



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 10 2013 010415-9 A2

(22) Data de Depósito: 29/04/2013
(43) Data da Publicação: 25/03/2014
(RPI 2255)



(51) Int.Cl.:
C12P 7/06
C12P 7/10
C12P 7/14

(54) Título: PROCESSO DE PRODUÇÃO DE
MOLÉCULAS ORGÂNICAS A PARTIR DA BIOMASSA

(73) Titular(es): Universidade Federal de Santa Catarina,
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

(72) Inventor(es): Ayla Sant'Ana da Silva, Elba Pinto da Silva
Bon, Ricardo Sponsina Sobral Teixeira, Seung-Hwan Lee, Takashi
Endo

(57) Resumo: PROCESSO DE PRODUÇÃO DE MOLÉCULAS
ORGÂNICAS A PARTIR DA BIOMASSA. Processo de produção de
moléculas orgânicas a partir da biomassa que compreende as etapas
de: (a) pré-tratamento contínuo de uma biomassa com líquidos iônicos
em um misturador; (b) hidrólise de biomassa pré-tratada; e (c)
separação do xarope de açúcares do sólido residual não hidrolisado
rico em lignina; e, (d) fermentação do xarope de açúcares, onde a
etapa (a) ocorre de forma contínua em um misturador, no qual uma
razão de elevada de biomassa; líquido iônico é misturada
possibilitando a atuação efetiva do líquido iônico na biomassa.

PROCESSO DE PRODUÇÃO DE MOLÉCULAS ORGÂNICAS A PARTIR DA
BIOMASSA

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção pertence ao campo da produção de
5 moléculas orgânicas a partir de biomassas.

ESTADO DA TÉCNICA

Biomassas podem ter várias origens como os resíduos
da agroindústria e das indústrias papelreira e madeireira e
do cultivo de algas, bem como outras origens. As biomassas
10 podem ser fontes renováveis de energia, podendo ser usadas
como substitutos para combustíveis - fósseis. Estudos
visando à utilização da biomassa lignocelulósica e da
biomassa de algas, por exemplo, na produção de etanol e
biodiesel vem aumentando a cada ano. Entretanto, o
15 processamento destas biomassas ainda é um desafio.

No caso das biomassas lignocelulósicas, estas
apresentam características em seu estado original que
dificultam ou até impossibilitam seu uso em processos
industriais: densidade relativamente baixa de energia,
20 grande volume que dificulta o transporte, tamanho e
composição não uniforme, dentre outros.

No passado, a hidrólise ácida da biomassa
lignocelulósica com ácido sulfúrico concentrado foi um
método muito pesquisado para a hidrólise dos
25 polissacarídeos da biomassa em açúcares. No entanto, cada
vez mais esse enfoque tem sido abandonado por diversas
razões, entre elas: (i) a utilização de ácidos causa a
corrosão de equipamentos, o que requer altos investimentos
em equipamentos resistentes à corrosão; (ii) o alto gasto
30 energético com etapas de recuperação do ácido; (iii)
geração de efluentes tóxicos; (iv) necessidade de correção
do pH para a etapa de fermentação; (v) produção de
subprodutos que inibem a fermentação alcoólica.

Nesse sentido, a hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica se mostra como uma alternativa interessante, já que esta não apresenta as desvantagens da hidrólise catalisada por ácidos, descritas acima. Por outro lado, esse processo apresenta outras dificuldades, como a velocidade lenta de reação devido à acessibilidade limitada das enzimas aos polissacarídeos presentes na biomassa *in natura*. Por isso, ao se optar por um processo de hidrólise enzimática, uma etapa de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica é necessária. O pré-tratamento tem o objetivo de desestruturar a biomassa composta principalmente pela parede celular de plantas e algas, aumentando assim a acessibilidade das enzimas ao substrato durante a hidrólise.

Diversos métodos de pré-tratamento foram desenvolvidos, incluindo processos biológicos, físicos, químicos e físico-químicos. Apesar dos esforços contínuos para o desenvolvimento de pré-tratamentos efetivos e economicamente viáveis, as pesquisas ainda estão em andamento.

Recentemente, o uso de líquidos iônicos para o pré-tratamento da biomassa ganhou bastante evidência, principalmente devido à aplicação potencial desses reagentes como "solventes verdes".

