Additionally, a quadratic effect of time can be observed. To determine the maximal delignification yield for the range of temperature and time scrutinised in this work, partial differentiation of the multivariate function described by eq 5 was done. It allowed finding an optimal combination of the independent process variables for maximum delignification using eqs 6 and 7

$$\frac{\partial Y}{\partial X_1} = 6.434 - 0.570X_1 + 0.457X_2 = 0 \quad (6)$$

$$\frac{\partial Y}{\partial X_2} = 7.530 - 7.850X_2 + 0.457X_1 = 0 \quad (7)$$

The resolution of eqs 6 and 7 revealed the optimal condition of delignification, which is 140 °C and 313.2 min. For these conditions, a maximal delignification yield of 85.7 w·w⁻¹ is

expected, that is only 4% higher than those obtained at 135.6 °C and 308 min or 140 °C and 182.5 min herein.

3.3 Enzymatic saccharification

The above-referred findings confirm that imidazole is highly efficient solvent for lignin extraction. Hence, in an effort to examine the influence of lignin extraction on digestibility of polysaccharide fractions, the enzymatic saccharification experiments were carried out according to the method described above. The obtained results are shown in Table 2.

Table 2. Glucan conversion yields (mol %) obtained from enzymatic hydrolysis of polysaccharide fraction produced under various experimental conditions.

| Conditions | | Glucan conversion yield (mol %) |
|------------|---------|---------------------------------|
| T (°C) | t (min) | |
| 114.4 | 308.0 | 60.3 |
| 114.4 | 57.0 | 27.3 |
| 135.6 | 308.0 | 80.6 |
| 135.6 | 57.0 | 55.5 |
| 110.0 | 182.5 | 39.0 |
| 140.0 | 182.5 | 67.4 |
| 125.0 | 5.0 | 19.4 |
| 125.0 | 360.0 | 61.1 |
| 125.0 | 182.5 | 59.7 |
| 125.0 | 182.5 | 72.2 |

The obtained results show that enzymatic digestibility of polysaccharide fractions is strongly dependent on the reaction conditions. Table 2 shows that with an increase in reaction temperature and time the enzymatic digestibility of produced solids increases. On the other

hand, this tendency is expectable since either temperature or time affect the composition of the recovered solids as it was discussed above. Hence, the obtained results of enzymatic hydrolysis and the organosolv pretreatment confirm that, indeed, one of the main factors influencing the enzymatic hydrolysis is lignin. This data show that extensive removal of lignin favours glucan to glucose conversion. Figure 7 illustrates the effect of biomass delignification on the efficiency of enzymatic digestibility. As it can be observed, there is good linear relation ($R^2 = 0.9$) between the delignification yield and the glucan to glucose yield. This confirms that lignin is one of the most important inhibitors for an efficient enzymatic hydrolysis because of nonproductive cellulases adsorption on lignin³¹, which is also irreversible,^{32,33} reducing the effective concentration of cellulase in enzymatic hydrolysis.

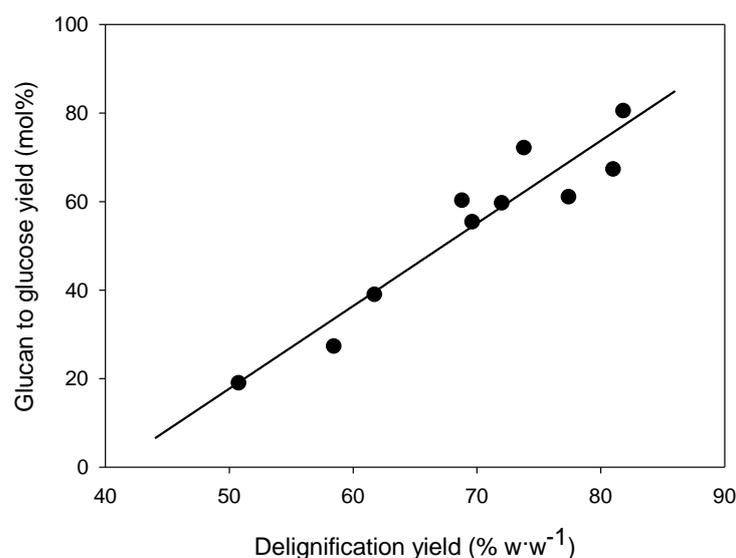


Figure 7. Correlation between the delignification yield and the enzymatic digestibility of polysaccharide fraction. The solid line illustrates the linear relation ($R^2 = 0.9$) between glucan to glucose yield (mol %) and delignification yield (% w·w⁻¹).

The enzymatic hydrolysis of *Liriodendron tulipifera* pretreated under similar conditions used in this work, that is, up to 140 °C and 360 min, but with 50 % w·w⁻¹ EtOH catalysed by either 1% w·w⁻¹ H₂SO₄²¹ or 1% w·w⁻¹ NaOH³⁴ resulted in 65-68 mol % glucan to

glucose yield. When sugarcane bagasse was pretreated at 130 °C for 60 min with a mixture of glycerol and water up to 20% w·w⁻¹ and catalysed by HCl (from 0.4 to 1.2% w·w⁻¹), the glucan conversion yield was superior to 80.1 mol %.³⁵ In case of pretreatment of *Miscanthus x giganteus* with a mixture composed of 40% v·v⁻¹ formic acid 40% v·v⁻¹ acetic acid and 20% v·v⁻¹ of water at 107 °C for 3 h, the enzymatic conversion of cellulose was as high as 75.3 wt.%.²⁴ All these results show that imidazole, even at mild reaction conditions, and without the use of additional catalyst, gave results comparable to those reported in literature.

Little information has been published so far on the pretreatment of elephant grass.³⁶⁻³⁹ Similar results were obtained by Scholl *et al.*, who investigated the effect of steam-explosion pretreatment for elephant grass.³⁹ Under optimal conditions, 200°C and 10 min, a reducing sugar yield of 86% w·w⁻¹ after enzymatic hydrolysis was obtained. A glucose yield of elephant grass of 57.8 mol % from hydrothermal pretreatment at 195°C and 10 min, was obtained, which is significantly lower than that obtained in this work.³⁶ The comparison of these reports to data obtained herein confirms again that imidazole processing is advantageous over more energy-extensive hydrothermal processes mainly because of less severe reaction conditions with similar or even better sugar yields obtained after the enzymatic hydrolysis. Another innovative aspect is the specific solubilisation of lignin without apparently little or no effect on the carbohydrate structures, whereby no degradation products such as furfural or 5-hydroxymethylfurfural were found. A possible mechanistic approach is given below. According to its chemical structure imidazole can act as a nucleophile (alkaline behaviour) and increase the electrophilicity of, for example, ester linkages between lignin and hemicellulose, while the nitrogen bound proton can establish hydrogen bonds with the leaving group (*e.g.* a sugar rest from hemicellulose) and thus facilitate depolymerisation reactions. This means that imidazole beside its solvating effect acts also as a (alkaline) catalyst. Acetals, the main bond type between monosaccharides in hemicellulose and cellulose, are less

susceptible to alkaline catalysis, which might explain the almost intact structure of the polysaccharides and the preferential removal of lignin. This proposed basic catalytic mechanism also explains the complete deacetylation of hemicellulose as found in this work. Although amphoteric (it can function as a base and as an acid) imidazole is a more alkaline agent (aqueous solution exhibit $\text{pH} \geq 10$). Because of its planar aromatic structure imidazole interacts well with the aromatic structure of lignin promoting its dissolution and further depolymerisation. The literature search shows no data about the chemical mechanism of lignin extraction with imidazole and as such no mechanistic route of the process was suggested so far. Thus, a more detailed analysis to reveal the exact mechanism of the reactions with imidazole is still necessary to develop this technology.

4. Conclusions

Imidazole confirmed to be an efficient solvent for delignification of elephant grass. At temperatures up to 140 °C and reaction times up to 6 h more than 4/5 of initial lignin content was removed. Besides, the cellulose content in the produced polysaccharide fractions increased up to 52.5% w·w⁻¹. This, in turn created favourable conditions for enzymatic digestibility. Lignin-free fractions from elephant grass solids were easily hydrolysed by commercial enzyme cocktails achieving a maximal hydrolysis yield of 80.6 mol % after 72 hours of enzymatic saccharification.

The obtained results prove that imidazole is an efficient alternative solvent leading to extensive delignification of lignocellulosic biomass, even at moderate temperature, to produce polysaccharide-rich materials can be easily converted to upgradable sugars.

Acknowledgements

This contribution was identified by Session Chair Luiz Pereira Ramos (Federal

University of Parana, Brazil) as the Best Presentation in the session “Biomass for the Future” of the 2016 ACS Fall National Meeting in Philadelphia, PA. This work was supported by the Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT/MEC, Portugal) through SFRH/BD/94297/2013, IF/00471/2015 grants and by BBRI - Biomass and Bioenergy Research Infrastructure (ROTEIRO/0189/2013) and the Associated Laboratory for Sustainable Chemistry - Clean Processes and Technologies - LAQV which is financed by national funds from FCT/MEC (UID/QUI/50006/2013) and cofinanced by the ERDF under the PT2020 Partnership Agreement (POCI-01-0145-FEDER - 007265). Authors wish to thank to FCT/MEC and CAPES (Brazil) for financing Bilateral Cooperation Portugal/Brazil project (FCT/1909/27/2/2014/S and CAPES 371/14, AUXPE Nr 0005/2015, project 23038.002463/2014-98). J.A., M.C. and A.J.P.D. would like to thank CNPq for their Research Grants. Authors also wish to thank Prof. Ricardo Andrade Rebelo from Universidade Regional de Blumenau for fruitful discussion about the mechanism of the imidazole process, Belina Ribeiro for help in enzymatic hydrolysis analyses and Maria do Céu Penedo for support of laboratory activities.

References

- (1) Sanchez, O. J.; Cardona, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresour. Technol.* **2008**, *99*, 5270–5295.
- (2) Bozell, J. J.; Petersen, G. R. Technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates-the US Department of Energy’s “Top 10” revisited. *Green Chem.* **2010**, *12*, 539–554.
- (3) Silveira, M. H. L.; Morais, A. R. C.; da Costa Lopes, A. M.; Oleksyszzen, D. N.; Bogel-Lukasik, R.; Andraus, J.; Pereira Ramos, L. Current Pretreatment Technologies for the Development of Cellulosic Ethanol and Biorefineries. *ChemSusChem* **2015**, *8*, 3366–3390.
- (4) Agbor, V. B.; Cicek, N.; Sparling, R.; Berlin, A.; Levin, D. B. Biomass pretreatment: fundamentals toward application. *Biotechnol. Adv.* **2011**, *29*, 675–685.
- (5) Girio, F. M.; Fonseca, C.; Carvalheiro, F.; Duarte, L. C.; Marques, S.; Bogel-Lukasik, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 4775–4800.

- (6) Galbe, M.; Zacchi, G. Pretreatment: The key to efficient utilization of lignocellulosic materials. *Biomass Bioenergy* **2012**, 46, 70–78.
- (7) Morais, A. R. C.; da Costa Lopes, A. M.; Bogel-Lukasik, R. Carbon Dioxide in Biomass Processing: Contributions to the Green Biorefinery Concept. *Chem. Rev.* **2015**, 115, 3–27.
- (8) Zhang, Z.; Harrison, M. D.; Rackemann, D. W.; Doherty, W. O.; O'Hara, I. M. Organosolv pretreatment of plant biomass for enhanced enzymatic saccharification. *Green Chem.* **2016**, 18, 360–381.
- (9) Calvo-Flores, F. G.; Dobado, J. A. Lignin as renewable raw material. *ChemSusChem* **2010**, 3, 1227–1235.
- (10) Morais, A. R. C.; Vaz Pinto, J.; Nunes, D.; Roseiro, L. B.; Oliveira, M. C.; Fortunato, E.; Bogel-Lukasik, R. Imidazole: Prospect Solvent for Lignocellulosic Biomass Fractionation and Delignification. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2016**, 4, 1643–1652.
- (11) Jordan, T.; Schmidt, S.; Liebert, T.; Heinze, T. Molten imidazole - a starch solvent. *Green Chem.* **2014**, 16, 1967–1973.
- (12) Toscan, A.; Morais, A. R. C.; Paixão, S. M.; Alves, L.; Andreus, J.; Dillon, A. J. P.; Lukasik, R. M.; Camassola, M. High-pressure carbon dioxide/water pre-treatment of sugarcane bagasse and elephant grass: assessment of the effect of biomass composition on process efficiency. *Bioresour. Technol.* **2017**, 224, 639–647.
- (13) Browning, B. L. Chemistry of Wood. *Methods in Wood Chemistry*; Sarkanen, K. V., Ludwig, C. H., Eds.; John Wiley & Sons: New York, **1967**; p 795.
- (14) Sluiter, A.; Hames, B.; Ruiz, R.; Scarlata, C.; Sluiter, J.; Templeton, D. *Determination of Sugars, Byproducts, and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples—Laboratory Analytical Procedure (LAP)*; NREL/TP-510-42623; National Renewable Energy Laboratory: Colorado, **2006**.
- (15) Sluiter, A.; Ruiz, R.; Scarlata, C.; Sluiter, J.; Templeton, D. *Determination of Extractives in Biomass—Laboratory Analytical Procedure (LAP)*; NREL/TP-510-42619; National Renewable Energy Laboratory: Colorado, **2005**.
- (16) *Milk and milk products - Determination of nitrogen content – Part 1: Kjeldahl principle and crude protein calculation*. ISO 8968-1:2014. International Organization for Standardization, **2014**.
- (17) Sluiter, A.; Hames, B.; Ruiz, R.; Scarlata, C.; Sluiter, J.; Templeton, D. *Determination of Ash in Biomass*; NREL/TP-510-42622; National Renewable Energy Laboratory - NREL: Colorado, **2005**.
- (18) Wildschut, J.; Smit, A. T.; Reith, J. H.; Huijgen, W. J. Ethanolbased organosolv fractionation of wheat straw for the production of lignin and enzymatically digestible cellulose. *Bioresour. Technol.* **2013**, 135, 58–66.
- (19) Obama, P.; Ricochon, G.; Muniglia, L.; Brosse, N. Combination of enzymatic hydrolysis and ethanol organosolv pretreatments: Effect on lignin structures, delignification yields and cellulose-to-glucose conversion. *Bioresour. Technol.* **2012**, 112, 156–163.
- (20) Brosse, N.; Sannigrahi, P.; Ragauskas, A. Pretreatment of *Miscanthus x giganteus* using the ethanol organosolv process for ethanol production. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2009**, 48, 8328–8334.

- (21) Koo, B.-W.; Min, B.-C.; Gwak, K.-S.; Lee, S.-M.; Choi, J.-W.; Yeo, H.; Choi, I.-G. Structural changes in lignin during organosolv pretreatment of *Liriodendron tulipifera* and the effect on enzymatic hydrolysis. *Biomass Bioenergy* **2012**, *42*, 24–32.
- (22) Jang, S.-K.; Kim, H.-Y.; Jeong, H.-S.; Kim, J.-Y.; Yeo, H.; Choi, I.-G. Effect of ethanol organosolv pretreatment factors on enzymatic digestibility and ethanol organosolv lignin structure from *Liriodendron tulipifera* in specific combined severity factors. *Renewable Energy* **2016**, *87*, 599–606.
- (23) Yu, G.; Li, B.; Liu, C.; Zhang, Y. D.; Wang, H. S.; Mu, X. D. Fractionation of the main components of corn stover by formic acid and enzymatic saccharification of solid residue. *Ind. Crops Prod.* **2013**, *50*, 750–757.
- (24) Vanderghem, C.; Brostaux, Y.; Jacquet, N.; Blecker, C.; Paquot, M. Optimization of formic/acetic acid delignification of *Miscanthus× giganteus* for enzymatic hydrolysis using response surface methodology. *Ind. Crops Prod.* **2012**, *35*, 280–286.
- (25) Snelders, J.; Dornez, E.; Benjelloun-Mlayah, B.; Huijgen, W. J.; de Wild, P. J.; Gosselink, R. J.; Gerritsma, J.; Courtin, C. M. Biorefining of wheat straw using an acetic and formic acid based organosolv fractionation process. *Bioresour. Technol.* **2014**, *156*, 275–282.
- (26) Villaverde, J. J.; Li, J.; Ligeró, P.; Ek, M.; de Vega, A. Mild peroxyformic acid fractionation of *Miscanthus× giganteus* bark. Behaviour and structural characterization of lignin. *Ind. Crops Prod.* **2012**, *35*, 261–268.
- (27) Ferrer, A.; Vega, A.; Rodríguez, A.; Jiménez, L. Acetosolv pulping for the fractionation of empty fruit bunches from palm oil industry. *Bioresour. Technol.* **2013**, *132*, 115–120.
- (28) 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. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 4900–6.
- (29) da Costa Lopes, A. M.; Joao, K. G.; Rubik, D. F.; Bogel-Lukasik, E.; Duarte, L. C.; Andraus, J.; Bogel-Lukasik, R. Pre-treatment of lignocellulosic biomass using ionic liquids: wheat straw fractionation. *Bioresour. Technol.* **2013**, *142*, 198–208.
- (30) Myers, R. H.; Montgomery, D. C.; Anderson-Cook, C. M. *Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments*. John Wiley & Sons: New York, **2016**.
- (31) Rahikainen, J. L.; Evans, J. D.; Mikander, S.; Kalliola, A.; Puranen, T.; Tamminen, T.; Marjamaa, K.; Kruus, K. Cellulase–lignin interactions The role of carbohydrate-binding module and pH in non-productive binding. *Enzyme Microb. Technol.* **2013**, *53*, 315–321.
- (32) Gao, D.; Haarmeyer, C.; Balan, V.; Whitehead, T. A.; Dale, B. E.; Chundawat, S. P. Lignin triggers irreversible cellulase loss during pretreated lignocellulosic biomass saccharification. *Biotechnol. Biofuels* **2014**, *7*, 1.
- (33) Tu, M.; Pan, X.; Saddler, J. N. Adsorption of cellulase on cellulolytic enzyme lignin from lodgepole pine. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 7771–7778.
- (34) Koo, B.-W.; Kim, H.-Y.; Park, N.; Lee, S.-M.; Yeo, H.; Choi, I.-G. Organosolv pretreatment of *Liriodendron tulipifera* and simultaneous saccharification and fermentation for bioethanol production. *Biomass Bioenergy* **2011**, *35*, 1833–1840.

(35) Zhang, Z.; Wong, H. H.; Albertson, P. L.; Doherty, W. O.; O'Hara, I. M. Laboratory and pilot scale pretreatment of sugarcane bagasse by acidified aqueous glycerol solutions. *Bioresour. Technol.* **2013**, 138, 14–21.

(36) Bensah, E. C.; Kádár, Z.; Mensah, M. Y. Ethanol production from hydrothermally-treated biomass from West Africa. *BioResources* **2015**, 10, 6522–6537.

(37) Menegol, D.; Scholl, A. L.; Dillon, A. J. P.; Camassola, M. Influence of different chemical pretreatments of elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum.) used as a substrate for cellulose and xylanase production in submerged cultivation. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2016**, 39, 1455–1464.

(38) Scholl, A. L.; Menegol, D.; Pitarelo, A. P.; Fontana, R. C.; Filho, A. Z.; Ramos, L. P.; Dillon, A. J. P.; Camassola, M. Elephant grass pretreated by steam explosion for inducing secretion of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum* S1M29 solid-state cultivation. *Ind. Crops Prod.* **2015**, 77, 97–107.