Os líquidos iônicos podem ser classificados como materiais constituídos puramente por íons que apresentam uma temperatura de fusão abaixo de 100 °C, sendo muitos deles líquidos a temperatura ambiente. Os líquidos iônicos apresentam características muito interessantes como, por exemplo, o fato de poderem ser projetados de acordo com as características físico-químicas almejadas, através da combinação de diferentes cátions e ânions. Além disso, normalmente, apresentam pressão de vapor não mensurável e,

geralmente, uma estabilidade térmica em uma ampla faixa de temperaturas. Como resultado, os líquidos iônicos têm sido utilizados com sucesso na substituição de solventes tradicionais em diversos processos industriais e apresentam o potencial de diminuir a dependência da indústria no uso de compostos orgânicos voláteis.

Os líquidos iônicos já foram relatados como capazes de dissolver a celulose e materiais lignocelulósicos, como palha de arroz, palha de trigo, gramíneas e madeira. Alguns líquidos iônicos foram utilizados para realizar uma extração seletiva da lignina da serragem de madeira, o que possibilita uma nova rota de fracionamento da biomassa (Zhu et al., 2006; Sun et al., 2009; Lee et al., 2009; Li et al., 2010; Mäki-Arvela et al., 2010; Nguyen et al., 2010).

No tratamento da biomassa lignocelulósica com líquidos iônicos, após a dissolução, a fração da biomassa rica em celulose pode ser precipitada através da adição de um anti-solvente como, por exemplo, a água. A lignina extraída e outros extrativos podem ser removidos com a lavagem. O mais relevante é que, após o pré-tratamento com líquidos iônicos, o tempo de hidrólise enzimática da celulose pode ser reduzido drasticamente e rendimentos de conversão em glicose próximos a 100% podem ser obtidos. Li e colaboradores (2010) reportaram a necessidade de apenas 12 h de hidrólise enzimática de uma gramínea pré-tratada com líquido iônico para atingir mais de 90% de rendimento, enquanto a hidrólise da mesma biomassa lignocelulósica tratada com ácido diluído necessitou de 72 h de sacarificação para atingir 80% de conversão da celulose a glicose.

Apesar de existirem muitas vantagens relacionadas ao pré-tratamento mediado por líquidos iônicos, a utilização

desses reagentes em larga escala para essa aplicação é ainda uma realidade distante, principalmente devido ao seu alto custo atual. A maioria dos métodos de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica com líquidos iônicos descritos
5 reporta uma razão de biomassa lignocelulósica:líquido iônico em uma faixa de 1:15 - 1:20 (m/m), assumindo que os líquidos iônicos precisam ser utilizados em grande excesso em relação à biomassa lignocelulósica, exercendo dessa forma a função de um solvente e não de um aditivo químico
10 capaz que promover modificações na estrutura da biomassa. Como é necessária uma quantidade cerca de 20 vezes maior de líquido iônico para o tratamento efetivo da biomassa lignocelulósica, isto pode constituir um impedimento para a utilização futura desses reagentes, mesmo que o custo
15 tenda a diminuir com o aumento da demanda. Além disso, a menor carga relativa de líquidos iônicos diminui, consideravelmente, o consumo da água para a sua remoção. Apesar dos fatores citados acima, ainda existem poucas informações sobre qual seria realmente a quantidade mínima
20 necessária de líquidos iônicos para um pré-tratamento efetivo da biomassa lignocelulósica.

O estado da técnica prevê o uso de líquidos iônicos na dissolução da biomassa contendo celulose para a derivatização e isolamento da celulose. O WO2011027220
25 trata de um processo contínuo para a dissolução de pelo menos uma parte de um material contendo celulose derivado de algas, no líquido iônico, que apresenta as etapas de desmineralização da biomassa; contactar a biomassa desmineralizada com líquidos iônicos e dissolver ao menos
30 em parte o componente de celulose da biomassa.

O documento WO2011149341 trata de um processo de tratamento da biomassa lignocelulósica para a produção de xilose e furfural, que compreende dissolver a biomassa em

uma mistura 10:1 ou 1:10 entre um líquido iônico e um ácido orgânico, que pode ser o cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio, cloreto de 1-etil-3-metilimidazólio ou acetato de 1-butil-3-metilimidazólio; e um ácido orgânico
5 que pode ser o ácido acético, ácido cítrico, ácido láctico, ácido propiônico, ácido butanoico ou ácido sulfônico.

O documento WO2011027223 descreve um processo de tratamento da biomassa lignocelulósica para produção de
10 furfurais, que utiliza uma razão 10 : 1 a 1 : 10 entre um ácido orgânico e um líquido iônico em condições de subsolvatação para dissolver até 10% do peso seco de uma biomassa.

Já o WO2012040003 descreve um processo de pré-
15 tratamento da biomassa, para a produção de açúcares e outros derivados, no qual uma solução aquosa contendo um líquido iônico é aquecida entre 100 e 180 °C, sendo adicionado entre 26 e 60% em peso de um sal cosmotrópico. A adição do sal cosmotrópico permite a reciclagem dos
20 líquidos iônicos.

Um método de conversão de uma biomassa lignocelulósica em açúcares é descrito no WO2008112291. Neste método, no máximo 35p% da biomassa é incubada com um excesso de líquidos iônicos sob condições adequadas;
25 posteriormente a biomassa é lavada com um antissolvente para a retirada, ao menos parcial, do líquido iônico; e finalmente a biomassa pré-tratada com o líquido iônico é hidrolisada.

Finalmente, o PI0806416-4 descreve um método de
30 fracionamento de material lignocelulósico consistindo da formação de um sistema bifásico contendo uma fase líquida iônica (aproximadamente 60% de água) livre de lignocelulose e uma segunda fase líquida contendo

hidróxido de sódio, lignina e celulose. A razão entre a fase líquida e o material lignocelulósico é de cerca de 20:1.

Além disso, os processos de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica usuais utilizam misturadores sem agitação ou equipados com sistema de agitação contínuo ineficiente, onde as transferências de massa e calor não são realizadas de forma ideal em condições com alta carga de, ou seja, maiores que 20%. Como o efeito da temperatura é primordial para uma atuação efetiva do líquido iônico na biomassa, para se aumentar a carga de sólidos em um processo de pré-tratamento com estes reagentes é necessário utilizar um sistema de agitação eficiente.

OBJETIVO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a um processo de produção de moléculas orgânicas a partir da biomassa que compreende seu pré-tratamento com um líquido iônico em um misturador, que permite o tratamento contínuo e com altas cargas de sólidos.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Para se obter uma completa visualização dos objetivos da presente invenção, é necessária a leitura deste documento e a análise dos desenhos que o acompanham e aos quais se faz referências conforme segue abaixo.

Figura 1 - gráfico em barras dos rendimentos de açúcares após a hidrólise da biomassa extrusada com líquidos iônicos.

Figura 2 - gráfico do (a) comparação da hidrólise enzimática do bagaço *in natura*; extrusado sem adição de líquidos iônicos; extrusado com líquidos iônicos; (b) produtividade da hidrólise enzimática após a de sacarificação.

Figura 3 - Comparação dos rendimentos em glicose

obtidos após a hidrólise enzimática das amostras pré-tratadas com as diferentes razões de bagaço:líquidos iônicos.

Figura 4 - Análise das modificações morfológicas do bagaço de cana pré-tratado; em A pré-tratamento com variação no número de ciclos de extrusão, e em B o pré-tratamento em diferentes temperaturas.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção trata de um processo de produção de moléculas orgânicas a partir da biomassa que compreende as etapas de:

- (a) pré-tratamento contínuo de uma biomassa com líquido iônico em um misturador;
- (b) hidrólise da biomassa pré-tratada;
- (c) separação do xarope de açúcares do sólido residual não hidrolisado rico em lignina; e,
- (d) fermentação do xarope de açúcares.

Somente para fins desta invenção, os termos biomassa, biomassa lignocelulósica e biomassa celulósica são sinônimos e são usados sem distinção daqui em diante. Além disso, o termo biomassa deve ser entendido como uma biomassa lignocelulósica oriunda de resíduos agrícolas como bagaços de cana-de-açúcar e de frutas; palha de soja, milho, arroz, e cana-de-açúcar; sabugos como o do milho e mileto; resíduos florestais como as toras e lascas de madeiras; subprodutos do processamento de madeiras como a serragem, pellets e briquetes; casca, galhos grossos e finos, folhas, tocos, raízes e serapilheira; o termo biomassa ainda pode ser entendido com uma biomassa rica em celulose como produtos, subprodutos e resíduos da indústria do papel como a polpa de celulose, resíduos de celulose, resíduos da indústria de reciclagem de papel; finalmente, o termo biomassa ainda pode ser entendido como

uma biomassa oriunda de algas.