(39) Scholl, A. L.; Menegol, D.; Pitarelo, A. P.; Fontana, R. C.; Filho, A. Z.; Ramos, L. P.; Dillon, A. J. P.; Camassola, M. Ethanol production from sugars obtained during enzymatic hydrolysis of elephant grass (*Pennisetum purpureum*, Schum.) pretreated by steam explosion. *Bioresour. Technol.* **2015**, 192, 228–237.

4.3 Artigo 3: New proposal of two-stage pretreatment for the fractionation of lignocellulosic components using hydrothermal pretreatment followed by imidazole delignification

O artigo se encontra em fase de revisão pelos autores e será submetido a periódico internacional a ser definido.

New proposal of two-stage pretreatment for the fractionation of lignocellulosic components using hydrothermal pretreatment followed by imidazole delignification

Andréia Toscan^a, Roselei Claudete Fontana^a, Jürgen Andreaus^b, Rafal M. Lukasik^c, Marli Camassola^a, Aldo José Pinheiro Dillon^{a*}

^a Universidade de Caxias do Sul, Laboratório de Enzimas e Biomassa, 95070-560 Caxias do Sul, RS, Brasil

^b Universidade Regional de Blumenau, Departamento de Química, 89012-900 Blumenau, SC, Brasil

^c Laboratório Nacional de Energia e Geologia, Unidade de Bioenergia, 1649-038 Lisboa, Portugal

Abstract

The use of the combination of hydrothermal pretreatment followed by delignification with imidazole is evaluated for the first time as a potential selective two-stage fractionation for elephant grass, aiming at obtaining purer fractions susceptible to conversion to high value-added products. In addition to the effective separation of the main constituents of lignocellulosic biomass, the recovery of cellulose and hemicelluloses and enzymatic hydrolysis yield of pretreated elephant grass were evaluated. Liquid hot water pretreatment at 180 °C in non-isothermal condition allowed obtaining a liquor rich in xylooligosaccharides (5.5 g.L⁻¹) and glucooligosaccharides (3.1 g.L⁻¹), also containing 1.8 g.L⁻¹ of xylose and 1.3 g.L⁻¹ of arabinose. Subsequent treatment with imidazole at 140 °C for 182.5 min resulted in 83.8% delignification, generating a solid fraction with enrichment of 97.7% of the cellulose. Two-stage pretreatment technique also resulted in solids with high enzymatic digestibility especially when treated under less severe conditions in the first stage. The maximum

enzymatic conversions observed were higher than 99.0% using the commercial enzymatic complex Cellic CTec2 and 96.3% using the enzymatic complex of *Penicillium echinulatum*. The combination of the two processes favors the use of less severe conditions during the hydrothermal pretreatment, resulting in a lower degradation of the constituent sugars.

Keywords: biorefinery, cellulose, hemicelluloses, oligosaccharides, enzymatic hydrolysis

1. Introduction

Lignocellulosic biomass appears at the beginning of this third millennium as an important energy and chemical alternative to substitute fossil fuel sources. The potential of these materials is mainly associated with its high availability, low cost and composition rich in cellulose, hemicelluloses and lignin. There is a great diversity of materials classified as lignocellulosic, among which are softwood and hardwood, as well as residues from forest management, perennial grasses, agricultural, industrial and municipal waste (Maity, 2015; Mohapatra *et al.*, 2017.). Due to the high productivity associated with low fertilizer need, perennial grasses such as miscanthus and switchgrass are proposed by Europe and the United States as potential energy crops (Lima *et al.*, 2014). Elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum.) has a productivity in the order of 35 tons.ha⁻¹.ano⁻¹, with fast growth allowing its use as an alternative to sugarcane inter-season plantation, being well adapted to all regions of Brazil, even there where is no sugarcane production (Lima *et al.*, 2014).

Hydrothermal pretreatment, also known as autohydrolysis, is based on the use of water at high temperatures and pressures. High temperatures (150-230 °C) cause changes in the chemical properties of water, weakening the hydrogen bonds and increasing the ionization constant due to autoionization of the water in H₃O⁺ and OH⁻ ions (Garrote *et al.*, 1999; Girio *et al.*, 2010; Ruiz *et al.*, 2013). With these changes, water is capable to penetrate in the cellular structure of the biomass, hydrate the cellulose and breakdown the ether and ester bonds

between its components, favoring the hydrolysis of the hemicelluloses in oligomers and monomers (Garrote *et al.*, 1999; Gupta & Demirbas, 2010). The hydrolysis of hemicelluloses generates the formation of organic acids such as acetic acid from the acetyl groups and uronic acid, both contributing to the acidification of the medium (Mosier *et al.*, 2005; Girio *et al.*, 2010; Ruiz *et al.*, 2013). Additionally, the release of these acids contributes to catalyze the formation of oligosaccharides and their hydrolysis to monomeric sugars. However, under more severe conditions, the formed acids favor pentose and hexose degradation to aliphatic acids and furan aldehydes capable of inhibiting the fermentation of the generated sugars (Mosier *et al.*, 2005; Jonsson *et al.*, 2013). The main advantage of this pretreatment under adequate conditions is that the process does not require addition or recovery of any chemical different from water, which makes the process having a low corrosion problem, reducing operational and capital costs, as well as being more favorable to the environment (Girio *et al.*, 2010; Ruiz *et al.*, 2013). This process favors the dissolution of the hemicelluloses and their recovery in the resulting liquid fraction, while it does not significantly affect the fractions of cellulose and lignin in the solid fraction (Girio *et al.*, 2010). Based on this, in processes that use the biorefinery concept, autohydrolysis has been used as the first stage of fractionation to separate hemicellulosic fraction, being combined with a second stage of pretreatment aiming in delignification of the resulting solid fraction. Recent researches reported the potential of the combination of hydrothermal pretreatment with organosolv and alkaline pretreatments (Romaní *et al.*, 2011; Ruiz *et al.*, 2011; Vallejos *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2016; Romaní *et al.*, 2016; Meighan *et al.*, 2017; Weinwurm *et al.*, 2017).

Among other existing lignocellulosic pretreatment technologies the use of ionic liquids presents a high fractionation potential (Hou *et al.*, 2017), but as they are still expensive solvents, it is necessary to search for new solvents. The pioneer use of imidazole as a new pretreatment solvent for the delignification of lignocellulosic biomass was proposed by

Morais *et al.* (2016). The use of imidazole is a cheaper alternative than ionic liquids, and the results presented by Morais *et al.* (2016) and Toscan *et al.* (2017b), for wheat straw and elephant grass respectively, have shown that the use of imidazole as solvent is capable of resulting in delignifications of over 80% in both biomass and in high enzymatic conversions of glucan in the solid fraction. In addition, imidazole has low toxicity, high boiling point with low vapor pressure and can be recycled (Morais *et al.*, 2016).

Considering the importance of the development of pretreatments that are efficient for the rational use of lignocellulosic biomass, the present work aims to evaluate the potential of the two-stage pretreatment, combining the hydrothermal pretreatment with the use of imidazole in sequential stages, for elephant grass fractionation, as well as to evaluate the recovery of cellulose and hemicelluloses and the enzymatic digestibility of the pretreated. The results obtained for the two-stage fractionation were compared with the results obtained for single-stage hydrothermal pretreatment and imidazole delignification of untreated elephant grass.

2. Materials and methods

2.1 Materials

Elephant grass of the species *Pennisetum purpureum* Schum., obtained from Nova Petrópolis, Rio Grande do Sul, Brazil, was used. The biomass was harvested 6 months after planting, dried at 60 °C for 3 days, triturated with a forage chopper at a particle size of 0.5-2.0 cm and stored in polypropylene bags at room temperature.

For the hydrothermal pretreatments, distilled water from Pilsen-type distiller (Model Q341-210, QUIMIS) was used, while for the second stage of pretreatment imidazole was used with a purity of 99.0% (Commercial Neon Ltda., São Paulo, Brazil). For precipitation and washing of the solids stages, distilled water from Pilsen-type distiller (Model Q341-210,

QUIMIS) and ethanol 96% v.v⁻¹ (Serraquímica Produtos Químicos Ltda., Caxias do Sul, Brazil) were used. The pH adjustment in the steps of imidazole recovery was performed with aqueous solution of 25% HCl w.w⁻¹, prepared from HCl P.A – A.C.S. (LABSYNTH Produtos para Laboratórios Ltda., Diadema, Brazil). All filtration during pretreatments were performed using qualitative filter paper (80 g.m⁻²). Sulfuric acid P.A. - A.C.S. 95-97% (Dinâmica Química Contemporânea Ltda., Brazil) was used to prepare the aqueous solution of H₂SO₄ 72% (w.w⁻¹) used in the chemical characterization of elephant grass and recovered solid fractions from pretreatments, as well as for the preparation of H₂SO₄ 4% (w.w⁻¹) solution used in post-hydrolysis of the hydrothermal pretreatment liquid fractions. All samples submitted to HPLC analysis were previously filtered with nylon membrane 0.2 µm (Agilent Captiva, Agilent Technologies, USA).

For enzymatic hydrolysis the commercial enzyme Cellic CTec2 (Novozymes Latin America Ltda.) was used, which was kindly provided by LNF Latino Americana (Bento Gonçalves, Brazil). In order to prove the enzymatic digestibility of the obtained solids, hydrolysis was also performed with the LEB-PES enzymatic cocktail, which was produced in the Laboratory of Enzymes and Biomasses of the Biotechnology Institute, University of Caxias do Sul, by solid state cultivation, using strain S1M29 of *Penicillium echinulatum* (Camassola & Dillon, 2010). S1M29 is a mutant strain obtained from strain 9A02S1 (microorganism deposited in the German collection of microorganisms and Cell Cultures - DSM 18942) (Dillon *et al.*, 2011). Filter paper activity was determined according to Camassola and Dillon (Camassola & Dillon, 2012), as 155 FPU.mL⁻¹ for Cellic CTec2 and 4 FPU.mL⁻¹ for LEB-PES. For each hydrolysis, an enzyme load of 15 FPU per g substrate was used.

2.2 Pretreatments for two-stage fractionation

Two-stage fractionation (TSF) using the sequential combination of two different pretreatments was proposed for the complete fractionation of elephant grass biomass. Hydrothermal pretreatment was applied as the first stage aiming at the separation of the hemicellulosic fraction of the biomass and obtaining a liquor rich in C₅-sugars (Garrote *et al.*, 1999; Romaní *et al.*, 2011). Imidazole was used in the second stage of pretreatment aiming at the delignification of the biomass and obtaining a solid fraction rich in polysaccharides, mainly cellulose (Morais *et al.*, 2016; Toscan *et al.*, 2017b).

Fig. 1 shows a diagram of the two stages of fractionation used in this work. A more detailed description of each pretreatment stage is presented in the following sessions. Each fractionation stage was also evaluated as a single-stage in order to compare the effects with two-stage fractionation. In this case, the solid resulting solely from the hydrothermal pretreatment was also subjected to enzymatic hydrolysis.

2.2.1 Liquid hot water pretreatment

Liquid hot water pretreatments (LHW) were carried out in a 400 mL stainless steel reactor designed to withstand temperatures up to 250 °C and pressures up to 300 bar. The reactor is instrumented with internal and external pressure and temperature controls and agitation control.

Pretreatments were performed at temperatures of 160 °C, 180 °C, 200 °C and 220 °C in non-isothermal conditions and at 180 °C in isothermal condition for 60 min. The water/biomass ratio was kept constant at 10 w.w⁻¹, using the maximum useful volume of the reactor for the reactions. Previously weighed elephant grass was conditioned in the reactor that received the mass quantity of water required. Stirring was kept constant throughout the process.

The resulting reaction mixture was filtered by vacuum using previously tared filter paper and Kitasato. The liquid fraction was collected and stored for further analysis and the solid fraction was washed using 200 mL of distilled water. The water resulting from the washing of solid was also stored for evaluation of the composition. After being weighed, a solid fraction sample was collected for moisture determination and chemical characterization and the remainder stored in a freezer for later use.

In order to compare the combined effect of the time and temperature of the hydrothermal pretreatments, the severity factor (R_0) of each reaction, proposed by Overend and Chornet, was calculated (Overend *et al.*, 1987). The calculation of the severity factor was performed by incorporating the time period in which the pretreatment was performed (Eq. 1), considering the time of heating and cooling of each reaction added of the period in which the reaction was maintained in the isothermal condition (if applicable) (Lavoie *et al.*, 2010; Pedersen & Meyer, 2010; Romaní *et al.*, 2011; Romaní *et al.*, 2016).

$$R_0 = \int_a^b \exp\left(\frac{T(t)-100}{14.75}\right) dt \quad (1)$$

In equation (1), t is the time in minutes of the step considered (heating, isothermal period, cooling) and $T(t)$ is the temperature profile in degrees Celsius in each step. The value of 100 is used as reference temperature (°C) and the constant 14.75 refers to the arbitrary constant ω based on the activation energy. Table 1 shows the time and temperature conditions of each reaction as well as the logarithm values of the severity factor as presented in equation (2).

$$\log R_0 = \log[R_{0(\text{heating})} + R_{0(\text{cooling})} + R_{0(\text{isothermal})}] \quad (2)$$

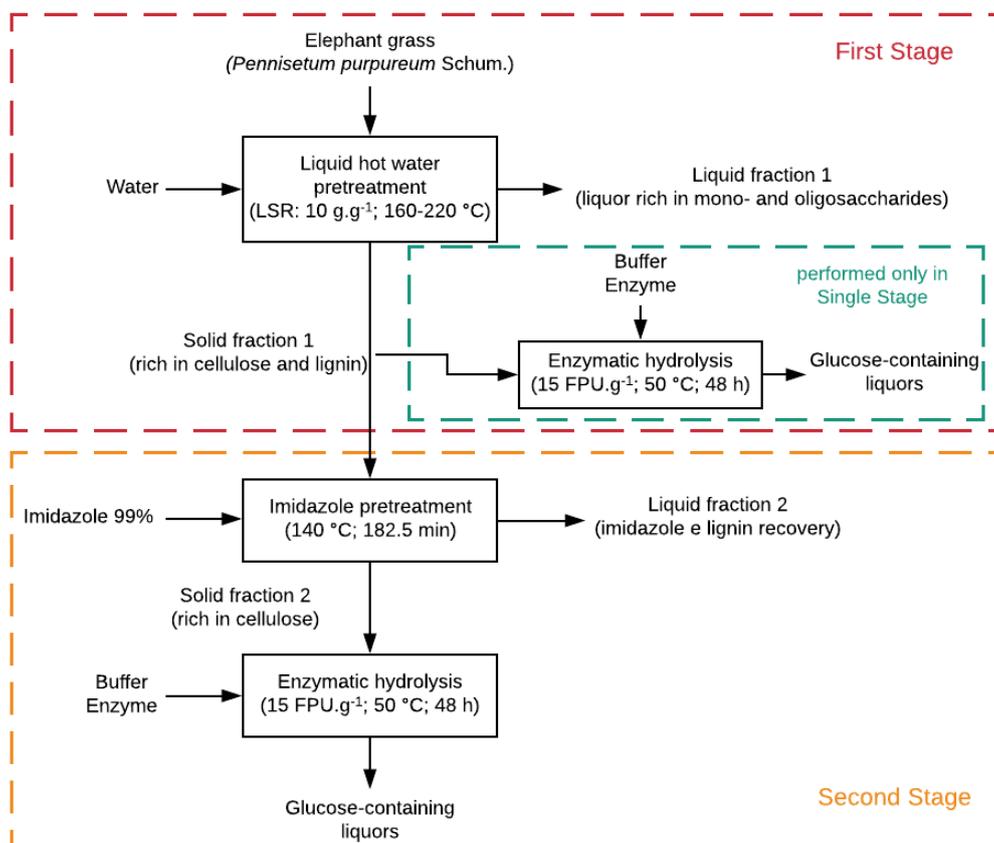


Figure 1. Scheme of two-stage pretreatment evaluated in this work.

2.2.2 Imidazole pretreatment

Imidazole pretreatment was used as a second stage of fractionation in order to promote delignification of pretreated elephant grass and was performed as described in previous studies (Morais *et al.*, 2016; Toscan *et al.*, 2017b), with adaptations as described. The reactions were carried out in 250 mL SHOTT DURAN flasks, with magnetic stirring, in an oil bath for heating and maintaining the system temperature at 140 °C for 182.5 min (in isothermal condition). The imidazole/biomass ratio used was 10 w.w⁻¹ (dry basis). Pretreated biomass was dried at 45 °C (\pm 5 °C) for 72 h and had its moisture determined before being subjected to the second stage of pretreatment, to eliminate water interference at this stage. At the end of the reaction, a volume of distilled water equal to twice the mass of imidazole used

in the reaction was added to the mixture and brought to constant stirring at room temperature for 1 h to promote precipitation mainly of the polysaccharides. Afterwards, the solid fraction was separated by vacuum filtration and washed with 96% EtOH (v.v⁻¹) up to neutral pH to ensure complete removal of imidazole residues in the precipitate. The recovered solid fraction was dried overnight at 45 °C (\pm 5 °C) and stored at room temperature for further use. Fractionation of the elephant grass in natura using imidazole pretreatment as a single step was also performed under the same conditions already described.

2.3 Enzymatic hydrolysis

Untreated elephant grass, samples of the solid fractions recovered in the first stage of pretreatment and at the end of the two-stage fractionation were subjected to enzymatic hydrolysis to evaluate the enzymatic digestibility of the obtained solids.

All enzymatic hydrolyses were carried out in 50 mL SCHOTT DURAN flasks, in a total volume of 20 mL, using solids concentration of 1% and enzyme loading of 15 FPU.g⁻¹. Sodium azide 0.01% (w.v⁻¹) was added to prevent contamination. The total volume was completed with sodium citrate buffer (pH 4.8, 50 mmol.L⁻¹). Hydrolyses were carried out for 48h at 50 °C in a bath with constant agitation of 120 rpm. The hydrolysis was performed in triplicate for each of the enzymatic complexes.

2.4 Analytical methods

2.4.1 Characterization of elephant grass and recovered solid fractions

The solids previously ground with a food grinder were submitted to analysis for the determination of humidity at a temperature of 100 °C (\pm 5 °C) until constant weight. The determination of the structural carbohydrates and lignin of the elephant grass as well as the solid fractions recovered in each pretreatment was performed according to Sluiter *et al.*

(2008b), in which carbohydrates were classified as cellulose (as glucan) and hemicelluloses (as the sum of xylan, arabinan and acetyl groups). Glucose, xylose, arabinose and acetic acid present in the acid hydrolysates were analyzed by HPLC coupled to a refractive index detector using an Aminex HPX-87H column (Bio-Rad, USA) at a temperature of 60 °C, 5 mmol.L⁻¹ H₂SO₄ as mobile phase and a flow of 0.4 mL.min⁻¹. Acid-insoluble residue corrected by acid-insoluble ash was classified as Klason lignin. For ash determination materials were incinerated in a muffle furnace at 575 °C (±5 °C) until constant weight as described by Sluiter *et al.* (Sluiter *et al.*, 2008a). Determination of extractives was done by two sequential extractions using water and ethanol as solvents (Sluiter *et al.*, 2005).

2.4.2 Characterization of the pretreatment liquid fractions and of the liquors of the enzymatic hydrolysis

A sample of each liquid fraction (pretreatment liquor) obtained after the LHW pretreatment and of each liquor resulting from the enzymatic hydrolysis was filtered with nylon membrane 0.2 µm and analyzed by HPLC coupled to a refractive index detector using an Aminex HPX-87H column (Bio-Rad, USA) at a temperature of 60 °C, with 5 mmol.L⁻¹ H₂SO₄ as mobile phase and a flow of 0.4 mL.min⁻¹ for the determination of glucose, xylose, arabinose, acetic acid, 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF) and furfural. For the determination of the oligosaccharides present in the pretreatment liquors, three samples of each liquid fraction obtained were subjected to acid hydrolysis using a solution of 4% H₂SO₄ (w.w⁻¹) at 121 °C for 1 h. The hydrolysates were filtered and analyzed by HPLC as previously described. The concentration of oligosaccharides present in the pretreatment liquors was calculated based on the addition of monosaccharides determined after post-hydrolysis in relation to the monosaccharides present in the original sample.

3. Results and discussion

3.1 Characterization of elephant grass

Elephant grass (EG) used for this study consisted of a mixture of all parts of the plant (stems and leaves). Considering that several factors can influence the cultivation with reflection in the composition of the grass, the macromolecular composition of the biomass was evaluated, whose data were used to perform mass balance, recovery and yield of the process. Chemical composition of the biomass, evaluated according to the methodology described by the National Renewable Energy Laboratory (NREL), is presented in Table 1. The data obtained are in agreement with the values found in works performed with elephant grass of the same origin (Menegol *et al.*, 2014; Toscan *et al.*, 2017a; Montipó *et al.*, 2018) as well as with characterizations of similar grasses described by Yu *et al.* (2016). Extractives in water and ethanol were also evaluated and presented values of 14.50% (± 1.74) and 1.81% (± 0.19), respectively. Biomass had a moisture content of 6.25% (± 0.53).

3.2 Effects of hydrothermal pretreatment - first stage

Hydrothermal pretreatment as initial treatment for the elephant grass, without addition of any catalytic agent, aimed to obtain a liquid fraction rich in mono- and oligosaccharides originating mainly from the hemicellulosic fraction of the biomass. Pretreatments were performed in five different severity conditions ($\log R_0$), defined by the temperature and time variations as described in Table 1. Considering the dimensions of the reactor, the time necessary for the heating and cooling of the reactor was also considered for calculating the severity factor, using the temperature of 100 °C as reference temperature.

Table 1. LHW pretreatment conditions and composition of elephant grass (EG) and of solid and liquid fraction obtained in pretreatments.

| Parameters | EG | LHW/160 | LHW/180 | LHW/180-60 | LHW/200 | LHW/220 |
|--------------------------------------|-------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Severity factor (log R_0) | - | 3.92 | 4.65 | 4.79 | 5.37 | 6.18 |
| Temperature (°C) | - | 160 | 180 | 180 | 200 | 220 |
| Residence time (min) | - | NI ^a | NI ^a | 60 ^b | NI ^a | NI ^a |
| Chemical composition | | | | | | |
| Solid fraction (%) | | | | | | |
| Cellulose (as glucan) | 34.41 ±0.96 | 39.10 ±1.16 | 45.03 ±0.33 | 46.49 ±0.71 | 47.81 ±0.33 | 40.96 ±0.59 |
| Hemicelluloses | 28.13 | 17.22 | 10.46 | 5.47 | 3.93 | 1.42 |
| Xylan | 18.49 ±1.05 | 11.55 ±0.17 | 6.98 ±0.10 | 3.17 ±0.11 | 2.06 ±0.07 | 0.00 ±0.00 |
| Arabinan | 5.03 ±0.80 | 1.80 ±0.03 | 0.68 ±0.08 | 0.24 ±0.03 | 0.00 ±0.00 | 0.00 ±0.00 |
| Acetyl groups | 4.62 ±0.08 | 3.87 ±0.30 | 2.79 ±0.12 | 2.06 ±0.05 | 1.87 ±0.02 | 1.42 ±0.04 |
| Klason lignin | 16.60 ±0.42 | 25.46 ±0.90 | 29.26 ±0.88 | 31.92 ±0.32 | 36.32 ±0.11 | 46.43 ±1.01 |
| Ash | 11.10 ±0.08 | 5.07 ±0.75 | 3.25 ±0.12 | 4.45 ±0.45 | 5.42 ±0.85 | 5.47 ±0.56 |
| Liquid fraction (g.L ⁻¹) | | | | | | |
| Glucose | | | | | | |
| Monosaccharides | - | 1.19 | 0.62 | 0.51 | 0.29 | 0.08 |
| Oligosaccharides | - | 2.91 | 3.10 | 2.53 | 0.90 | 0.06 |
| Xylose | | | | | | |
| Monosaccharides | - | 1.93 | 1.82 | 2.97 | 0.98 | 0.34 |
| Oligosaccharides | - | 0.78 | 5.52 | 2.47 | 0.05 | 0.00 |
| Arabinose | | | | | | |
| Monosaccharides | - | 1.07 | 1.37 | 1.19 | 0.74 | 0.78 |
| Oligosaccharides | - | 0.59 | 0.46 | 0.03 | 0.02 | 0.00 |
| Acetic acid | - | 0.82 | 1.92 | 3.05 | 2.56 | 2.76 |
| 5-HMF | - | 0.03 | 0.15 | 0.27 | 0.35 | 0.17 |
| Furfural | - | 0.02 | 0.35 | 1.41 | 1.27 | 0.12 |

^a NI: non- isothermal condition.

^b Holding time in isothermal condition.

Heating, cooling and residence time profiles (when applicable) are shown in Fig. 2. It is possible to observe that the maximum heating rate occurs up to a temperature of approximately 120 °C, taking about 55 min to achieve this temperature. A gradual reduction of the heating rate is observed as the temperature rises. It is also observed the reproducibility of the heating profile between the different pretreatments, having as difference only the time required to reach the final maximum temperature. In the pretreatment LHW/180-60 a variation of ±7 °C was observed during the residence time in the isothermal condition. Considering the long times required for heating and cooling the system, the residence time in

the isothermal condition represented an increase of only 0.14 in the severity factor when compared to the pretreatment LHW/180.

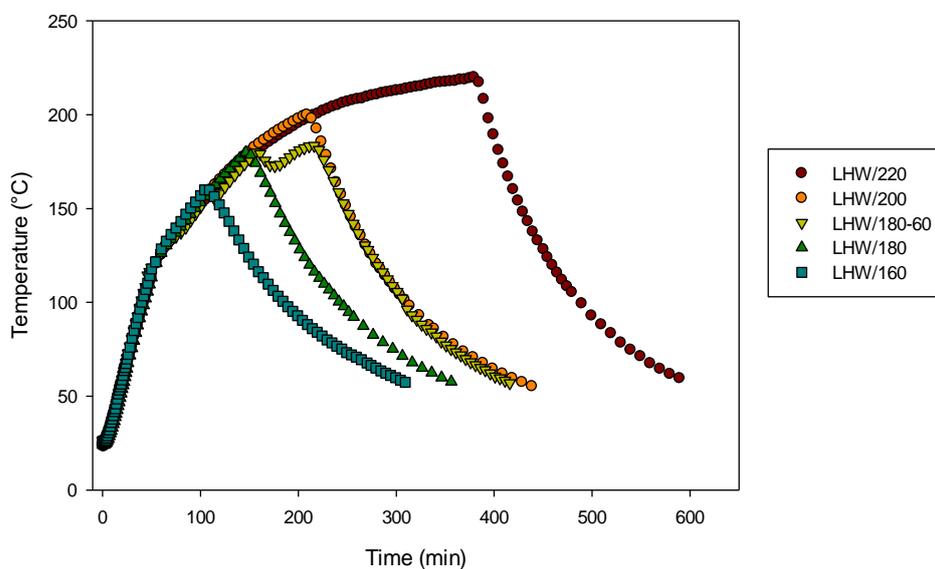


Figure 2. Heating and cooling profile of LHW pretreatments.

3.2.1 Evaluation of the recovered solid fraction.

Composition of solids recovered after the hydrothermal pretreatments was evaluated and the results are presented in Table 1. All pretreatment conditions tested were shown to be capable of generating a solid with cellulose enrichment (Fig. 3). This enrichment in cellulose is due to the removal of hemicelluloses, which also caused an enrichment in lignin. Lignin was not susceptible to hydrothermal pretreatment, and its content increased in the recovered solids with decreasing hemicellulose content. In the pretreatment LHW/220 with the highest severity factor, it was observed that although almost all pentoses of hemicellulose were removed, the cellulose enrichment was not proportional, but instead lower than that observed in the pretreatments performed at 180 and 200 °C, which indicates that part of the cellulose was also removed.

Fig. 3 shows the data for cellulose enrichment in the solid fraction of each pretreatment, as well as the total amount of removed hemicelluloses and recovered lignin. It is observed that the removal of hemicelluloses increases as the pretreatment severity increases. This behavior has already been observed in hydrothermal pretreatment by other authors (Hashmi *et al.*, 2017). LHW/160 pretreatment showed the lowest efficiency in removing hemicelluloses from elephant grass biomass, causing a 52.4% removal of the initial hemicelluloses content. LHW/220 pretreatment removed of 97.1% of the hemicelluloses, remaining in the biomass only part of the acetyl groups. On the other hand, as indicated by analyses of the composition of each solid, about 32.1% of cellulose was also removed from the biomass during pretreatment LHW/220.

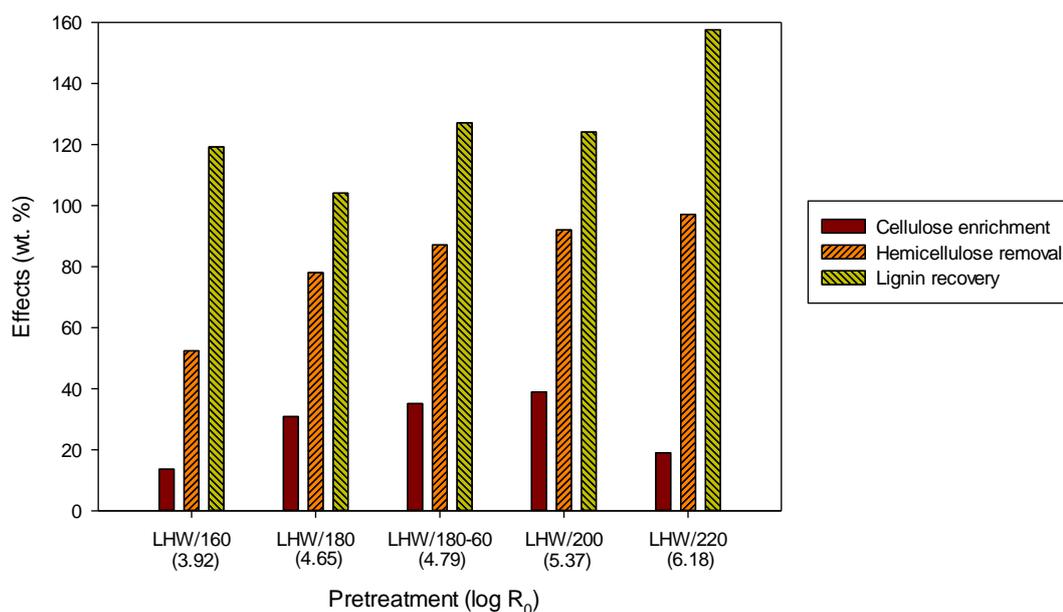


Figure 3. Mass evaluation of the effects of LHW pretreatments on elephant grass composition.

Hydrothermal pretreatments were not efficient for delignification of elephant grass, which contributed to the enrichment of the lignin in the recovered solid fraction. Lignin enrichment in the solid fraction is usual in LHW pretreatments since they remove much of the

hemicelluloses from the biomass. Although Hashmi *et al.* (2017) observed delignification of 19.3% in sugarcane bagasse pretreated by autohydrolysis, the lignin content in the solid fraction increased from 27.5% in untreated biomass to 36.0% after the treatment. However, as shown in Fig. 3, all LHW pretreatment conditions tested in this work led to an increase in lignin content, with higher mass recovery of lignin than present in elephant grass untreated, and no delignification was observed. This increase is probably due to the formation of pseudolignins, which according to Jakobsons *et al.* (1995) could be attributed to the incorporation of degraded polysaccharides into the lignin structure. These authors also observed that in pretreatments with steam explosion the formation of pseudolignins increased with the increase of pretreatment severity, which means that the formation of pseudolignins was more pronounced at the highest pretreatment temperatures evaluated by them, 220 and 250 °C. Recent reports by a research group from the Georgia Institute of Technology have shown that the pretreatment of holocelluloses (essentially lignin-free) also led to the formation of pseudolignins, confronting the idea that pseudolignins are formed from lignin (Sannigrahi *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2012). Hu and co-workers showed that during pretreatment of poplar with dilute acid cellulose and hemicelluloses underwent rearrangement and polycondensation and/or polymerization, after fractionation, producing an acid insoluble material, consisting of carbonyl, carboxylic, aromatic and aliphatic structures (Hu *et al.*, 2012). From the lignin recovery results obtained with the two different conditions of LHW pretreatments at 180 °C, it can be seen that the additional residence time had a negative influence on delignification, favoring the formation of pseudolignins.

3.2.2 Characterization of the liquid fraction.

The liquid fractions obtained after the hydrothermal pretreatments and the hydrolysates resulting from acid post-hydrolysis were submitted to HPLC analysis. Acid post-

hydrolyses were carried out with samples of all obtained liquid fractions in order to hydrolyze the oligosaccharides formed during pretreatment and quantify them by the difference in monosaccharides before and after hydrolysis. The concentration (in g.L^{-1}) of mono- and oligosaccharides of glucose, xylose and arabinose and also acetic acid, 5-HMF and furfural observed in each liquor is shown in Table 1. As expected, the compounds originated from the hemicellulosic fraction are present in higher concentration than the others. LHW/180 pretreatment liquor presented higher concentrations of oligosaccharides from xylan and glucan. The low concentration of sugars present in the LHW/160 pretreatment liquor, as well as the low concentration of the degradation products, 5-HMF and furfural, corroborate the results observed for the solid fraction recovered in this treatment, which was presented the lowest removal of hemicelluloses from elephant grass. The increase in residence time under isothermal condition at 180 °C (LHW/180-60), which generated an increase of only 0.14 in the pretreatment severity factor, was sufficient to increase the acetic acid concentration by approximately 59% compared to the LHW/180 pretreatment, resulting in an increase of more than 1 g.L^{-1} in xylose concentration and the highest furfural concentration (1.41 g.L^{-1}) observed for the different pretreatment conditions. Montipó *et al.* (2018) observed for elephant grass pretreated by steam explosion at 190 °C (without the addition of H_2SO_4), that the maximum concentration of xylose obtained after post-hydrolysis in the recovered liquor was only 2.99 g.L^{-1} , of which only 0.06 g.L^{-1} were monosaccharides. In the present work, for LHW/180 pretreatment without additional catalyst, a xylose concentration higher than 7 g.L^{-1} with at least 1.8 g.L^{-1} monosaccharides was obtained. These results indicate that, in hydrothermal pretreatments, the use of hot liquid water favors mass transfer between solid and treatment fluid, when compared to pretreatments that use water vapor, obtaining a higher concentration of hydrolyzed compounds in the recovered liquor. On the other hand, the results presented by Montipó *et al.* (2018) showed that the use of 1% of acid is enough to favor the

hydrolysis during pretreatment, increasing the concentration of xylose recovered in the liquor by more than 6 times.

3.2.3 Recovery of elephant grass macrocomponents after hydrothermal pretreatment.

Fig. 4 shows the total recovery of glucan, xylan, arabinan and acetyl groups of elephant grass biomass in the solid and liquid fractions obtained in each pretreatment. For all tested pretreatment conditions it was observed that almost all recovered glucan was in the solid fraction. LHW/180 pretreatment showed the highest glucan recovery in the liquid fraction, which was 7.8%. LHW/160 and LHW/180-60 pretreatments presented the highest total recovery of glucan, both being approximately 96%. The total recovery of xylan present in the pretreated elephant grass decreased as the pretreatment severity increased. Maximum total recovery of xylan was approximately 57% in the LHW/160 pretreatment. LHW/180 pretreatment presented the highest xylan recovery in the liquid fraction (28.2%). The same behavior was observed in the recovery of arabinan. Xylan and arabinan recovery in the liquid fraction decreased when the severity of pretreatment increased. For arabinan the maximum total recovery was obtained in the pretreatment LHW/160, while the maximum recovery in the liquid fraction occurred in the pretreatment LHW/180.

These results indicate that LHW/160 pretreatment presents the best overall recovery of the elephant grass macrocomponents. However, considering together the recovery and fractionation of elephant grass in a single-stage hydrothermal pretreatment without the use of any catalyst, LHW/180 pretreatment presented the best results, resulting in a removal of more than 78% of the hemicellulosic fraction and ensuring the best sugar recovery in the form of mono- and oligosaccharides in the liquid fraction.

The total recovery of the compounds shown in Fig. 4 together with the results presented in Table 1 and Fig. 3, suggest that the high severity presented by LHW/200 and

LHW/220 pretreatments led to a higher hemicellulosic fraction removal associated with a higher degradation of the sugars into compounds not evaluated in this work, such as formic acid. Low recovery of pentoses in liquors from the pretreatments of higher severity may also be associated with the formation of pseudolignins as discussed above. The same behavior may explain the glucose loss from the solids recovered from these two reactions. Low concentration of glucose and 5-HMF in liquors from LHW/200 and LHW/220 suggests that glucose has also been degraded to compounds not evaluated herein, such as formic acid and levulinic acid.

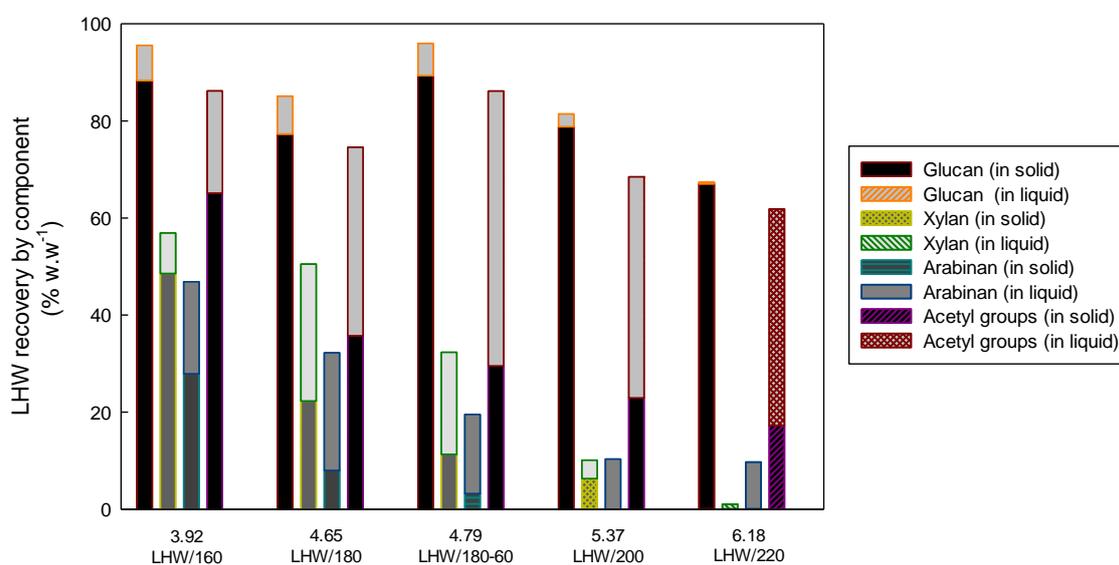


Figure 4. Recovery of elephant grass components in LHW pretreatments.

The lignin recovery results presented in Fig. 3 suggest that all the initial lignin was recovered in the solid fraction, with a mass increase of this component possibly due to the formation of pseudolignins, as discussed above. However, the composition of the recovered lignin was not evaluated in this work, so it is not possible to differentiate natural lignin and pseudolignins eventually formed during pretreatment.