Em um aspecto da invenção, no processo de produção de moléculas orgânicas, a etapa (a) ocorre de forma contínua em um misturador, no qual a biomassa é misturada com o líquido iônico utilizando uma razão elevada de biomassa:líquido iônico. Nos processos de pré-tratamento de biomassa pertencentes ao estado da técnica, em geral é utilizada uma razão biomassa:líquido iônico de 1:20 massa/massa (m/m). Porém, no processo aqui descrito, a razão entre a biomassa:líquido iônico é de entre 1:0,5 a 1:12 massa/massa (m/m), sendo que a mistura ocorre a uma temperatura de entre 40 a 200°C, durante 5 a 150 minutos em um misturador capaz de promover uma mistura eficiente, a fim de possibilitar a atuação efetiva do líquido iônico na biomassa.

Preferencialmente, a mistura ocorre a uma razão 1:1 a 1:10, entre 80 a 160°C durante 15 a 100 minutos.

Para fins desta invenção, misturador é qualquer equipamento ou dispositivo pertencente ao estado da técnica, que seja capaz de misturar de forma eficaz uma mistura de biomassa com líquido iônico apresentando uma elevada razão da biomassa:líquido iônico, facilitando o acesso, na etapa (b) das enzimas hidrolíticas aos polissacarídeos contidos na biomassa, o que irá permitir a liberação eficiente dos monossacarídeos pelas enzimas. Preferencialmente, o misturador é uma extrusora com controlador de temperatura onde a razão entre o comprimento do cilindro para o diâmetro da rosca (L/D) é de entre 10:1 a 100:1. Mais preferencialmente ainda, o misturador é uma extrusora de dupla-rosca.

Na etapa (a) são realizados de 1 a 6 ciclos de extrusão, com velocidade de rotação da extrusora de até 400 rpm.

Preferencialmente, é fornecida uma razão de entre 1:1 a 1:8 m/m de biomassa:líquido iônico; a temperatura fica entre 50 a 160 °C, sendo realizados entre 1 a 3 ciclos de extrusão.

5 Ainda para fins desta invenção, o líquido iônico é um sal contendo o cátion 1,3 dialquil-imidazólico, tetraalquil amônio, fosfônio, alquil-piridínico; podendo ser um líquido iônico é pertencente ao grupo consistido de: acetato de 1-butil-3-metilimidazólio ([Bmim][Cl]), acetato
10 de 1-etil-3-metilimidazólio ([Emim][Ac]), acetato de 1-butil-3-metilimidazólio ([Bmim][Ac]), cloreto de 1-alil-3-metilimidazólio ([Amim][Cl]), fosfato de 1,3-dimetilimidazólio dimetil ([Mmim][DMP]), metanosulfato de 1-benzil-3-metilimidazólio, metanosulfato de 1-(2-
15 feniletil)-3-metilimidazólio, metanosulfato de 1-(3-fenilpropil)-3-metilimidazólio, metanosulfato de 1-(2,2-feniletila)-3-metilimidazólio, tetrafluoroborato de 1-benzil-3-metilimidazólio, hexafluorofosfato de 1-(3-fenilpropil)-3-metilimidazólio, tetrafluoroborato de 1-
20 benzil-3-metilimidazólio, bis-(trifluormetanosulfonyl)imidato de 1-benzil-3-metilimidazólio, bis-(trifluormetanosulfonyl)imidato de 1-(2-feniltil)-3-metilimidazólio, bis-(trifluormetanosulfonyl)imidato de 1-(3-fenilpropil)-3-metilimidazólio, bis-
25 (trifluormetanosulfonyl)imidato de 1-(2,2-feniltil)-3-metilimidazólio, hexafluorofosfato de 1-(2-feniletil)-3-metilimidazólio, bis-(trifluormetanosulfonyl)imidato de 1-(2-cicloexiletal)-3-metilimidazólio, bis-
(trifluormetanosulfonyl)imidato de 1-(3-cicloexilpropil)-
30 3-metilimidazólio, bis-(trifluormetanosulfonyl)imidato de 1-(2,2-cicloexiletal)-3-metilimidazólio, cloreto de 1-carboximetil-3-metilimidazólico, ou uma mistura destes.

Preferivelmente, a biomassa é pertencente ao grupo

consistido pelo bagaço de cana-de-açúcar, palha de cana-de-açúcar, gramíneas, palha de trigo, palha de arroz, palha de milho, lascas de madeiras, serragem, polpa de celulose e resíduos de celulose; e o líquido iônico é

5 pertencente ao grupo consistido de: 1-butil-3-metilimidazólio ([Bmim][Cl]), acetato de 1-etil-3-metilimidazólio ([Emim][Ac]), acetato de 1-butil-3-metilimidazólio ([Bmim][Ac]), cloreto de 1-alil-3-metilimidazólio ([Amim][Cl]), fosfato de 1,3-

10 dimetilimidazólio dimetil ([Mmim][DMP]), ou uma mistura destes.