3.3 Effects of two-stage fractionation (TSF) of elephant grass

All the pretreated solids resulting from the LHW pretreatment were subjected to the imidazole pretreatment with the aim of separating the lignin present in these solids and obtaining a solid fraction rich in cellulose. This set of sequential pretreatments, and their resulting fractions, are referred to as two-stage fractionation (TSF). Time (182.5 min) and temperature (140 °C) conditions were used according to Toscan *et al.* (2017b) with untreated elephant grass. These authors showed that although this combination of factors presented a shorter time than the optimized condition for delignification, the difference in delignification with 140 °C and 182.5 min to the predicted maximum delignification conditions proposed by the model (140 °C and 313.2 min) was only 4%.

3.3.1 Composition of the solids obtained after TSF and changes observed with respect to solids recovered after the LHW pretreatment

Solids obtained after the second stage of fractionation are referred to as TSF (two-stage fractionation) followed by the temperature (and time when applicable) used in the first fractionation stage. Thus, solids TSF/160, TSF/180, TSF/180-60, TSF/200 and TSF/220 solids are the result of the pretreatment with imidazole applied to the solids recovered from LHW/160, LHW/180, LHW/180-60, LHW/200 and LHW/220, respectively. The results for cellulose, hemicellulose and lignin content of these solids obtained after imidazole pretreatment are shown in Fig. 5. For all TSF a significant enrichment in the cellulose concentration in relation to the first stage hydrothermal pretreatment was achieved. The recovered solid with the lowest cellulose concentration, 48.56%, was from TSF/220, which means an increase of 18.6% in relation to the solid pretreated by LHW. The highest cellulose enrichment of 51.1%, was reached with the TSF/180 pretreatment. In general, more than 82%

of the cellulose contained in the LHW pretreated solids was recovered after delignification in the solid fraction, but with TSF/180 pretreatment 92.2% of cellulose were recovered.

As expected, hemicelluloses content did not change significantly in the solids recovered after TSF and no significant variations in their composition of xylan, arabinan and acetyl groups were observed (results not shown).

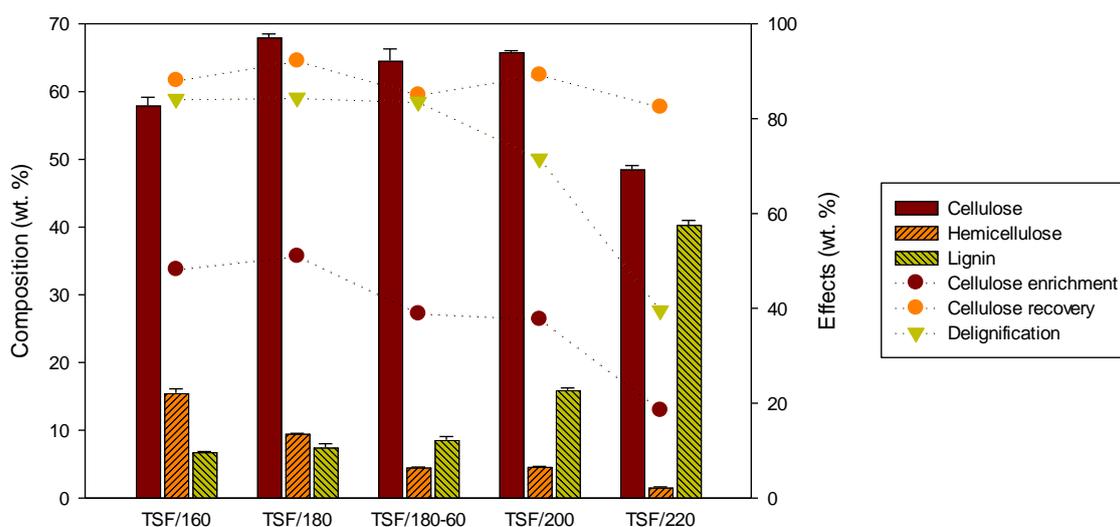


Figure 5. Macrocomponent composition of the solids obtained after the second fractionation stage with imidazole and changes in component content of the recovered solids in relation to the first stage pretreatment (LHW).

The second stage pretreatment with imidazole demonstrated a delignification potential higher than 83% for the solids obtained after LHW/160, LHW/180 and LHW/180-60 pretreatments, but it was less effective in TSF/200 and TSF/220 pretreatments where delignification was only 71.6% and 39.5%, respectively. The low delignification obtained with TSF/220 may be related to the formation of pseudolignins in the first pretreatment step, where the total lignin content (including pseudolignins) was found to be 57 % higher than the initially present lignin in elephant grass. As pseudolignins result from rearrangements followed by polycondensation and/or polymerization of the pentoses and hexoses and

considering that the polysaccharide fractions of biomass are less susceptible to the pretreatment with imidazole than the lignin, as observed by Toscan *et al.* (2017b), it can be assumed that pseudolignins are less likely to be dissolved or modified by imidazole than natural or unmodified lignins and they possibly form a barrier reducing the efficiency of imidazole treatment .

3.3.2 Effects of the two-stage fractionation in relation to untreated elephant grass.

An evaluation of the joint action of the two proposed fractionation steps is presented in Table 2. It can be observed that the combined TSF/180 pretreatment allowed a cellulose enrichment in the solid fraction of 97.7%. The low percentage of cellulose enrichment caused by the TSF/220 pretreatment is related to the lower recovery of cellulose and the probably high formation of pseudolignins in the solid fraction in the first stage of pretreatment, when compared to the other conditions, as well as the low delignification that this sample presented. TSF/160 and TSF/180 pretreatments presented total delignification above 81%, a result consistent with the delignification observed by Toscan *et al.* (2017b) under the same conditions of time and temperature for elephant grass. These authors, after experimental planning and statistical analysis, concluded that maximum delignification occurs at a temperature of 140 °C for a time of 313.2 min, resulting in a delignification of 85.7% in relation to untreated elephant grass. However, as in this work elephant grass was treated by LHW before being subjected to imidazole pretreatment, probably milder reaction conditions, that is shorter reaction time and lower temperature, may result in delignifications higher than 80%.

The optimization of the second stage, to achieve high delignification in the shortest possible time and temperature, would be favored by the optimization of the time and temperature conditions of the LHW pretreatment, so that the first stage allows fractionation of

Table 2. Global effects of two-stages fractionation (TSF) and single-stage imidazole pretreatment (IPT).

| (wt. %) | TSF/160 | TSF/180 | TSF/180-60 | TSF/200 | TSF/220 | IPT |
|-------------------------------------|---------|---------|------------|---------|---------|------|
| Cellulose enrichment ^a | 68.5 | 97.7 | 87.7 | 91.3 | 41.1 | 44.8 |
| Pentosans recovery ^b | 10.6 | 27.3 | 20.0 | 5.2 | 2.9 | - |
| Delignification ^a | 81.1 | 83.8 | 79.1 | 64.7 | 4.7 | 77.3 |
| Glucan recovery ^c | 85.0 | 79.1 | 82.6 | 73.0 | 55.7 | 77.1 |
| Xylan recovery ^c | 37.5 | 41.0 | 27.8 | 8.6 | 1.1 | 37.2 |
| Arabinan recovery ^c | 32.6 | 28.2 | 18.2 | 10.3 | 9.7 | 26.0 |
| Acetyl groups recovery ^c | 44.6 | 57.4 | 67.1 | 63.1 | 57.9 | 22.7 |

^a in solid fraction

^b in liquid fraction (aqueous)

^c total recovery of two-stage fractionation

hemicelluloses with less formation of pseudolignins. After pretreatment TSF/180 27.3% of the total sum of xylans and arabinans were recovered as mono- and oligosaccharides in aqueous liquor. These results are comparable to xylan and arabinan liquor recoveries reported by Toscan *et al.* (2017a) when pretreating elephant grass with CO₂ and water at the same temperature of 180 °C. The concentration of xylan recovered as oligomer in the LHW/180 pretreatment liquor was even higher than the concentrations observed by Toscan *et al.* (2017a), but arabinan oligomers concentration was lower. When the hydrothermal pretreatment is performed without the addition of CO₂, the system has to support lower pressures and, consequently, the equipment costs can be lowered. A general mass balance of the process showed that more than 79% of glucan was recovered in pretreatments where the first stage was carried out at temperatures equal or less than 180 °C, reaching 85% in pretreatment TSF/160. TSF/180 pretreatment also showed the best recovery of xylan, 41%, while the best recovery of arabinan occurred in TSF/160 pretreatment, and was superior to 32%. The low recovery of the constituents of the hemicellulosic fraction observed in this work when compared to Ruiz *et al.* (2013) may be attributed to the long reaction time,

especially during the heating step after reaching the temperature of 120 °C, which led to the formation of decomposition products.

Table 2 also presents the results obtained for the pretreatment of elephant grass using imidazole (IPT) as a single-stage, under the same conditions in which the second stage of fractionation of the combined pretreatments was performed. The results obtained for elephant grass treatment with imidazole as a single-stage in this work are consistent with the results presented by Toscan *et al.* (2017b) for the same temperature and time. The comparison of the results of the single-stage imidazole pretreatment and the two-stage pretreatments, especially when the first step was performed at a temperature up to 180 °C, reveals the potential of the combined two-stage pretreatment in relation to its fractionation capacity. For all three pretreatments conditions in two-stages where the first stage was performed at a temperature of 180 °C or below, higher cellulose enrichment in the solid fraction, higher delignification of biomass, higher total recovery of glucan and better recovery of part of the pentosans in the aqueous liquor was obtained than in the single-stage imidazole pretreatment. In TSF/160 and TSF/180 pretreatments, it was still possible to recover a greater mass quantity of the components of the hemicellulosic fraction than in the single-stage imidazole pretreatment.

The elephant grass delignification indices obtained in this work are comparable to delignification of elephant grass verified by Nagula & Pandit (2016) using alkaline pretreatment with 0.3% NaOH solution (w.v⁻¹) at 80 °C. However, with the use of NaOH, much of the cellulose was also dissolved, and the recovered solid fraction had lower cellulose concentration than the biomass without pretreatment. These authors also evaluated the use of laccases and ultrasound, as individual pretreatments and also combined in a single step, and obtaining 75% as the maximum delignification also associated with the reduction of cellulose concentration in the obtained solid.

Minmunin *et al.* (2015) also combined two-stage pretreatment for elephant grass delignification, using alkaline pretreatment with NaOH in the first stage and ozone pretreatment in the second stage, and observed a removal of 93.78% of lignin, while the maximum delignification obtained for a single-stage alkaline pretreatment was 63.54%. Despite of the high delignification and a recovery of 80.59% of cellulose, the sequential combination of alkaline and ozone pretreatment did not present a satisfying cellulose and hemicellulose fractionation. At their best delignification condition, only 45.29% of the hemicelluloses was removed from biomass, while the rest was recovered in the solid fraction together with cellulose.

3.4 Enzymatic hydrolysis of the pretreated solids.

Enzymatic digestibility of cellulose is an important parameter to evaluate and compare the efficiency of pretreatments. Therefore, the recovered solid fractions of the two-stage pretreatments and of single-stage hydrothermal pretreatment were submitted to enzymatic hydrolysis with the commercial enzyme Cellic CTec2 and an enzyme preparation of *Penicillium echinulatum*. To avoid substrate inhibition, low substrate concentration with high enzyme loading was used, as done by Hashmi *et al.* (2017).

The kinetics of enzymatic conversion of the glucan component of these solids into glucose are shown in Fig. 6. In all cases, as expected, untreated elephant grass showed the lowest glucan to glucose conversion, due to the well-known resistance conferred by the physical and chemical barriers that the lignocellulosic complex presents to the enzymatic action. Solids submitted to hydrothermal pretreatment (Fig. 6 a and b) presented an increased conversion of glucan to glucose in relation to untreated elephant grass, and the higher the pretreatment temperature and the severity, the higher was the observed conversion. A similar behavior was also observed by Toscan *et al.* (2017a) for elephant grass submitted to

pretreatment with CO₂ and water at different temperatures and severities, where the conversions of glucan to glucose reported were also similar to the conversions obtained in the present work when using LHW pretreatment as a single-stage pretreatment. Similar results were also verified by Yu *et al.* (2016), who evaluated the enzymatic hydrolysis of two *Pennisetum* hybrid and switchgrass in natura and pretreated with liquid hot water at 180 °C for 40 min using an enzymatic loading of 20 FPU.g⁻¹. The enzymatic digestibility observed by these authors after 48h of the process varied between 55-80%.

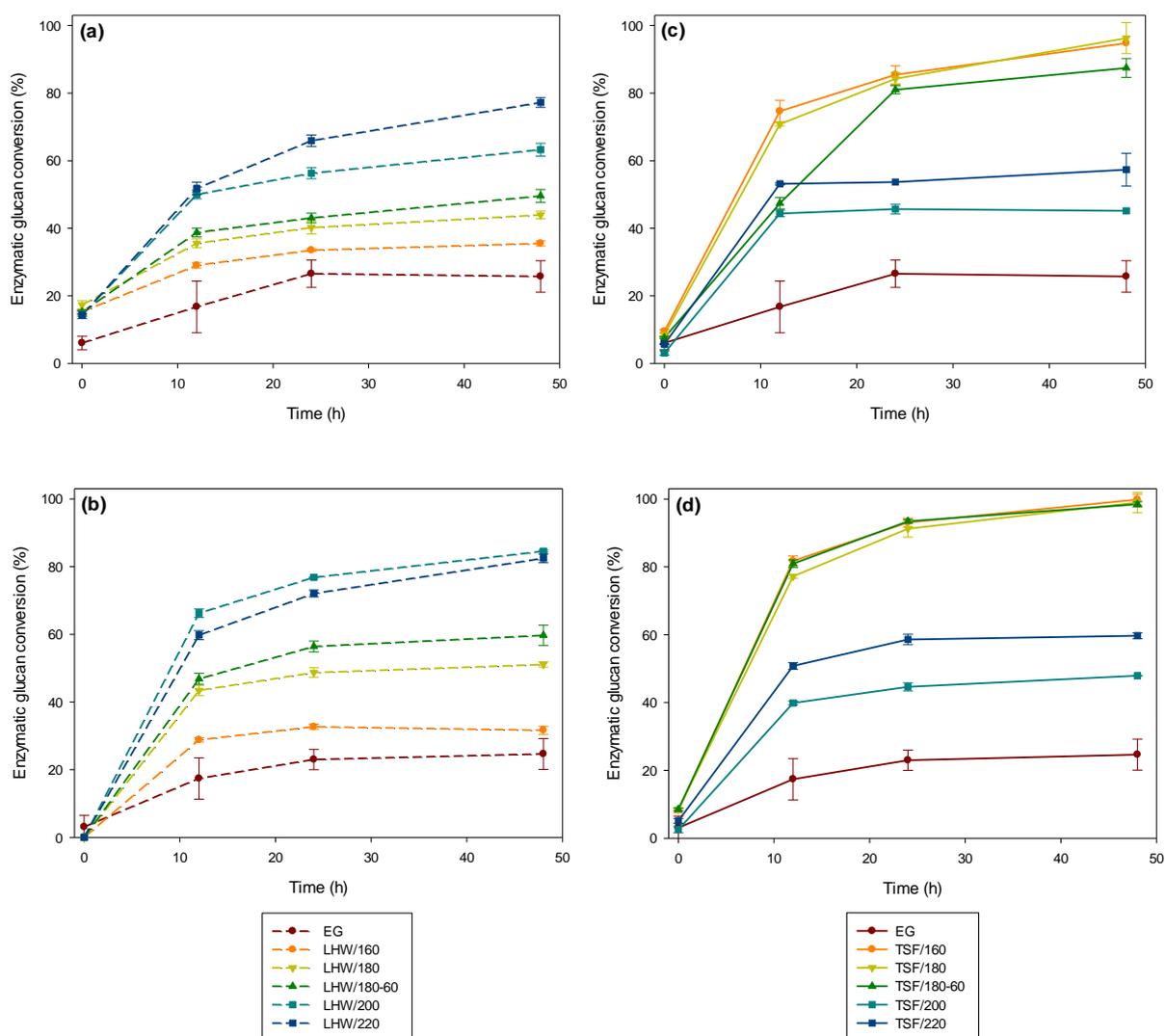


Figure 6. Enzymatic conversion of glucan to glucose for samples pretreated by liquid hot water (LHW) and for samples after two-stage fractionation (TSF), using LEB-PES (a,c) and Cellic CTec2 (b, d) enzymatic complex.

There is an inversion of enzymatic hydrolysis results for the solids submitted only to the hydrothermal pretreatment in relation to those submitted also to the second stage of pretreatment. The solids that in the first stage were submitted to the less severe treatment conditions, when submitted to the stage of delignification presented greater enzymatic digestibility than the solids initially treated at higher temperatures. Using both enzymatic complexes, the solids from TSF/200 and TSF/220 presented lower enzymatic digestibility than their predecessor solids from LHW/200 and LHW/220. However, the solids from TSF/160, TSF/180 and TSF/180-60 had their enzymatic digestibility increased, achieving conversions close to 100% with the commercial enzyme Cellic CTec2. All samples showed to be susceptible to enzymatic hydrolysis with both Cellic CTec2 and LEB-PES enzymes, with comparable conversions. The enzymatic complex of *P. echinulatum* was more efficient than the commercial enzyme in the conversion of glucan from untreated elephant grass and LHW/160 pretreatment. This is probably due to the set of enzymes present in the complex acting in synergy and facilitating access to cellulose (Martins *et al.*, 2008; Camassola & Dillon, 2010).

In all cases it is observed that the maximum conversion rate of glucan to glucose occurs within the first 12 h of enzymatic hydrolysis. In most cases after 24 h of hydrolysis the enzymatic conversion became almost insignificant.

3.5 Potential of the application of the two-stage fractionation combining liquid hot water and imidazole pretreatments

The results presented in this work showed that, among the evaluated conditions, TSF/180 pretreatment presented greater fractionation potential and hemicellulose recovery in the first stage, as well as cellulose enrichment in the solid and delignification in the second stage. The solid obtained in TSF/180 also showed high enzymatic digestibility, resulting in

glucan conversions of 96.3% (\pm 4.6) and 99.0% (\pm 3.0) after 48h of hydrolysis with the enzymatic complex LEB-PES of *P. echinulatum* and commercial enzyme Cellic CTec2, respectively. In the first stage the LHW pretreatment was carried out in non-isothermal conditions at 180 °C and in the second stage for delignification of the biomass was used imidazole at 140 °C for 182.5 min. The complete mass balance of the process for TSF/180, considering the yields and concentrations obtained in each step (as shown in Fig. 1) of this work, is presented in Fig. 7. Balance shows that for every 100 kg of elephant grass submitted to the sequential pretreatment process under the conditions used in TSF/180 it is possible to recover more than 5.4 kg of xylose and 1.3 kg of arabinose in the form of mono- and oligosaccharides in the liquid fraction, in addition to 2.7 kg of glucose. The solid fraction rich in cellulose provides 27.0 kg of glucose after the enzymatic hydrolysis, in addition to 2.2 kg of xylose (results not shown). Adding the sugars present in the liquid fraction 1 and the enzymatic hydrolysis liquor, approximately 30 kg of glucose, 7.5 kg of xylose and 1.3 kg of arabinose are obtained, totaling approximately 39 kg of sugars obtained per 100 kg of processed elephant grass.

It should also be considered that this work is the first that evaluates the use of imidazole as the second stage in sequential fractionation of biomass, and the used conditions of time and temperature were previously tested in natura biomass. Thus, it is likely that milder time/temperature conditions may be also efficient in the delignification step, since the solid already has suffered significant structural changes from the LHW treatment, facilitating the breakdown of the lignocellulosic structure. Another possibility would be to improve the agitation system of the imidazole pretreatment to guarantee better homogeneity even at lower imidazole/biomass ratios. Under these improved conditions it should be possible to achieve efficient pretreatments for the removal of lignin and higher yield of enzymatic hydrolysis,

with a higher percentage of recovery of the structural carbohydrates and lower imidazole expenditure, being able to treat volumetrically more biomass at a time.

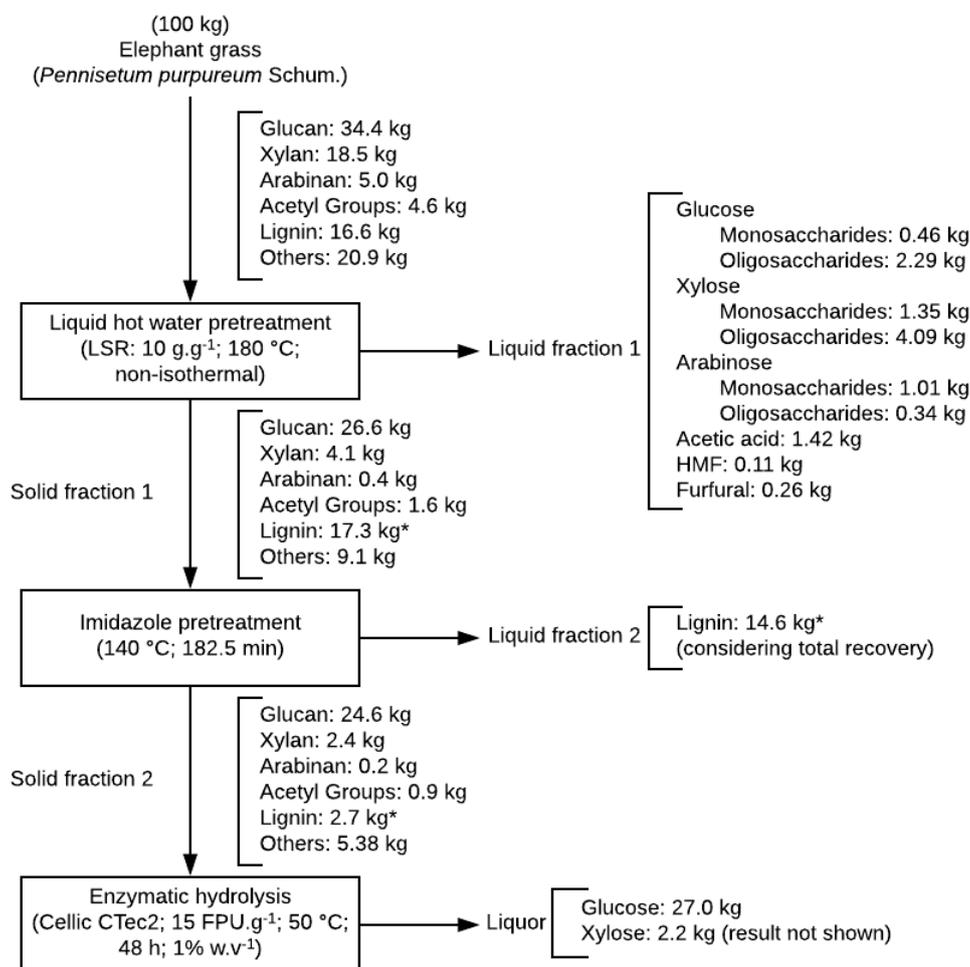


Figure 7. Total mass balance for TSF/180 pretreatment.

* Values do not differentiate lignin from elephant grass from pseudolignin formed after LHW pretreatment.

4. Conclusions

This work showed that the combination of hydrothermal pretreatment with subsequent delignification using imidazole is a good alternative to fractionate elephant grass biomass, resulting in a liquid fraction rich in mono- and oligosaccharides, mainly pentoses, and a high enzyme digestible solid rich in glucan. It was also observed that the combination

of the two processes favors the use of less severe conditions during the hydrothermal pretreatment, resulting in a lower degradation of the constituent sugars.

Acknowledgements

The authors are grateful for the financial and technical support from UCS, FURB and CAPES (scholarship).

References

- Camassola, M., Dillon, A. 2012. Cellulase determination: modifications to make the filter paper assay easy, fast, practical and efficient. *Open Access Scientific Reports*, 1, 125.
- Camassola, M., Dillon, A. J. 2010. Cellulases and xylanases production by *Penicillium echinulatum* grow on sugar cane bagasse in solid-state fermentation. *Applied biochemistry and biotechnology*, 162(7), 1889-1900.
- Dillon, A.J., Bettio, M., Pozzan, F.G., Andrighetti, T., Camassola, M. 2011. A new *Penicillium echinulatum* strain with faster cellulase secretion obtained using hydrogen peroxide mutagenesis and screening with 2-deoxyglucose. *Journal of Applied Microbiology*, 111, 48-53.
- Garrote, G., Dominguez, H., Parajo, J.C. 1999. Hydrothermal processing of lignocellulosic materials. *Holz Als Roh-Und Werkstoff*, 57(3), 191-202.
- Girio, F.M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L.C., Marques, S., Bogel-Lukasik, R. 2010. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresouce Technology*, 101(13), 4775-4800.
- Gupta, R.B., Demirbas, A. 2010. Gasoline, diesel and ethanol biofuels from grasses and plants. Cambridge University Press.
- Hashmi, M., Sun, Q., Tao, J., Wells, T., Shah, A.A., Labbe, N., Ragauskas, A.J. 2017. Comparison of autohydrolysis and ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium acetate pretreatment to enhance enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. *Bioresource technology*, 224, 714-720.
- Hou, Q., Ju, M., Li, W., Liu, L., Chen, Y., Yang, Q. 2017. Pretreatment of lignocellulosic biomass with ionic liquids and ionic liquid-based solvent systems. *Molecules*, 22, 490.
- Hu, F., Jung, S., Ragauskas, A. 2012. Pseudo-lignin formation and its impact on enzymatic hydrolysis. *Bioresource technology*, 117, 7-12.
- Jakobsons, J., Hortling, B., Erins, P., Sundquist, J. 1995. Characterization of alkali soluble fraction of steam exploded birch wood. *Holzforchung-International Journal of the Biology, Chemistry, Physics and Technology of Wood*, 49(1), 51-59.

- Jonsson, L.J., Alriksson, B., Nilvebrant, N.O. 2013. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnology for Biofuels*, 6.
- Kim, S.M., Dien, B.S., Singh, V. 2016. Promise of combined hydrothermal/chemical and mechanical refining for pretreatment of woody and herbaceous biomass. *Biotechnology for biofuels*, 9(1), 97.
- Lavoie, J.M., Capek-Menard, E., Gauvin, H., Chornet, E. 2010. Production of pulp from *Salix viminalis* energy crops using the FIRSST process. *Bioresource technology*, 101(13), 4940-4946.
- Lima, M.A., Gomez, L.D., Steele-King, C.G., Simister, R., Bernardinelli, O.D., Carvalho, M.A., Rezende, C.A., Labate, C.A., McQueen-Mason, S.J., Polikarpov, I. 2014. Evaluating the composition and processing potential of novel sources of Brazilian biomass for sustainable biorenewables production. *Biotechnology for biofuels*, 7(1), 10.
- Maity, S.K. 2015. Opportunities, recent trends and challenges of integrated biorefinery: Part I. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 43, 1427-1445.
- Martins, L.F., Kolling, D., Camassola, M., Dillon, A.J.P., Ramos, L.P. 2008. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. *Bioresource technology*, 99(5), 1417-1424.
- Meighan, B.N., Lima, D.R.S., Cardoso, W.J., Baêta, B.E.L., Adarme, O.F.H., Santucci, B.S., Pimenta, M.T.B., de Aquino, S.F., Gurgel, L.V.A. 2017. Two-stage fractionation of sugarcane bagasse by autohydrolysis and glycerol organosolv delignification in a lignocellulosic biorefinery concept. *Industrial Crops and Products*, 108, 431-441.
- Menegol, D., Scholl, A.L., Fontana, R.C., Dillon, A.J.P., Camassola, M. 2014. Increased release of fermentable sugars from elephant grass by enzymatic hydrolysis in the presence of surfactants. *Energy Conversion and Management*, 88, 1252-1256.
- Minmunin, J., Limpitipanich, P., Promwungkwa, A. 2015. Delignification of elephant grass for production of cellulosic intermediate. *Energy Procedia*, 79, 220-225.
- Mohapatra, S., Mishra, C., Behera, S.S., Thatoi, H. 2017. Application of pretreatment, fermentation and molecular techniques for enhancing bioethanol production from grass biomass – A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 78, 1007-1032.
- Montipó, S., Ballesteros, I., Fontana, R.C., Liu, S., Martins, A.F., Ballesteros, M., Camassola, M. 2018. Integrated production of second generation ethanol and lactic acid from steam-exploded elephant grass. *Bioresource Technology*, 249, 1017-1024.
- Morais, A., Pinto, J., Nunes, D., Roseiro, L.B., Oliveira, M.C., Fortunato, E., Bogel-Lukasik, R. 2016. Imidazole: prospect solvent for lignocellulosic biomass fractionation and delignification. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 4(3), 1643-1652.
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapple, M., Ladisch, M. 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 96(6), 673-86.
- Nagula, K.N., Pandit, A.B. 2016. Process intensification of delignification and enzymatic hydrolysis of delignified cellulosic biomass using various process intensification techniques including cavitation. *Bioresource Technology*, 213, 162-168.

- Overend, R.P., Chornet, E., Gascoigne, J.A. 1987. Fractionation of lignocelulosic by steam-aqueous pretreatment [and discussion]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences*, 321(1561), 523-536.
- Pedersen, M., Meyer, A.S. 2010. Lignocellulose pretreatment severity – relating pH to biomatrix opening. *New Biotechnology*, 27(6), 739-750.
- Romaní, A., Garrote, G., López, F., Parajó, J.C. 2011. *Eucalyptus globulus* wood fractionation by autohydrolysis and organosolv delignification. *Bioresource Technology*, 102(10), 5896-5904.
- Romaní, A., Tomaz, P.D., Garrote, G., Teixeira, J.A., Domingues, L. 2016. Combined alkali and hydrothermal pretreatments for oat straw valorization within a biorefinery concept. *Bioresource Technology*, 220, 323-332.
- Ruiz, H.A., Rodriguez-Jasso, R.M., Fernandes, B.D., Vicente, A.A., Teixeira, J.A. 2013. Hydrothermal processing, as an alternative for upgrading agriculture residues and marine biomass according to the biorefinery concept: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 21, 35-51.
- Ruiz, H.A., Ruzene, D.S., Silva, D. P., da Silva, F.F.M., Vicente, A.A., Teixeira, J.A. 2011. Development and characterization of an environmentally friendly process sequence (autohydrolysis and organosolv) for wheat straw delignification. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 164(5), 629-641.
- Sannigrahi, P., Kim, D.H., Jung, S., Ragauskas, A. 2011. Pseudo-lignin and pretreatment chemistry. *Energy & Environmental Science*, 4(4), 1306-1310.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D. 2008a. Determination of ash in biomass (NREL/TP-510-42622). Laboratory Analytical Procedure (LAP). National Renewable Energy Laboratory (NREL), Golden, CO.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D. 2008b. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. Laboratory Analytical Procedure (LAP). National Renewable Energy Laboratory (NREL).
- Sluiter, A., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D. 2005. Determination of extractives in biomass. Laboratory Analytical Procedure (LAP). National Renewable Energy Laboratory (NREL).
- Toscan, A., Morais, A.R.C., Paixão, S.M., Alves, L., Andreus, J., Camassola, M., Dillon, A.J.P., Lukasik, R.M. 2017a. High-pressure carbon dioxide/water pre-treatment of sugarcane bagasse and elephant grass: Assessment of the effect of biomass composition on process efficiency. *Bioresource Technology*, 224, 639-647.
- Toscan, A., Morais, A.R.C., Paixão, S.M., Alves, L., Andreus, J., Camassola, M., Dillon, A.J.P., Lukasik, R.M. 2017b. Effective extraction of lignin from elephant grass using imidazole and its effect on enzymatic saccharification to produce fermentable sugars. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 56(17), 5138-5145.
- Vallejos, M.E., Zambon, M.D., Area, M.C., da Silva Curvelo, A.A. 2015. Low liquid-solid ratio fractionation of sugarcane bagasse by hot water autohydrolysis and organosolv delignification. *Industrial Crops and Products*, 65, 349-353.

- Weinwurm, F., Turk, T., Denner, J., Whitmore, K., Friedl, A. 2017. Combined liquid hot water and ethanol organosolv treatment of wheat straw for extraction and reaction modeling. *Journal of Cleaner Production*, 165, 1473-1484.
- Yu, Q., Liu, J., Zhuang, X., Yuan, Z., Wang, W., Qi, W., Wang, Q., Tan, X., Kong, X. 2016. Liquid hot water pretreatment of energy grasses and its influence of physico-chemical changes on enzymatic digestibility. *Bioresource Technology*, 199, 265-270.

4.4 Discussão geral

A utilização de biomassa lignocelulósica como fonte renovável para produção de biocombustíveis e energia está cada vez mais próxima de se tornar uma prática viável. Porém, o balanço econômico do processo ainda é uma barreira a ser superada para que novos investimentos em plantas comerciais sejam feitos e para impulsionar as plantas piloto e comerciais já existentes, que por muitas vezes precisam parar suas atividades para evitar prejuízos. Fica evidente ao se buscarem alternativas para viabilizar a utilização de biomassa lignocelulósica que a integração de processos a fim de maximizar o aproveitamento da matéria-prima e produzir simultaneamente produtos com maior valor agregado, mesmo que em menor quantidade em comparação a produção dos biocombustíveis, pode ser uma prática perfeitamente aplicável. Ao avaliarem-se mais cautelosamente as correntes de saída dos procedimentos já adotados, observa-se que alguns produtos como oligossacarídeos, ácidos orgânicos e compostos furânicos são produzidos como consequência das condições operacionais utilizadas durante o pré-tratamento, porém, até alguns anos atrás esses produtos eram hidrolisados para subsequente conversão em mais biocombustíveis ou removidos do meio para não inibir as etapas de hidrólise enzimática e fermentação e contabilizados como perdas do processo. A realização deste trabalho contribuiu com a perspectiva de fracionamento para o máximo aproveitamento de cada constituinte da biomassa lignocelulósica e a possibilidade de obtenção de oligossacarídeos, principalmente xilooligossacarídeos, ácidos orgânicos como o acético e o fórmico, e compostos como 5-HMF e furfural, produtos obtidos durante a realização dos pré-tratamentos e com valor comercial na indústria química.

A etapa de pré-tratamento, além de ser fundamental para o processo transformação dos materiais lignocelulósicos, é responsável por grande parte dos custos do produto final devido aos altos gastos energéticos desse procedimento, bem como aos custos dos insumos

input/output (considerando solventes/catalisadores necessários para a realização da reação e os insumos necessários após a reação para separação de produtos, purificação, etc.) e equipamentos. A utilização de solventes sustentáveis como a água e o CO₂, que são amplamente disponíveis, baratos, atóxicos, não inflamáveis e menos corrosivos que solventes ácidos e alcalinos, favorece a viabilização dos pré-tratamentos. A pesquisa de mestrado realizada por da Cunha (2013), teve por objetivo estudar as empresas produtoras de etanol de segunda geração a fim de identificar as principais matérias-primas e tendências tecnológicas utilizadas e mostrou que, entre as empresas avaliadas, 41% já utilizavam pré-tratamentos em que a água era o único ou o principal solvente utilizado, sendo que as demais empresas que divulgaram o tipo de pré-tratamento utilizado faziam uso de solventes químicos ácidos ou alcalinos, com destaque para o uso de ácido sulfúrico (da Cunha, 2013). Estes dados mostram a importância e o avanço tecnológico já atingido para a utilização de pré-tratamentos hidrotérmicos, sejam estes com a utilização ou não de catalisadores ou de rápida depressurização (explosão).

Considerando o potencial já comprovado dos sistemas de pré-tratamento com água, os primeiros dois objetivos deste trabalho foram traçados a fim de avaliar os efeitos da utilização da água em combinação com o CO₂ para o pré-tratamento do capim-elefante, por ser um pré-tratamento que até então não apresentava dados publicados para esta biomassa. Como base para a comparação e também para um aprofundamento da avaliação dos efeitos deste pré-tratamento em função das características de cada biomassa, optou-se por empregar o pré-tratamento de alta pressão utilizando H₂O e CO₂ nas mesmas condições para o bagaço de cana-de-açúcar, biomassa que já possui relatos com estes solventes na literatura especializada (Gurgel *et al.*, 2014; Phan & Tan, 2014; Zhang & Wu, 2013). Os dados apresentados e discutidos na Seção 4.1 mostraram que o pré-tratamento de alta pressão utilizando H₂O e CO₂ possibilitam o fracionamento das biomassas de capim-elefante e bagaço de cana-de-açúcar,

sendo este fracionamento favorecido com o aumento do fator de severidade combinado (CS_{pCO_2}). Pode-se dizer que a principal contribuição do presente trabalho, como consequência do conjunto de experimentos apresentados na Seção 4.1, foi a constatação da influência das diferenças na composição de cada biomassa em relação à eficácia do pré-tratamento de alta pressão utilizando H_2O e CO_2 . Especificamente, verificou-se o favorecimento do fracionamento das hemiceluloses em biomassas com maiores teores de grupos acetil em sua composição devido à possibilidade de formar mais ácido acético, como consequência da despolimerização das hemiceluloses, e este atuar como catalisador da reação. Foi possível verificar ainda o efeito de tamponamento ocasionado pelos compostos caracterizados como cinzas de cada biomassa, influenciando diretamente no pH do licor obtido, apesar da similaridade nas concentrações dos ácidos orgânicos formados para ambas as biomassas.

Apesar dos bons resultados observados e das potencialidades atribuídas ao CO_2 como um solvente sustentável para a valorização da biomassa lignocelulósica, mais estudos precisam ser feitos para a viabilização da utilização do CO_2 , principalmente quando este for utilizado em um sistema de alta pressão. Dentro dos objetivos deste trabalho, o pré-tratamento de alta pressão utilizando H_2O e CO_2 não aumentou os rendimentos da hidrólise enzimática de modo suficiente para compensar a desvantagem que ele apresenta em relação à pressão atingida pelo sistema quando comparado ao pré-tratamento hidrotérmico utilizando apenas água. Como consequência, priorizou-se a utilização de pré-tratamento hidrotérmico com água no estado líquido e sem adição de catalisadores como primeiro estágio da combinação sequencial de pré-tratamentos proposta na Seção 4.3.