Mais preferivelmente ainda, na etapa (a) é fornecida uma razão de entre 1:1 a 1:5 m/m da biomassa:líquido iônico; a biomassa é pertencente ao grupo consistido de

15 bagaço de cana-de-açúcar, palha de cana-de-açúcar, gramíneas, palha de trigo, palha de arroz, palha de milho e resíduos de celulose; o líquido iônico é o 1-etil-3-metilimidazólio ([Emim][Ac]) ou fosfato de 1,3-dimetilimidazólio dimetil ([Mmim][DMP]), ou uma mistura

20 destes.

Após o pré-tratamento, a biomassa desestruturada na etapa (a) é submetida a uma etapa de hidrólise para liberação dos açúcares que compõe às fibras de celulose e/ou a hemicelulose.

25 Desta forma, na etapa (a) do processo desta invenção, onde o líquido iônico e a biomassa misturados com uma elevada razão de biomassa:líquido iônico, a extrusora é utilizada ao mesmo tempo como misturador e misturador de pré-tratamento, constituindo um processo

30 contínuo, onde grandes quantidades de biomassa, preferencialmente uma biomassa lignocelulósica podem ser processadas por hora. Assim, este processo contínuo representa uma grande vantagem em relação aos sistemas de

pré-tratamento em batelada com líquidos iônicos atualmente empregados e em relação a outros métodos, tais como a explosão a vapor e o tratamento hidrotérmico.

Na etapa (b) a biomassa desestruturada é submetida à
5 hidrólise enzimática para a liberação dos açúcares contidos na biomassa. Esta etapa ocorre por meios pertencentes ao estado da técnica, utilizando enzimas conhecidas pelos especialistas no assunto, como por exemplo, endo-(1,4)- β -D-glucanases, exo-(1,4)- β -D-
10 glucanases, β -glucosidases, endo-1,4- β -D-xilanases, β -xilosidases, α -L-arabinofuranosidases, α -glucoronidases, acetil xilana esterases, feruloil esterases ou uma mistura destas, durante um período entre 3 a 72 horas.

Opcionalmente, ao final da etapa (b) as moléculas
15 orgânicas obtidos são sacarídeos como a glicose e a xilose. A figura 1 é um gráfico que apresenta o teor de glicose e xilose livres ao final da etapa (b).

Na etapa (c) ocorre a separação da mistura reacional rica em glicose e xilose do sólido residual rico em
20 lignina. A lignina obtida pode ser utilizada como matéria-prima para a produção de insumos químicos ou para geração de energia.

Na etapa (d) os açúcares liberados durante a hidrólise, são fermentados por meios, e em condições
25 pertencentes ao estado da técnica, para a produção de etanol. Na etapa (d) são usados microrganismos fermentadores, tais como, preferencialmente, as leveduras *Sacharomices cerevisae*, *Sacharomices ellipsoideus*, *Sacharomices carlbergensis* e *Sacharomices warum*, e
30 bactérias como *Zymomonas mobilis*, incluindo linhagens modificadas geneticamente para a fermentação da xilose, dentre outros.

Em uma primeira modalidade da invenção, a molécula

orgânica obtida ao final da etapa (c) é um resíduo rico em lignina e ao final da etapa (d) é o etanol.

Em uma modalidade alternativa da invenção, a etapa (d) não é realizada e a molécula orgânica obtida é um resíduo sólido rico em lignina e uma solução de um ou mais açúcares livres que são posteriormente purificados ou não por processos conhecidos por métodos pertencentes ao estado da técnica. Nesta modalidade da invenção, ou um ou mais açúcares livres produzidos são oligossacarídeos ou monossacarídeos como a glicose e a xilose.

Em uma outra modalidade da invenção, as etapas (b), (c) e (d) não são realizadas, e após o pré-tratamento é obtido um resíduo rico em celulose, hemicelulose e lignina, que submetida a etapas posteriores de separação, pode ser utilizadas na indústria de derivados de celulose e de polpa e papel.

Embora a invenção tenha sido amplamente descrita, é óbvio para aqueles versados na técnica que várias alterações e modificações podem ser feitas sem que as referidas alterações não estejam cobertas pelo escopo da invenção.