De acordo com Sheldon (2014), se a utilização de um solvente não puder ser evitada, o solvente escolhido deve ser seguro e permitir sua separação do produto e sua recuperação para a reutilização. Esta visão estimulou nas últimas décadas não só os estudos utilizando H_2O e CO_2 , mas também os líquidos iônicos (Sheldon, 2014). Apesar do potencial e das diversas

vantagens apresentadas pelos líquidos iônicos, já mencionadas na Seção 2.2.1.1, os altos custos desses solventes continuam abrindo espaço para busca de novas opções. Diante disso, o segundo solvente de pré-tratamento avaliado neste trabalho foi o imidazol, como uma opção promissora, ainda pouco avaliada e mais barata que os líquidos iônicos. A metodologia para estes pré-tratamentos, esquematizada na Figura 13, foi estabelecida conforme trabalho pioneiro para lignocelulósicos de Morais *et al.* (2016). Conforme resultados expostos na Seção 4.2, constatou-se que o imidazol é um ótimo solvente para deslignificação da biomassa de capim-elefante, sendo que tanto o tempo de residência quanto a temperatura da reação influenciaram significativamente na deslignificação, tendo sido possível otimizar essas variáveis para a obtenção da máxima deslignificação para esta biomassa. Perante seu potencial de deslignificação, o pré-tratamento do capim-elefante com imidazol resultou em uma fração sólida enriquecida em polissacarídeos, provenientes principalmente da celulose. Conforme esquema ilustrado na Figura 13, três procedimentos de precipitação foram realizados, sendo a fração enriquecida em celulose obtida após o primeiro procedimento. Resultados apresentados por Morais *et al.* (2016) mostraram que o segundo procedimento de precipitação tem potencial de precipitar uma fração sólida enriquecida em constituintes das hemiceluloses, enquanto o terceiro procedimento é realizado para a precipitação da lignina. Os resultados da segunda precipitação realizada nas amostras pré-tratadas de capim-elefante foram omitidas dos resultados apresentados porque das nove diferentes variações das condições testadas, apenas os três pré-tratamentos realizados nas temperaturas mais elevadas resultaram em uma recuperação de sólido com massa suficiente para ser analisada. Os conjuntos de condições temperatura/tempo testados – 135,6/57,0, 135,6/308,0, 140,0/182,5 (°C/min) – resultaram na recuperação de uma segunda fração sólida contendo em sua composição 34,4%, 49,9% e 52,6% de hemiceluloses, respectivamente. Nas três condições a xilana foi o principal constituinte recuperado. Todavia, considerando o balanço mássico

tratamento do capim-elefante *in natura* com imidazol em estágio único. Ainda assim, sem a otimização das condições operacionais para essa nova configuração de pré-tratamento, os resultados, apresentados na Seção 4.3, indicam que o processo é eficiente para fracionar seletivamente o capim-elefante, maximizando a recuperação dos constituintes da biomassa em relação aos pré-tratamentos de estágio único. O pré-tratamento em dois estágios proposto resultou em uma fração sólida rica em celulose, uma fração líquida composta principalmente por constituintes das hemiceluloses e uma solução contendo imidazol e lignina com a possibilidade de separação dos constituintes para o reaproveitamento do solvente e adequada destinação da lignina. A combinação sequencial de pré-tratamentos proposta mostrou ainda favorecer a utilização de condições de tempo de residência e temperatura mais brandas para a obtenção de altos rendimentos de hidrólise enzimática da fração enriquecida em celulose.

De um modo geral os resultados apresentados neste trabalho evidenciaram o potencial da biomassa de capim-elefante como matéria-prima renovável para uso em biorrefinarias. Os resultados mostraram que o capim-elefante pode ser utilizado para a produção de biocombustíveis, energia e outros produtos de alto valor agregado. Esta possibilidade foi evidenciada principalmente através do balanço de massa global apresentado na Seção 4.3, onde se constatou que a partir de 100 kg de capim-elefante pode-se obter pelo menos 27 kg de glicose a partir da hidrólise enzimática da fração sólida pré-tratada, e mais de 4 kg de xilo-oligossacarídeos e de 2 kg de glico-oligossacarídeos, além de arabino-oligossacarídeos e monossacarídeos em geral presentes na fração líquida do pré-tratamento. Os resultados também evidenciaram a importância de avaliar a composição da biomassa escolhida como matéria-prima e de determinar as condições de processo. O pré-tratamento em dois estágios proposto é uma nova tecnologia que comprovou ser eficiente para o fracionamento dos lignocelulósicos e contribui com os avanços tecnológicos necessários para a implementação de biorrefinarias.

5. CONCLUSÕES

O estudo apresentado buscou contribuir com o desenvolvimento de tecnologias de pré-tratamento para maximizar o aproveitamento da biomassa lignocelulósica a partir de metodologias de fracionamento adequadas e assim também colaborar com a integração de processos para a obtenção de variados produtos num contexto de biorrefinaria. Dentro deste amplo contexto e norteado pelos objetivos traçados, os dados obtidos neste estudo permitem concluir que:

- os pré-tratamentos de alta pressão utilizando H_2O e CO_2 são capazes de promover o fracionamento das biomassas de capim-elefante e bagaço de cana-de-açúcar, resultando em licores compostos por uma mistura principalmente de pentoses constituintes das hemiceluloses, xilose e arabinose, na forma oligomérica (xilo-oligossacarídeos e arabino-oligossacarídeos) e em frações sólidas enriquecidas em celulose e com maior digestibilidade enzimática que a biomassa não tratada;
- as composições das frações obtidas em cada pré-tratamento de alta pressão utilizando H_2O e CO_2 , bem como a digestibilidade enzimática das frações sólidas, são amplamente dependentes das condições operacionais;
- as características intrínsecas de cada biomassa tem impacto significativo na eficiência dos pré-tratamentos de alta pressão utilizando H_2O e CO_2 ;
- as quantidades de grupos acetil e de compostos caracterizados como cinzas na composição de cada biomassa são sugeridas como características de maior interferência nos pré-tratamentos de alta pressão utilizando H_2O e CO_2 , sendo que a maior presença de grupos acetil leva a maior produção de ácido acético durante o pré-tratamento que atua como um catalisador da reação, enquanto os compostos constituintes das cinzas apresentam efeito de tamponamento no meio;

- o bagaço de cana-de-açúcar se mostrou ser mais susceptível à hidrólise das hemiceluloses quando submetido a pré-tratamentos de alta pressão utilizando H₂O e CO₂ que o capim-elefante;
- os pré-tratamentos do capim-elefante utilizando imidazol como nova opção de solvente resultam na obtenção de uma fração sólida rica em polissacarídeos, enriquecida principalmente quanto à concentração de celulose;
- nos pré-tratamentos com imidazol, a variação de celulose e lignina na composição do sólido obtido é dependente da temperatura e do tempo de processamento, aumentando a pureza da celulose no sólido obtido, à medida que essas variáveis são aumentadas, devido ao aumento da extração da lignina (deslignificação);
- o pré-tratamento com imidazol é eficaz para aumentar a digestibilidade enzimática do capim-elefante;
- o imidazol é um solvente eficiente para a deslignificação do capim-elefante, possibilitando uma deslignificação de até 85,7% do capim-elefante em condições otimizadas – 140 °C e 313,2 min – para o pré-tratamento realizado em uma proporção imidazol:biomassa de 9 g.g⁻¹, sendo que condições mais brandas são suficientes para promover deslignificações superiores a 80%;
- o fracionamento sequencial proposto é constituído em seu primeiro estágio por um pré-tratamento hidrotérmico com água quente líquida sem o uso de catalisadores, visando a separação da fração hemicelulósica do capim-elefante e a recuperação de seus componentes principalmente em uma fração líquida, e em seu segundo estágio pelo pré-tratamento com imidazol aplicado à fração sólida recuperada no primeiro estágio para a deslignificação e obtenção de uma fração com alta concentração de celulose;

- o pré-tratamento em dois estágios é eficiente para fracionar a biomassa de capim-elefante, resultando numa fração líquida enriquecida em mono- e oligossacarídeos, principalmente pentoses, e um sólido de alta digestibilidade enzimática rico em glucano;
- a combinação dos dois processos de pré-tratamento favorece a utilização de condições menos severas durante a realização de cada estágio de pré-tratamento, resultando, mesmo sem a realização de otimizações das variáveis e dos processos auxiliares, em um balanço mássico que indica a possibilidade de obtenção de mais de 32 kg de monossacarídeos e pelo menos 6,7 kg de oligossacarídeos a partir de 100 kg de capim-elefante.

6. PERSPECTIVAS

Como perspectivas para a continuidade deste trabalho, sugere-se:

- empregar o CO₂ como catalisador de pré-tratamento em pressão atmosférica;
- avaliar a inibição da hidrólise enzimática de lignocelulósicos após pré-tratamento utilizando imidazol;
- aprimorar o equipamento para pré-tratamentos com imidazol, a fim de diminuir a proporção imidazol:biomassa utilizada;
- analisar a possibilidade de utilização do imidazol em combinação com outro solvente para a realização de pré-tratamentos;
- investigar o mecanismo do processo de deslignificação com imidazol;
- testar procedimentos para a extração da lignina dissolvida no licor de pré-tratamento contendo imidazol e analisar as características da lignina recuperada;
- avaliar o potencial de recuperação e reutilização do imidazol;
- analisar solventes orgânicos com potencial de deslignificação da biomassa lignocelulósica para empregar como segundo estágio de pré-tratamento;
- avaliar metodologias para a recuperação da lignina e para sua conversão em produtos de valor comercial;
- investigar a produção de ácidos orgânicos através da realização de pré-tratamentos hidrotérmicos;
- otimizar as condições do pré-tratamento em dois estágio proposto para aumentar o rendimento de oligossacarídeos e melhorar a recuperação do processo;
- testar metodologias de purificação dos xilo-oligossacarídeos.

7. REFERÊNCIAS

- Agbor, V.B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A., Levin, D.B. 2011. Biomass pretreatment: fundamentals toward application. **Biotechnology Advances**, 29(6), 675-85.
- Alvira, P., Tomas-Pejo, E., Ballesteros, M., Negro, M.J. 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, 101(13), 4851-61.
- Angima, S., Stott, D., O'neill, M., Ong, C., Weesies, G. 2002. Use of calliandra–Napier grass contour hedges to control erosion in central Kenya. **Agriculture, ecosystems & environment**, 91(1-3), 15-23.
- Anwar, Z., Gulfraz, M., Irshad, M. 2014. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: a brief review. **Journal of radiation research and applied sciences**, 7(2), 163-173.
- Balat, M. 2011. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. **Energy conversion and management**, 52(2), 858-875.
- Balat, M., Balat, H. 2009. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. **Applied energy**, 86(11), 2273-2282.
- Balat, M., Balat, H., Öz, C. 2008. Progress in bioethanol processing. **Progress in energy and combustion science**, 34(5), 551-573.
- Banerjee, G., Car, S., Scott-Craig, J.S., Borrusch, M.S., Walton, J.D. 2010. Rapid optimization of enzyme mixtures for deconstruction of diverse pretreatment/biomass feedstock combinations. **Biotechnology for biofuels**, 3(1), 22.
- Bobleter, O. 1994. Hydrothermal Degradation of Polymers Derived from Plants. **Progress in Polymer Science**, 19(5), 797-841.
- Bobleter, O., Niesner, R., Röhr, M. 1976. The hydrothermal degradation of cellulosic matter to sugars and their fermentative conversion to protein. **Journal of Applied Polymer Science**, 20(8), 2083-2093.
- Boerjan, W., Ralph, J., Baucher, M. 2003. Lignin biosynthesis. **Annual review of plant biology**, 54(1), 519-546.
- Bogel-Lukasik, R., Goncalves, L.M.N., Bogel-Lukasik, E. 2010. Phase equilibrium phenomena in solutions involving tannins, flavonoids and ionic liquids. **Green Chemistry**, 12(11), 1947-1953.
- Bozell, J.J., Petersen, G.R. 2010. Technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates-the US Department of Energy's "Top 10" revisited. **Green Chemistry**, 12(4), 539-554.
- BP. 2017. BP Statistical Review of World Energy.
- BP. 2018. BP Statistical Review of World Energy.
- Buckeridge, M.S., Cavalari, A.A., Silva, G.B. 2008. Parede celular. **Fisiologia vegetal**, 165-181.
- Buckeridge, M.S., de Souza, A.P. 2014. Breaking the “Glycomic Code” of cell wall polysaccharides may improve second-generation bioenergy production from biomass. **Bioenergy Research**, 7(4), 1065-1073.
- Camassola, M., De Bittencourt, L.R., Shenem, N.T., Andreaus, J., Dillon, A.J.P. 2004. Characterization of the cellulase complex of *Penicillium echinulatum*. **Biocatalysis and Biotransformation**, 22(5-6), 391-396.
- Camassola, M., Dillon, A.J. 2009. Biological pretreatment of sugar cane bagasse for the production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum*. **Industrial Crops and Products**, 29(2-3), 642-647.

- Camassola, M., Dillon, A.J. 2010. Cellulases and xylanases production by *Penicillium echinulatum* grown on sugar cane bagasse in solid-state fermentation. **Applied biochemistry and biotechnology**, 162(7), 1889-1900.
- Canilha, L., Milagres, A., Silva, S., Silva, J., Felipe, M., Rocha, G., Ferraz, A., Carvalho, W. 2010. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal. **Revista Analytica**, 44, 48-54.
- Castro, A.M.d., Pereira Jr, N. 2010. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, 33(1), 181-188.
- Choi, S., Song, C.W., Shin, J.H., Lee, S.Y. 2015. Biorefineries for the production of top building block chemicals and their derivatives. **Metabolic engineering**, 28, 223-239.
- Clark, J.H., Deswarte, F.E.I., Farmer, T.J. 2009. The integration of green chemistry into future biorefineries. **Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr**, 3(1), 72-90.
- Conab. 2018. Acompanhamento de Safra Brasileira: Cana-de-açúcar, Vol. 4, pp. 73.
- da Cunha, G.P. 2013. Identificação e Análise de Empresas Internacionais Produtoras de Etanol 2G. in: Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, **Dissertação de Mestrado em Ciências em Engenharia de Biocombustíveis e Petroquímica**, Universidade Federal do Rio de Janeiro, pp. 234.
- Dadi, A.P., Varanasi, S., Schall, C.A. 2006. Enhancement of cellulose saccharification kinetics using an ionic liquid pretreatment step. **Biotechnology and Bioengineering**, 95(5), 904-910.
- De Bhowmick, G., Sarmah, A.K., Sen, R. 2017. Lignocellulosic biorefinery as a model for sustainable development of biofuels and value added products. **Bioresource technology**, 247, 1144-1154.
- de Jong, E., Higson, A., Walsh, P., Wellisch, M. 2012. Bio-based chemicals value added products from biorefineries. **IEA Bioenergy, Task42 Biorefinery**.
- de Souza, A.P., Leite, D.C., Pattathil, S., Hahn, M.G., Buckeridge, M.S. 2013. Composition and structure of sugarcane cell wall polysaccharides: implications for second-generation bioethanol production. **BioEnergy Research**, 6(2), 564-579.
- Dias, M.O., Junqueira, T.L., Cavalett, O., Cunha, M.P., Jesus, C.D., Rossell, C.E., Maciel Filho, R., Bonomi, A. 2012. Integrated versus stand-alone second generation ethanol production from sugarcane bagasse and trash. **Bioresource technology**, 103(1), 152-161.
- Dillon, A. 2004. Cellulases. in: **Enzimas como agentes biotecnológicos**, (Ed.) S.P. Said, R.C.L.R., Legis Summa, pp. 243-269.
- Dillon, A., Bettio, M., Pozzan, F., Andrighetti, T., Camassola, M. 2011. A new *Penicillium echinulatum* strain with faster cellulase secretion obtained using hydrogen peroxide mutagenesis and screening with 2-deoxyglucose. **Journal of applied microbiology**, 111(1), 48-53.
- Dillon, A.J., Toresan, S.O.P., Barp, L.P. 1992. Isolation of cellulase-producing mutants from a *Penicillium* sp strain denominated 3MUV24. **Revista brasileira de genética**, 15(3), 491-8.
- Dillon, A.J., Zorgi, C., Camassola, M., Henriques, J.A.P. 2006. Use of 2-deoxyglucose in liquid media for the selection of mutant strains of *Penicillium echinulatum* producing increased cellulase and β -glucosidase activities. **Applied microbiology and biotechnology**, 70(6), 740.
- Dillon, A.J.P., Camassola, M., Henriques, J.A.P., Fungaro, M.H.P., Azevedo, A.C.S., Velho, T.A.F., Laguna, S.E. 2008. Generation of recombinants strains to cellulases production by protoplast fusion between *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma harzianum*. **Enzyme and Microbial Technology**, 43(6), 403-409.

- Domanska, U., Bogel-Lukasik, R. 2005. Physicochemical properties and solubility of alkyl-(2-hydroxyethyl)-dimethylammonium bromide. **Journal of Physical Chemistry B**, 109(24), 12124-12132.
- Domańska, U., Kozłowska, M., Rogalski, M. 2002. Solubility of imidazoles in alcohols. **Journal of Chemical & Engineering Data**, 47(1), 8-16.
- Dupont, J., Consorti, C.S., Spencer, J. 2000. Room temperature molten salts: Neoteric "green" solvents for chemical reactions and processes. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 11(4), 337-344.
- Earle, M.J., Esperanca, J.M.S.S., Gilea, M.A., Lopes, J.N.C., Rebelo, L.P.N., Magee, J.W., Seddon, K.R., Widegren, J.A. 2006. The distillation and volatility of ionic liquids. **Nature**, 439(7078), 831-834.
- El-Zawawy, W.K., Ibrahim, M.M., Abdel-Fattah, Y.R., Soliman, N.A., Mahmoud, M.M. 2011. Acid and enzyme hydrolysis to convert pretreated lignocellulosic materials into glucose for ethanol production. **Carbohydrate polymers**, 84(3), 865-871.
- Feng, L., Chen, Z.-l. 2008. Research progress on dissolution and functional modification of cellulose in ionic liquids. **Journal of Molecular Liquids**, 142(1-3), 1-5.
- Gandini, A., Belgacem, M.N. 1997. Furans in polymer chemistry. **Progress in Polymer Science**, 22(6), 1203-1379.
- García, A., Alriols, M.G., Labidi, J. 2014. Evaluation of different lignocellulosic raw materials as potential alternative feedstocks in biorefinery processes. **Industrial Crops and Products**, 53, 102-110.
- Garrote, G., Dominguez, H., Parajo, J.C. 1999. Hydrothermal processing of lignocellulosic materials. **Holz Als Roh-Und Werkstoff**, 57(3), 191-202.
- Girio, F.M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L.C., Marques, S., Bogel-Lukasik, R. 2010. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, 101(13), 4775-4800.
- Gourlay, K., Hu, J., Arantes, V., Andberg, M., Saloheimo, M., Penttilä, M., Saddler, J. 2013. Swollenin aids in the amorphogenesis step during the enzymatic hydrolysis of pretreated biomass. **Bioresource technology**, 142, 498-503.
- Gupta, R.B., Demirbas, A. 2010. **Gasoline, diesel and ethanol biofuels from grasses and plants**. Cambridge University Press.
- Gurgel, L.V.A., Pimenta, M.T.B., da Silva Curvelo, A.A. 2014. Enhancing liquid hot water (LHW) pretreatment of sugarcane bagasse by high pressure carbon dioxide (CO₂). **Industrial Crops and Products**, 57, 141-149.
- Haldar, D., Sen, D., Gayen, K. 2016. A review on the production of fermentable sugars from lignocellulosic biomass through conventional and enzymatic route—A comparison. **International Journal of Green Energy**, 13(12), 1232-1253.
- Hamelinck, C.N., Van Hooijdonk, G., Faaij, A.P. 2005. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle-and long-term. **Biomass and bioenergy**, 28(4), 384-410.
- Harmsen, P., Huijgen, W., Bermudez, L., Bakker, R. 2010. Literature review of physical and chemical pretreatment processes for lignocellulosic biomass. Wageningen UR, **Food & Biobased Research**.
- Hartmann, C. 2017. Pré-tratamento de biomassa lignocelulósica por macrofungos regionais para posterior produção de etanol de segunda geração, **Dissertação de Mestrado**, Universidade de Caxias do Sul.
- Holladay, J.E., Bozell, J.J., White, J.F., Johnson, D. 2007. Top value-added chemicals from biomass. Volume II - Results of Screening for Potential Candidates from Biorefinery Lignin. **DOE Report PNNL-16983 - Disponível online: http://chembioprocess.pnl.gov/staff/staff_info.asp**.