Os exemplos abaixo têm meramente a função de ilustrar as concretizações da presente invenção, e não tem o intuito de restringir ou delimitar os direitos do titular, os quais devem somente ser limitados ao escopo das reivindicações apresentadas.

Exemplos:

Exemplo 1: Processo de pré-tratamento

Foi utilizada uma unidade motora (Labo Plastomill, model 30C150, Toyo Seiki, Tóquio, Japão), equipada com uma extrusora de rosca dupla (2D15W, Toyo Seiki, Tóquio, Japão), apresentando uma razão de comprimento do cilindro para o diâmetro da rosca (L/D) de 17:1. Para o pré-

tratamento, 6,0 g de bagaço de cana-de-açúcar (tamanho de partícula 425 μm a 1000 μm) de foram misturados a quantidades determinadas do líquido iônico [Emim][Ac], a fim de preparar quatro razões diferentes de bagaço:[Emim][Ac] (m/m), equivalentes a 1:8, 1:5, 1:3 e 1:1. As misturas foram agitadas por 15 min e alimentadas manualmente na extrusora, que foi pré-aquecida a temperaturas que variaram de 80 a 180 °C e a rotação foi programada para uma velocidade de extrusão de 15 rpm. Após toda a amostra inicial ter sido extrusada, cerca de 30% da massa da mistura de bagaço-líquido iônico foi recuperada para ensaios de determinação da composição da biomassa e hidrólises enzimáticas, sendo o produto remanescente extrusado novamente. Essa operação foi repetida por até 3 ciclos. Após as misturas de bagaço-líquido iônico terem sido recuperadas, 50 mL de água destilada foram adicionados. A biomassa foi lavada diversas vezes, dispersa com a ajuda de um agitador de alta velocidade (Ultra Turrax T 25 Basic, Ika), filtrada e mantida úmida para os experimentos de hidrólise enzimática e avaliação da morfologia. O conteúdo de umidade foi determinado antes dos ensaios de hidrólise enzimática. Os ensaios de pré-tratamento foram realizados pelo menos em duplicata.

Exemplo 2: Hidrólise enzimática

Os ensaios de hidrólise enzimática foram conduzidos a 45 °C, 230 rpm, por até 72 h, utilizando uma concentração de biomassa pré-tratada de 2,5% e um coquetel enzimático contendo 15 FPU da enzima comercial Acremonium Cellulase (Meiji Seika Co, Japão) e 0,2% (v/v) da enzima Optimash TM BG (Genencor[®] International, EUA), como um suplemento da atividade de β -xilosidase, porém sem nenhuma atividade de FPase. O coquetel enzimático utilizado nos experimentos corresponderam a uma dosagem enzimática, por grama de

biomassa, de 15 FPU de FPase, 79,7 BGU de β -glicosidase, 262,4 UI de CMCase, 576,3 UI de xilanase, 1,4 UI de β -xilosidase e 22,5 UI de α -L-arabinofuranosidase. Para os experimentos de hidrólise enzimática da biomassa pré-tratada com uma razão de biomassa:líquido iônico de 1:20, 2,0 mL do coquetel enzimático preparado em tampão acetato de sódio, 50 mM, pH 5,0, foram adicionados a 0,05 g de biomassa pré-tratada ou *in natura*. Os rendimentos de hidrólise para esses ensaios foram calculados de acordo com a Equação [1].

$$[1] \frac{\text{mg açúcar} \times \% \text{ de biomassa recuperada após pré-tratamento} \times f_{\text{açúcar}}}{\text{mg de biomassa hidrolisada} \times \% \text{ de celulose ou xilana na biomassa in natura}} \times 100;$$

Onde mg açúcar corresponde à quantidade de glicose ou xilose absoluta obtida após a hidrólise enzimática e $f_{\text{açúcar}}$ corresponde ao fator de conversão da celulose (0,9) ou xilana (0,88) em glicose ou xilose.

Já os ensaios de hidrólise enzimática dos materiais que foram pré-tratados com o auxílio da extrusora consistiram de 10 mL do coquetel enzimático preparado em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 e 0,250 g de biomassa. Os rendimentos de hidrólise para esses ensaios foram calculados de acordo com a Equação [2].

$$[2] \frac{[\text{açúcar}] \times f_{\text{açúcar}}}{[\text{biomassa hidrolisada}] \times \% \text{ de celulose ou xilana na biomassa pré-tratada}} \times 100$$

Onde [açúcar] corresponde à concentração de glicose ou xilose absoluta obtida após a hidrólise enzimática e $f_{\text{açúcar}}$ corresponde ao fator de conversão da celulose (0,9) ou xilana (0,88) em glicose ou xilose.

Em todos os ensaios de hidrólise enzimática foram adicionados os antibióticos tetraciclina e aureobasidina A em concentrações de 50 $\mu\text{g/mL}$ e 5 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente,

para evitar contaminação microbiana. Os ensaios de hidrólise enzimática foram realizados em triplicatas.

Exemplo 3: Quantificação dos açúcares

Os açúcares presentes nos hidrolisados foram analisados utilizando um sistema de HPLC equipado com um detector de índice de refração (RI-2031 Plus, Jasco Co., Japão), utilizando uma coluna Aminex HPX-87P (7,8 mm I.D. x 30 cm, Bio-Rad, EUA) equipada com uma pré-coluna Carbo-P (Bio-Rad, EUA) e um sistema de remoção de cinzas (deashing system, Bio-Rad, EUA). A fase móvel utilizada foi água deionizada em um fluxo de 0,7 mL/min e a temperatura do forno da coluna foi de 80 °C.

Exemplo 4:- Efeito da carga de biomassa e do número de ciclos de extrusão na eficiência do pré-tratamento

O efeito das razões de bagaço:[Emim][Ac] e do tempo de tratamento, considerando o número de ciclos de extrusão, na eficiência do pré-tratamento foi avaliado através de experimentos que utilizaram razões correspondentes a 1:8, 1:5, 1:3 e 1:1, executando um máximo de três ciclos de extrusão, a 140 °C. Para as condições que utilizaram as razões de 1:1 e 1:3, três ciclos de extrusão foram realizados, enquanto para os pré-tratamentos utilizando as razões de 1:5 e 1:8, apenas dois ciclos de extrusão foram efetuados. Todas as condições de pré-tratamento resultaram em rendimentos em glicose e xilose após 24 h de hidrólise de no mínimo 3,5 e 6,9 vezes maiores, respectivamente, que o bagaço *in natura*.

A tabela 1 apresenta o efeito da carga de biomassa de uma modalidade exemplar da invenção, que é composta pelo bagaço de cana-de-açúcar tratado com líquido iônico, e o número de ciclos de extrusão na composição química do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado.

AMOSTRA	Composição de Biomassa (p/v)		
	Lignina	Glucana	Xilana
Bagaço não tratado	22,7	41,9	25,0
1:8 - 1 ciclo	18,6	46,9	26,5
1:8 - 2 ciclos	19,3	46,6	25,1
1:5 - 1 ciclo	19,9	44,6	25,6
1:8 - 2 ciclos	19,0	45,8	25,0
1:3 - 1 ciclo	20,9	44,8	26,5
1:8 - 2 ciclos	19,8	46,4	26,2
1:8 - 3 ciclos	20,4	46,7	26,8
1:8 - 1 ciclo	21,5	45,6	26,1
1:1 - 2 ciclos	20,9	46,3	24,3
1:1 - 3 ciclos	21,6	47,4	21,8

Tabela 1: Efeito do pré-tratamento com diferentes concentrações de líquido iônico e número de ciclos na composição da biomassa.

A figura 1 mostra o efeito da razão de bagaço: [Emim] [Ac] utilizada e do número de ciclos de extrusão realizados durante o pré-tratamento nos rendimentos em glicose e xilose obtidos após 24 h de hidrólise enzimática das amostras pré-tratadas. NT representa o bagaço não-tratado (*in natura*). Todos os experimentos de pré-tratamento foram realizados a 140 °C.

O número de ciclos de extrusão, portanto o tempo de pré-tratamento, teve um efeito significativo nos rendimentos em glicose principalmente para as condições que utilizaram razões de bagaço: [Emim] [Ac] de 1:1 e 1:3. O aumento do número de ciclos de um para três para a razão de 1:1 resultou em um aumento nos rendimentos em glicose de 59,4% para 76,4%, enquanto para a razão de bagaço: [Emim] [Ac] de 1:3, a realização do segundo ciclo de extrusão promoveu um aumento nos rendimentos em glicose de 10% em relação ao primeiro ciclo (de 81,6% para 91%) e a

execução de um terceiro ciclo não teve efeito significativo.