- Hon, D.N.-S. 1994. Cellulose: a random walk along its historical path. **Cellulose**, 1(1), 1-25.
- Howard, R., Abotsi, E., Van Rensburg, E.J., Howard, S. 2004. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. **African Journal of Biotechnology**, 2(12), 602-619.
- Huber, T., Müssig, J., Curnow, O., Pang, S., Bickerton, S., Staiger, M.P. 2012. A critical review of all-cellulose composites. **Journal of Materials Science**, 47(3), 1171-1186.
- IEA. 2017. Key world energy statistics.
- Isikgor, F.H., Becer, C.R. 2015. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. **Polymer Chemistry**, 6(25), 4497-4559.
- Janesko, B.G. 2011. Modeling interactions between lignocellulose and ionic liquids using DFT-D. **Physical Chemistry Chemical Physics**, 13(23), 11393-11401.
- JN. 2018. Produção de energia ganha reforço do campo: bagaço da cana de açúcar, (Ed.) Jornal Nacional-G1. **Disponível online:** <https://g1.globo.com/jornal-nacional/noticia/2018/08/17/producao-de-energia-ganha-reforco-do-campo-bagaco-da-cana-de-acucar.ghtml>.
- Jonsson, L.J., Alriksson, B., Nilvebrant, N.O. 2013. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. **Biotechnology for Biofuels**, 6.
- Jordan, T., Schmidt, S., Liebert, T., Heinze, T. 2014. Molten imidazole - a starch solvent. **Green Chemistry**, 16(4), 1967-1973.
- Kamm, B., Kamm, M. 2007. Biorefineries - Multi product processes. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, 105, 175-204.
- Kilpeläinen, I.A., Xie, H., King, A., Granstrom, M., Heikkinen, S., Argyropoulos, D.S. 2007. Dissolution of wood in ionic liquids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 55(22), 9142-8.
- Kim, S.M., Dien, B.S., Singh, V. 2016. Promise of combined hydrothermal/chemical and mechanical refining for pretreatment of woody and herbaceous biomass. **Biotechnology for biofuels**, 9(1), 97.
- Knauf, M., Moniruzzaman, M. 2004. Lignocellulosic biomass processing: A perspective. **International sugar journal**, 106(1263), 147-150.
- Kumar, S., Kothari, U., Kong, L., Lee, Y., Gupta, R.B. 2011. Hydrothermal pretreatment of switchgrass and corn stover for production of ethanol and carbon microspheres. **Biomass and Bioenergy**, 35(2), 956-968.
- Larsen, J., Haven, M.Ø., Thirup, L. 2012. Inbicon makes lignocellulosic ethanol a commercial reality. **Biomass and Bioenergy**, 46, 36-45.
- Larsson, S., Palmqvist, E., Hahn-Hagerdal, B., Tengborg, C., Stenberg, K., Zacchi, G., Nilvebrant, N.O. 1999. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. **Enzyme and Microbial Technology**, 24(3-4), 151-159.
- Larsson, S., Quintana-Sáinz, A., Reimann, A., Nilvebrant, N.-O., Jönsson, L.J. 2000. Influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Twenty-First Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals**. Springer, 617-632.
- Laser, M., Schulman, D., Allen, S.G., Lichwa, J., Antal Jr, M.J., Lynd, L.R. 2002. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. **Bioresource Technology**, 81(1), 33-44.
- Lima, M.A., Gomez, L.D., Steele-King, C.G., Simister, R., Bernardinelli, O.D., Carvalho, M.A., Rezende, C.A., Labate, C.A., McQueen-Mason, S.J., Polikarpov, I. 2014. Evaluating the composition and processing potential of novel sources of Brazilian biomass for sustainable biorenewables production. **Biotechnology for biofuels**, 7(1), 10.

- Lin, F.-M., Qiao, B., Yuan, Y.-J. 2009. Comparative proteomic analysis of tolerance and adaptation of ethanologenic *Saccharomyces cerevisiae* to furfural, a lignocellulosic inhibitory compound. **Applied and environmental microbiology**, 75(11), 3765-3776.
- Liu, Z., Slininger, P., Dien, B., Berhow, M., Kurtzman, C., Gorsich, S. 2004. 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 and Biotechnology**, 31(8), 345-352.
- Machado, C., Damaso, M., de Souza, D., Braga, M., Onoyama, M., Garcia, L., Quirino, B., Rodrigues, D.d.S., Carvalho, F.d.P., de Almeida, J. 2016. Contextualização, mercado e gargalos de P&D do etanol lignocelulósico. **Embrapa Agroenergia-Documentos (INFOTECA-E)**.
- Magalhães da Silva, S.P., Morais, A.R.C., Bogel-Lukasik, R. 2014. The CO₂-assisted autohydrolysis of wheat straw. **Green Chemistry**, 16, 238-246.
- Maity, S.K. 2015. Opportunities, recent trends and challenges of integrated biorefinery: Part I. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 43, 1427-1445.
- Marabezi, K. 2009. Estudo sistemático das reações envolvidas na determinação dos teores de lignina e holocelulose em amostras de bagaço e palha de cana-de-açúcar. in: Instituto de Química de São Carlos, **Dissertação de Mestrado**, Universidade de São Paulo, pp. 142.
- Marchal, V., Dellink, R., Van Vuuren, D., Clapp, C., Chateau, J., Magné, B., van Vliet, J. 2011. OECD environmental outlook to 2050. **Organization for Economic Cooperation and Development**.
- Martins, L.F., Kolling, D., Camassola, M., Dillon, A.J.P., Ramos, L.P. 2008. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. **Bioresource technology**, 99(5), 1417-1424.
- Medve, J. 1997. Cellulose hydrolysis by *Trichoderma reesei* cellulases: Studies on adsorption, sugar production and synergism of cellobiohydrolase I, II and endoglucanase II. Lund University Publications.
- Meighan, B.N., Lima, D.R.S., Cardoso, W.J., Baêta, B.E.L., Adarme, O.F.H., Santucci, B.S., Pimenta, M.T.B., de Aquino, S.F., Gurgel, L.V.A. 2017. Two-stage fractionation of sugarcane bagasse by autohydrolysis and glycerol organosolv delignification in a lignocellulosic biorefinery concept. **Industrial Crops and Products**, 108, 431-441.
- Menegol, D., Scholl, A.L., Fontana, R.C., Dillon, A.J.P., Camassola, M. 2014. Potential of a *Penicillium echinulatum* enzymatic complex produced in either submerged or solid-state cultures for enzymatic hydrolysis of elephant grass. **Fuel**, 133, 232-240.
- Menon, V., Rao, M. 2012. Trends in bioconversion of lignocellulose: biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science**, 38(4), 522-550.
- Michelin, M., Maria de Lourdes, T., Ruzene, D.S., Silva, D.P., Vicente, A.A., Jorge, J.A., Terenzi, H.F., Teixeira, J.A. 2012. Xylanase and β -xylosidase production by *Aspergillus ochraceus*: new perspectives for the application of wheat straw autohydrolysis liquor. **Applied biochemistry and biotechnology**, 166(2), 336-347.
- Mohapatra, S., Mishra, C., Behera, S.S., Thatoi, H. 2017. Application of pretreatment, fermentation and molecular techniques for enhancing bioethanol production from grass biomass—A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 78, 1007-1032.
- Montipó, S., Ballesteros, I., Fontana, R.C., Liu, S., Martins, A.F., Ballesteros, M., Camassola, M. 2018. Integrated production of second generation ethanol and lactic acid from steam-exploded elephant grass. **Bioresource Technology**, 249, 1017-1024.

- Morais, A., Pinto, J., Nunes, D., Roseiro, L.B., Oliveira, M.C., Fortunato, E., Bogel-Lukasik, R. 2016. Imidazole: prospect solvent for lignocellulosic biomass fractionation and delignification. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, 4(3), 1643-1652.
- Morais, A.R.C., da Costa Lopes, A.M., Bogel-Lukasik, R. 2015. Carbon Dioxide in Biomass Processing: Contributions to the Green Biorefinery Concept. **Chemical Reviews**, 115(1), 3-27.
- Morais, A.R.C., Mata, A.C., Bogel-Lukasik, R. 2014. Integrated conversion of agroindustrial residue with high pressure CO₂ within the biorefinery concept. **Green Chemistry**, 16(9), 4312-4322.
- Morais, R.F.d. 2008. Potencial produtivo e eficiência da fixação biológica de nitrogênio de cinco genótipos de capim elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.), para uso como fonte alternativa de energia. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapple, M., Ladisch, M. 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, 96(6), 673-86.
- O'sullivan, A.C. 1997. Cellulose: the structure slowly unravels. **Cellulose**, 4(3), 173-207.
- OECD. 2003. **Imidazole CAS N°: 288-32-4**. in: *OECD SIDS - UNEP PUBLICATIONS*.
- Olivier-Bourbigou, H., Magna, L., Morvan, D. 2010. Ionic liquids and catalysis: Recent progress from knowledge to applications. **Applied Catalysis, A: General**, 373(1-2), 1-56.
- Pereira, B.M.P., Alvarez, T.M., da Silva Delabona, P., Dillon, A.J.P., Squina, F.M., da Cruz Pradella, J.G. 2013. Cellulase on-site production from sugar cane bagasse using *Penicillium echinulatum*. **BioEnergy Research**, 6(3), 1052-1062.
- Phan, D.T., Tan, C.-S. 2014. Innovative pretreatment of sugarcane bagasse using supercritical CO₂ followed by alkaline hydrogen peroxide. **Bioresource Technology**, 167, 192-197.
- Quéno, L.M.R., de Souza, Á.N., Ângelo, H., do Vale, A.T., Martins, I.S. 2011. Production cost of biomasses from eucalyptus and elephant grass for energy. **Cerne**, 17(3), 417-426.
- Quesada, D. 2005. Parâmetros quantitativos e qualitativos de diferentes genótipos de capim-elefante com potencial para uso energético, **Tese de Doutorado em Agronomia-Seropédica-RJ**, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro-UFRRJ, 76p.
- Ragagnin de Menezes, C., Durrant, L.R. 2008. Xilooligossacarídeos: produção, aplicações e efeitos na saúde humana. **Ciência Rural**, 38(2).
- Ramos, L.P. 2003. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, 26(6), 863-871.
- Rasmussen, H., Sorensen, H.R., Meyer, A.S. 2014. Formation of degradation compounds from lignocellulosic biomass in the biorefinery: sugar reaction mechanisms. **Carbohydrate Research**, 385, 45-57.
- Reddy, N., Yang, Y. 2005. Biofibers from agricultural byproducts for industrial applications. **TRENDS in Biotechnology**, 23(1), 22-27.
- Reguly, J. 1996. **Biotecnologia dos processos fermentativos: fundamentos, matérias primas agrícolas, produtos e processos**. Pelotas: UFPel, 1, 221.
- Remsing, R.C., Hernandez, G., Swatloski, R.P., Masefski, W.W., Rogers, R.D., Moyna, G. 2008. Solvation of carbohydrates in N, N'-dialkylimidazolium ionic liquids: A multinuclear NMR spectroscopy study. **The Journal of Physical Chemistry B**, 112(35), 11071-11078.
- RFA. 2018. ETHANOL INDUSTRY OUTLOOK.

- Ribeiro, D.A., Cota, J., Alvarez, T.M., Brüchli, F., Bragato, J., Pereira, B.M., Pauletti, B.A., Jackson, G., Pimenta, M.T., Murakami, M.T. 2012. The *Penicillium echinulatum* secretome on sugar cane bagasse. **PLoS One**, 7(12), e50571.
- Rodrigues, J.A.R. 2011. Do engenho à biorrefinaria: a usina de açúcar como empreendimento industrial para a geração de produtos bioquímicos e biocombustíveis. **Química Nova**, 34, 1242-1254.
- Romaní, A., Garrote, G., López, F., Parajó, J.C. 2011. *Eucalyptus globulus* wood fractionation by autohydrolysis and organosolv delignification. **Bioresource Technology**, 102(10), 5896-5904.
- Romaní, A., Tomaz, P.D., Garrote, G., Teixeira, J.A., Domingues, L. 2016. Combined alkali and hydrothermal pretreatments for oat straw valorization within a biorefinery concept. **Bioresource technology**, 220, 323-332.
- Ruiz, H.A., Rodriguez-Jasso, R.M., Fernandes, B.D., Vicente, A.A., Teixeira, J.A. 2013. Hydrothermal processing, as an alternative for upgrading agriculture residues and marine biomass according to the biorefinery concept: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 21, 35-51.
- Ruiz, H.A., Ruzene, D.S., Silva, D.P., da Silva, F.F.M., Vicente, A.A., Teixeira, J.A. 2011. Development and characterization of an environmentally friendly process sequence (autohydrolysis and organosolv) for wheat straw delignification. **Applied biochemistry and biotechnology**, 164(5), 629-641.
- Saha, B.C. 2003. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 30(5), 279-291.
- Saloheimo, M., Paloheimo, M., Hakola, S., Pere, J., Swanson, B., Nyssönen, E., Bhatia, A., Ward, M., Penttilä, M. 2002. Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials. **European Journal of Biochemistry**, 269(17), 4202-4211.
- Samson, R., Mani, S., Boddey, R., Sokhansanj, S., Quesada, D., Urquiaga, S., Reis, V., Ho Lem, C. 2005. The potential of C4 perennial grasses for developing a global BIOHEAT industry. **BPTS**, 24(5-6), 461-495.
- Santos, F.A., Queiróz, J.D., Colodette, J.L., Fernandes, S.A., Guimarães, V.M., Rezende, S.T. 2012. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, 35(5), 1004-1010.
- Scheller, H.V., Ulvskov, P. 2010. Hemicelluloses. **Annual review of plant biology**, 61.
- Scholl, A.L., Menegol, D., Pitarelo, A.P., Fontana, R.C., Zandoná Filho, A., Ramos, L.P., Dillon, A.J.P., Camassola, M. 2015a. Elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum.) pretreated via steam explosion as a carbon source for cellulases and xylanases in submerged cultivation. **Industrial Crops and Products**, 70, 280-291.
- Scholl, A.L., Menegol, D., Pitarelo, A.P., Fontana, R.C., Zandoná Filho, A., Ramos, L.P., Dillon, A.J.P., Camassola, M. 2015b. Elephant grass pretreated by steam explosion for inducing secretion of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum* S1M29 solid-state cultivation. **Industrial Crops and Products**, 77, 97-107.
- Scholl, A.L., Menegol, D., Pitarelo, A. P., Fontana, R. C., Zandoná Filho, A., Ramos, L. P., Dillon, A. J. P., Camassola, M. 2015. Ethanol production from sugars obtained during enzymatic hydrolysis of elephant grass (*Pennisetum purpureum*, Schum.) pretreated by steam explosion. **Bioresource Technology**, 192, 228-237.
- Schuchardt, U., Ribeiro, M.L., Gonçalves, A.R. 2001. A indústria petroquímica no próximo século: como substituir o petróleo como matéria-prima? **Química Nova**, 24(2), 247-251.
- Sehnm, N.T., da Silva Machado, A., Leite, F.C.B., de Barros Pita, W., de Moraes, M.A., Ayub, M.A.Z. 2013. 5-Hydroxymethylfurfural induces ADH7 and ARI1 expression in

- tolerant industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain P6H9 during bioethanol production. **Bioresource technology**, 133, 190-196.
- Sheldon, R.A. 2014. Green and sustainable manufacture of chemicals from biomass: state of the art. **Green Chemistry**, 16(3), 950-963 and references cited therein.
- Sheldon, R.A. 2005. Green solvents for sustainable organic synthesis: state of the art. **Green Chemistry**, 7(5), 267-278.
- Sindhu, R., Binod, P., Pandey, A. 2016. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass—An overview. **Bioresource technology**, 199, 76-82.
- Singh, R., Varma, A., Laxman, R.S., Rao, M. 2009. Hydrolysis of cellulose derived from steam exploded bagasse by *Penicillium* cellulases: comparison with commercial cellulase. **Bioresource Technology**, 100(24), 6679-6681.
- Smiglak, M., Reichert, W.M., Holbrey, J.D., Wilkes, J.S., Sun, L.Y., Thrasher, J.S., Kirichenko, K., Singh, S., Katritzky, A.R., Rogers, R.D. 2006. Combustible ionic liquids by design: is laboratory safety another ionic liquid myth? **Chemical Communications**, (24), 2554-2556.
- Somerville, C. 2006. Cellulose synthesis in higher plants. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, 22, 53-78.
- Sorek, N., Yeats, T.H., Szemenyei, H., Youngs, H., Somerville, C.R. 2014. The implications of lignocellulosic biomass chemical composition for the production of advanced biofuels. **BioScience**, 64(3), 192-201.
- Stracke, M.P. 2008. Líquidos iônicos: síntese, caracterização, utilização como reservatórios moleculares de hidrogênios e aplicação em baterias. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Strezov, V., Evans, T.J., Hayman, C. 2008. Thermal conversion of elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum) to bio-gas, bio-oil and charcoal. **Bioresource technology**, 99(17), 8394-8399.
- Suhas, V., Carrott, P., Singh, R., Chaudhary, M., Kushwaha, S. 2016. Cellulose: A review as natural, modified and activated carbon adsorbent: biomass, bioenergy, biowastes, conversion technologies, biotransformations, production technologies. **Bioresource technology**, 216, 1066-1076.
- Toor, S.S., Rosendahl, L., Rudolf, A. 2011. Hydrothermal liquefaction of biomass: a review of subcritical water technologies. **Energy**, 36(5), 2328-2342.
- Vallejos, M.E., Zambon, M.D., Area, M.C., da Silva Curvelo, A.A. 2015. Low liquid-solid ratio fractionation of sugarcane bagasse by hot water autohydrolysis and organosolv delignification. **Industrial Crops and Products**, 65, 349-353.
- Vanholme, R., Morreel, K., Ralph, J., Boerjan, W. 2008. Lignin engineering. **Current opinion in plant biology**, 11(3), 278-285.
- Vazquez, M.J., Alonso, J.L., Dominguez, H., Parajo, J.C. 2000. Xylooligosaccharides: manufacture and applications. **Trends in Food Science & Technology**, 11(11), 387-393.
- Villaverde, J.J., Li, J., Ek, M., Ligeró, P., de Vega, A. 2009. Native lignin structure of *Miscanthus x giganteus* and its changes during acetic and formic acid fractionation. **Journal of agricultural and food chemistry**, 57(14), 6262-6270.
- Wasserscheid, P. 2006. Chemistry - Volatile times for ionic liquids. **Nature**, 439(7078), 797-797.
- Wasserscheid, P., Welton, T. 2003. **Ionic Liquids in Synthesis**. Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
- Weil, J., Westgate, P., Kohlmann, K., Ladisch, M.R. 1994. Cellulose pretreatments of lignocellulosic substrates. **Enzyme and microbial technology**, 16(11), 1002-1004.

- Weinwurm, F., Turk, T., Denner, J., Whitmore, K., Friedl, A. 2017. Combined liquid hot water and ethanol organosolv treatment of wheat straw for extraction and reaction modeling. **Journal of Cleaner Production**, 165, 1473-1484.
- Welker, C.M., Balasubramanian, V.K., Petti, C., Rai, K.M., DeBolt, S., Mendu, V. 2015. Engineering plant biomass lignin content and composition for biofuels and bioproducts. **Energies**, 8(8), 7654-7676.
- Werpy, T., Petersen, G.R. 2004. **Top Value Added Chemicals From Biomass - Volume I: Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas the Pacific Northwest National Laboratory (PNNL) and the National Renewable Energy Laboratory (NREL)**.
- Wilkes, J.S., Zaworotko, M.J. 1992. Air and water stable 1-ethyl-3-methylimidazolium based ionic liquids. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, (13), 965-967.
- Wörmeyer, K., Ingram, T., Saake, B., Brunner, G., Smirnova, I. 2011. Comparison of different pretreatment methods for lignocellulosic materials. Part II: Influence of pretreatment on the properties of rye straw lignin. **Bioresource technology**, 102(5), 4157-4164.
- Xie, X.-M., Zhang, X.-Q., Dong, Z.-X., Guo, H.-R. 2011. Dynamic changes of lignin contents of MT-1 elephant grass and its closely related cultivars. **Biomass and bioenergy**, 35(5), 1732-1738.
- Zakrzewska, M.E., Bogel-Lukasik, E., Bogel-Lukasik, R. 2010. Solubility of Carbohydrates in Ionic Liquids. **Energy & Fuels**, 24, 737-745.
- Zavrel, M., Bross, D., Funke, M., Buchs, J., Spiess, A.C. 2009. High-throughput screening for ionic liquids dissolving (ligno-)cellulose. **Bioresource Technology**, 100(9), 2580-7.
- Zhang, H.D., Wu, S.B. 2013. Subcritical CO₂ pretreatment of sugarcane bagasse and its enzymatic hydrolysis for sugar production. **Bioresource Technology**, 149, 546-550.
- Zhang, K., Pei, Z., Wang, D. 2016a. Organic solvent pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and biochemicals: a review. **Bioresource technology**, 199, 21-33.
- Zhang, S.J., Sun, N., He, X.Z., Lu, X.M., Zhang, X.P. 2006. Physical properties of ionic liquids: Database and evaluation. **Journal of Physical and Chemical Reference Data**, 35(4), 1475-1517.
- Zhang, X., Wilson, K., Lee, A.F. 2016b. Heterogeneously catalyzed hydrothermal processing of C5–C6 sugars. **Chemical reviews**, 116(19), 12328-12368.
- Zhang, Y.H.P. 2008. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 35(5), 367-375.
- Zhao, X., Cheng, K., Liu, D. 2009. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 82(5), 815-27.

ANEXO I

Electronic Supporting information

High-pressure carbon dioxide/water pre-treatment of sugarcane bagasse and elephant grass: assessment of the effect of biomass composition on process efficiency

Andréia Toscan^{a,b}, Ana Rita C. Morais^{a,c}, Susana M. Paixão^a, Luís Alves^a, Jürgen Andreas^d, Marli Camassola^b, Aldo José Pinheiro Dillon^b and Rafal M. Lukasik^{a*}

^a Unidade de Bioenergia, Laboratório Nacional de Energia e Geologia, I.P., Estrada do Paço do Lumiar 22, 1649-038 Lisboa, Portugal.

*e-mail: rafal.lukasik@lneg.pt; Fax: +351217163636; phone +351210924600 ext. 4224

^b Universidade de Caxias do Sul – Instituto de Biotecnologia, Laboratório de Enzimas e Biomassa, 95070-560 Caxias do Sul, RS, Brazil

^c LAQV/REQUIMTE, Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2829-516 Caparica, Portugal

^d Departamento de Química, Universidade Regional de Blumenau, 89030-903 Blumenau, SC, Brazil

The reaction heating and pressure profiles

Sugarcane bagasse

| $CS_{pCO_2} = -1.17^a$ | | | $CS_{pCO_2} = -1.13^b$ | | | $CS_{pCO_2} = -1.08^c$ | | |
|------------------------|--------|---------|------------------------|--------|---------|------------------------|--------|---------|
| t (min) | T (°C) | p (bar) | t (min) | T (°C) | p (bar) | t (min) | T (°C) | p (bar) |
| 0.00 | 22 | 50.77 | 0.00 | 24 | 50.72 | 0.00 | 23 | 50.02 |
| 1.00 | 23 | 50.87 | 1.00 | 28 | 50.83 | 1.00 | 27 | 49.77 |
| 2.00 | 31 | 52.54 | 2.00 | 39 | 52.54 | 2.00 | 36 | 51.06 |
| 3.00 | 43 | 55.13 | 3.00 | 56 | 55.06 | 3.00 | 46 | 53.24 |
| 4.00 | 60 | 57.74 | 4.00 | 69 | 57.58 | 4.00 | 59 | 55.67 |
| 5.00 | 70 | 60.48 | 5.00 | 81 | 60.13 | 5.00 | 72 | 58.28 |
| 6.00 | 90 | 63.14 | 6.00 | 92 | 62.49 | 6.00 | 86 | 60.82 |
| 7.00 | 104 | 65.41 | 7.00 | 104 | 64.43 | 7.00 | 98 | 63.05 |
| 8.00 | 118 | 66.92 | 8.00 | 116 | 65.80 | 8.00 | 111 | 65.07 |
| 9.00 | 129 | 68.18 | 9.00 | 126 | 67.14 | 9.00 | 122 | 66.94 |
| 10.00 | 143 | 69.24 | 10.00 | 137 | 68.41 | 10.00 | 133 | 68.38 |
| 11.00 | 157 | 70.51 | 11.00 | 146 | 69.70 | 11.00 | 143 | 69.66 |
| 12.00 | 169 | 71.94 | 12.00 | 158 | 71.19 | 12.00 | 153 | 70.84 |
| 13.00 | 178 | 73.44 | 13.00 | 169 | 72.72 | 13.00 | 164 | 72.30 |
| 13.18 | 180 | 73.81 | 13.72 | 180 | 73.78 | 14.00 | 172 | 73.46 |
| | | | | | | 14.88 | 180 | 74.61 |

Reaction conditions: ^a $T_{\text{req}} = 180$ °C, 4 g dry biomass/40 g H₂O; ^b $T_{\text{req}} = 180$ °C, 3 g dry biomass/30 g H₂O; ^c $T_{\text{req}} = 180$ °C, 5 g dry biomass/50 g H₂O.

(continuation)

| $CS_{pCO_2} = -0.66^a$ | | | $CS_{pCO_2} = -0.60^b$ | | | $CS_{pCO_2} = -0.06^c$ | | |
|------------------------|-----------|------------|------------------------|-----------|------------|------------------------|-----------|------------|
| t (min) | T (°C) | p (bar) | t (min) | T (°C) | p (bar) | t (min) | T (°C) | p (bar) |
| 0.00 | 22 | 50.17 | 0.00 | 22 | 50.06 | 0.00 | 23 | 51.03 |
| 1.00 | 24 | 50.27 | 1.00 | 24 | 49.79 | 1.00 | 24 | 51.04 |
| 2.00 | 36 | 51.97 | 2.00 | 31 | 50.32 | 2.00 | 41 | 52.89 |
| 3.00 | 51 | 54.45 | 3.00 | 41 | 51.54 | 3.00 | 64 | 55.51 |
| 4.00 | 68 | 57.11 | 4.00 | 52 | 53.11 | 4.00 | 82 | 58.30 |
| 5.00 | 80 | 59.65 | 5.00 | 64 | 54.87 | 5.00 | 97 | 60.89 |
| 6.00 | 91 | 62.04 | 6.00 | 76 | 56.90 | 6.00 | 107 | 63.14 |
| 7.00 | 102 | 64.35 | 7.00 | 87 | 59.07 | 7.00 | 116 | 64.98 |
| 8.00 | 114 | 65.68 | 8.00 | 99 | 61.10 | 8.00 | 125 | 66.47 |
| 9.00 | 128 | 67.28 | 9.00 | 111 | 62.92 | 9.00 | 136 | 68.13 |
| 10.00 | 139 | 68.67 | 10.00 | 123 | 64.22 | 10.00 | 148 | 69.74 |
| 11.00 | 153 | 70.07 | 11.00 | 133 | 65.33 | 11.00 | 159 | 71.34 |
| 12.00 | 166 | 71.47 | 12.00 | 146 | 66.13 | 12.00 | 172 | 72.82 |
| 13.00 | 177 | 73.18 | 13.00 | 155 | 66.88 | 13.00 | 177 | 74.56 |
| 14.00 | 186 | 74.86 | 14.00 | 167 | 67.61 | 14.00 | 187 | 76.22 |
| 15.00 | 197 | 76.83 | 15.00 | 178 | 68.50 | 15.00 | 193 | 78.10 |
| 15.40 | 200 | 77.64 | 16.00 | 186 | 69.58 | 16.00 | 199 | 80.40 |
| | | | 17.00 | 194 | 70.78 | 17.00 | 207 | 82.99 |
| | | | 18.00 | 198 | 72.04 | 18.00 | 214 | 85.29 |
| | | | 18.30 | 200 | 72.49 | 18.62 | 220 | 86.84 |

Reaction conditions: ^a $T_{\text{final}} = 200$ °C, 3 g dry biomass/30 g H_2O ; ^b $T_{\text{final}} = 200$ °C, 8 g dry biomass/80 g H_2O ; ^c $T_{\text{final}} = 220$ °C, 3 g dry biomass/30 g H_2O .

Elephant grass

| $CS_{pCO_2} = -1.14^a$ | | | $CS_{pCO_2} = -1.13^b$ | | | $CS_{pCO_2} = -1.10^c$ | | |
|------------------------|-----------|------------|------------------------|-----------|------------|------------------------|-----------|------------|
| t (min) | T (°C) | p (bar) | t (min) | T (°C) | p (bar) | t (min) | T (°C) | p (bar) |
| 0.00 | 23 | 50.74 | 0.00 | 22 | 50.75 | 0.00 | 22 | 50.87 |
| 1.00 | 25 | 50.74 | 1.00 | 24 | 51.43 | 1.00 | 24 | 52.29 |
| 2.00 | 34 | 51.58 | 2.00 | 34 | 54.48 | 2.00 | 33 | 54.56 |
| 3.00 | 46 | 53.00 | 3.00 | 49 | 57.06 | 3.00 | 48 | 56.88 |
| 4.00 | 60 | 54.69 | 4.00 | 65 | 59.63 | 4.00 | 65 | 59.28 |
| 5.00 | 73 | 56.30 | 5.00 | 83 | 61.90 | 5.00 | 82 | 61.23 |
| 6.00 | 86 | 57.85 | 6.00 | 99 | 63.84 | 6.00 | 96 | 62.76 |
| 7.00 | 100 | 59.31 | 7.00 | 114 | 65.34 | 7.00 | 108 | 64.24 |
| 8.00 | 113 | 60.64 | 8.00 | 126 | 66.91 | 8.00 | 121 | 65.81 |
| 9.00 | 125 | 61.97 | 9.00 | 138 | 68.34 | 9.00 | 131 | 67.39 |
| 10.00 | 136 | 63.19 | 10.00 | 149 | 69.75 | 10.00 | 141 | 69.02 |
| 11.00 | 147 | 64.44 | 11.00 | 158 | 71.35 | 11.00 | 152 | 70.83 |
| 12.00 | 158 | 65.77 | 12.00 | 167 | 73.00 | 12.00 | 161 | 72.61 |
| 13.00 | 167 | 67.05 | 13.00 | 176 | 74.98 | 13.00 | 169 | 74.47 |
| 14.00 | 176 | 68.54 | 13.45 | 180 | 76.01 | 14.00 | 178 | 76.71 |
| 14.48 | 180 | 69.06 | | | | 14.12 | 180 | 76.99 |

Reaction conditions: ^a $T_{\text{final}} = 180$ °C, 6 g dry biomass/60 g H₂O; ^b $T_{\text{final}} = 180$ °C, 3 g dry biomass/30 g H₂O; ^c $T_{\text{final}} = 180$ °C, 4 g dry biomass/40 g H₂O.

(continuation)

| $CS_{pCO_2} = -0.61^a$ | | | $CS_{pCO_2} = -0.56^b$ | | | $CS_{pCO_2} = -0.04^c$ | | |
|------------------------|--------|---------|------------------------|--------|---------|------------------------|--------|---------|
| t (min) | T (°C) | p (bar) | t (min) | T (°C) | p (bar) | t (min) | T (°C) | p (bar) |
| 0.00 | 22 | 50.83 | 0.00 | 23 | 50.45 | 0.00 | 22 | 50.94 |
| 1.00 | 26 | 50.99 | 1.00 | 27 | 52.91 | 1.00 | 25 | 52.04 |
| 2.00 | 38 | 52.15 | 2.00 | 36 | 55.58 | 2.00 | 36 | 55.41 |
| 3.00 | 52 | 54.00 | 3.00 | 51 | 58.07 | 3.00 | 49 | 59.90 |
| 4.00 | 67 | 56.15 | 4.00 | 69 | 62.35 | 4.00 | 67 | 62.89 |
| 5.00 | 81 | 58.18 | 5.00 | 85 | 66.28 | 5.00 | 82 | 66.06 |
| 6.00 | 96 | 60.10 | 6.00 | 99 | 68.44 | 6.00 | 97 | 67.99 |
| 7.00 | 108 | 61.82 | 7.00 | 115 | 70.44 | 7.00 | 109 | 69.99 |
| 8.00 | 122 | 63.49 | 8.00 | 127 | 72.77 | 8.00 | 121 | 72.11 |
| 9.00 | 133 | 64.73 | 9.00 | 140 | 72.74 | 9.00 | 133 | 74.15 |
| 10.00 | 145 | 66.02 | 10.00 | 150 | 77.00 | 10.00 | 144 | 76.35 |
| 11.00 | 158 | 67.32 | 11.00 | 160 | 79.34 | 11.00 | 153 | 78.48 |
| 12.00 | 169 | 68.65 | 12.00 | 169 | 81.76 | 12.00 | 161 | 80.79 |
| 13.00 | 180 | 69.82 | 13.00 | 177 | 84.37 | 13.00 | 171 | 83.39 |
| 14.00 | 188 | 71.08 | 14.00 | 187 | 87.09 | 14.00 | 180 | 85.81 |
| 15.00 | 192 | 72.54 | 15.00 | 194 | 89.80 | 15.00 | 189 | 88.58 |
| 16.00 | 198 | 74.12 | 15.78 | 200 | 91.91 | 16.00 | 197 | 91.35 |
| 16.17 | 200 | 74.44 | | | | 17.00 | 204 | 94.24 |
| | | | | | | 18.00 | 211 | 97.58 |
| | | | | | | 18.90 | 220 | 100.37 |

Reaction conditions: ^a $T_{\text{final}} = 200$ °C, 5 g dry biomass/50 g H₂O; ^b $T_{\text{final}} = 200$ °C, 3 g dry biomass/30 g H₂O; ^c $T_{\text{final}} = 220$ °C, 3 g dry biomass/30 g H₂O.

Mathematic formulas

The severity factor ($\log R_0$) is a mono-parameter representation of high-pressure CO₂/H₂O pre-treatments, which is dependent on temperature, T (°C), heating time, t (min). The value 14.75 is an empirical parameter related to temperature and activation energy as proposed by (Overend *et al.*, 1987). The Eq. 1 presents the mathematical formula of R_0 .

$$R_0 = \int_0^t e^{\left(\frac{T(t)-100}{14.75}\right)} dt \quad (\text{Eq. 1})$$

The determination of pH of the reaction medium during pre-treatment, due to high temperature and pressure, is technically impossible, so pH values were estimated using the Eq. 2 (van Walsum, 2001):

$$pH = (8.00 \times 10^{-6}) \times T^2 + 0.00209 \times T - 0.216 \times \ln(pCO_2) + 3.92 \quad (\text{Eq. 2})$$

where T abbreviates temperature expressed in °C and pCO_2 is the partial pressure of CO₂ in atmospheres. To estimate the pCO_2 , the CO₂ density was calculated using Peng-Robinson equation of state (Peng & Robinson, 1976) employing initial temperature and CO₂ pressure of each experiment (please refer to ESI). Henry's constant was used to determine the pCO_2 according to literature (van Walsum, 2001). The solubility of CO₂ in water at the final temperature was modelled using PE software (Pfohl *et al.*, 1998).

The combined severity factor (CS_{pCO_2}) comprises the influence of pH from added CO₂ on severity and denotes all variables examined in this work as one numerical parameter (van Walsum, 2001). The mathematic formula of CS_{pCO_2} is presented in Eq. 3.

$$CS_{pCO_2} = \log R_0 - pH \quad (\text{Eq. 3})$$

The mass balances were performed for all polysaccharides in the biomass and included the composition of both liquor and processed solid. The liquor composition was calculated using formulas presented in Eq. 4 and Eq. 5.

$$\text{Pentose yield (\%)} = \frac{132/150 \times [\text{pentose}]_{\text{liquor}} \times V_{\text{reaction}}}{m_{\text{biomass}}^{\text{initial}} \times \text{xylan or arabinan content}_{\text{biomass}}^{\text{initial}}} \times 100 \quad (\text{Eq. 4})$$

$$\text{Glucose yield (\%)} = \frac{162/180 \times [\text{hexose}]_{\text{liquor}} \times V_{\text{reaction}}}{m_{\text{biomass}}^{\text{initial}} \times \text{glucan content}} \times 100 \quad (\text{Eq. 5})$$

Pentose yield denominates the yields of xylan to xylooligomers or to xylose and yields of arabinan to arabinooligomers or to arabinose. The glucose yield means yield of glucan to glucooligomers or to glucose. The $[\text{sugar}]_{\text{liquor}}$ is the concentration of pentoses or glucoses in the liquor in g/L, V_{reaction} is the liquid phase reaction volume in L, $m_{\text{biomass}}^{\text{initial}}$ is the dry weight of biomass used in the reaction in g and *pentosan or glucan* $_{\text{biomass}}^{\text{initial}}$ in the pentosan or glucan content in dry weight of native biomass. The 132/150 and 162/180 are conversion factors (molecular weights) used to convert xylose to xylan and glucose to glucan, respectively.

The SCB and EG dissolution was calculated using Eq. 6.

$$\text{Biomass dissolution(\%)} = \frac{m_{\text{biomass}}^{\text{initial}} - m_{\text{processed solid}}}{m_{\text{biomass}}^{\text{initial}}} \times 100 \quad (\text{Eq. 6})$$

where $m_{\text{processed solid}}$ is the mass of dry weight of processed SCB or EG solid.

The enzymatic hydrolysis yield or more precisely glucan to glucose yield was calculated using Eq. 7.

$$\text{Glucan to glucose yield(\%)} = \frac{162/180 \times [\text{glucose}] \times V}{\text{glucan content}} \times 100 \quad (\text{Eq. 7})$$

where $[\text{glucose}]$ is the glucose concentration detected in the hydrolysate in g/L, V is the volume of the solution in L and *glucan content* is the amount of glucan in native or processed biomasses (% of dried weight) prior to enzymatic hydrolysis.

References

- (1) Overend, R.P., Chornet, E., Gascoigne, J.A. 1987. Fractionation of lignocellulosic by steam-aqueous pretreatments [and discussion]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series A: Physical Sciences and Engineering, 321(1561), 523-536.

- (2) Peng, D., Robinson, D.B. 1976. New 2-constant equation of state. *Industrial & Engineering Chemistry*, 15(1), 59-64.
- (3) Pfohl, O., Petkov, S., Brunner, G. 1998. PE V2.9.9a – Software for phase equilibria calculations. Technische Universität Hamburg-Hamburg, Hamburg, Germany.
- (4) van Walsum, G.P. 2001. Severity function describing the hydrolysis of xylan using carbonic acid. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 91-93, 317-329.