Considerando as condições que utilizaram as razões de 1:3 (a partir do segundo ciclo de extrusão), 1:5 e 1:8, os 5 rendimentos em glicose obtidos após apenas 24 h de sacarificação foram similares, estando numa faixa de 86,7% a 92,9%. Os resultados indicaram que a execução do segundo ciclo de extrusão foi significativo para o aumento dos rendimentos em xilose, tendo sido relevante para as 10 condições que utilizaram razões de bagaço:[Emim][Ac] de 1:1, 1:3 e 1:5. Experimentos controles, onde o bagaço foi extrusado sem a adição de [Emim][Ac], também foram realizados. A Figura 2 mostra o perfil e a produtividade de hidrólise do bagaço pré-tratado em diferentes 15 condições.

A produtividade após 9 h de hidrólise enzimática do bagaço que foi extrusado com a adição de [Emim][Ac] por dois ciclos com as razões de bagaço:[Emim][Ac] de 1:8, 1:5 e 1:3 foi de 7 a 7,5 vezes maior que do bagaço *in natura*, 20 enquanto o experimentos de hidrólise do bagaço tratado com a razão de 1:1 e do bagaço extrusado sem a adição de líquido iônico resultaram em um aumento de 4,8 e 2,4 vezes na produtividade, respectivamente.

Apesar de rendimentos em glicose (73,5%) 25 relativamente altos terem sido obtidos após 24 h de hidrólise do bagaço pré-tratado com um razão de bagaço:[Emim][Ac] de 1:1, ficou claro que a quantidade de líquido iônico utilizada nesta condição está limitando o efeito do pré-tratamento, já que as taxas iniciais de hidrólise são inferiores às condições onde a razão de 30 [Emim][Ac] para o bagaço foi maior.

Na figura 2A o eixo X é o tempo em horas e o eixo Y é o rendimento percentual (%) em glicose e representa o

perfil de hidrólise enzimática do bagaço (x) in natura; (♦) extrusado sem adição de [Emim][Ac]; extrusado utilizando as razões de bagaço:[Emim][Ac] de: (■) 1:1; (+) 1:3; (●) 1:5; (▲) 1:8; no gráfico 2B, o eixo Y é a produtividade da hidrólise enzimática após 9h de sacarificação, e o eixo X é a condição do pré-tratamento em que: In = in natura, ext. = extrusado, razão glicose (■)/ xilose (□). Todos os experimentos de pré-tratamento foram realizados a 140 °C e os resultados são relativos às amostras tratadas por dois ciclos de extrusão.

Exemplo 5: Comparação da extrusão com o processo de dissolução do bagaço

A Figura 3 apresenta uma comparação resumida dos dados obtidos após a hidrólise enzimática das amostras pré-tratadas com as razões de bagaço:[Emim][Ac] de 1:20, por 30 min e 120 min (processo convencional), e bagaço:[Emim][Ac] de 1:3, por até 3 ciclos de extrusão (processo desenvolvido neste estudo). Durante o processo de extrusão, o tempo de retenção médio da biomassa dentro do cilindro foi de aproximadamente 4 min.

O uso da extrusora para facilitar o pré-tratamento de altas cargas de bagaço com o líquido iônico [Emim][Ac] possibilitou não só uma redução significativa na quantidade de líquido iônico requerida por grama de bagaço, como também reduziu o tempo necessário de interação entre o [Emim][Ac] e o bagaço, a fim de obter um pré-tratamento efetivo, de 120 min para 8 min (obtendo rendimentos em glicose de cerca de 90%, após 24 h de sacarificação).

Foi utilizada uma extrusora de escala laboratorial com a razão L/D de 17 foi utilizada (menor 30 cm de comprimento). A necessidade de ciclos de extrusão pode ser eliminada com o uso de extrusoras maiores e o estudo de

configurações de roscas mais eficientes para este propósito, possibilitando um maior tempo de interação entre a biomassa e o líquido iônico.

Na figura 3, o eixo Y é o percentual de rendimento em glicose, o eixo X é o tempo em horas; ■ 1:3, 1 ciclo de 4 minutos; ▲ 1:3, 2 ciclos = 8 minutos; X 1:3, 3 ciclos = 12 minutos; ● 1:20, 30 minutos; e, ◆ 1:20, 120 minutos.

Exemplo 6: Área superficial específica (SSA) do bagaço pré-tratado

10 A tabela 2 apresenta os dados relativos à influência da carga de bagaço utilizada no pré-tratamento sobre a SSA do bagaço pré-tratado. Todas as amostras correspondem a 2 ciclos de extrusão a 140°C, com exceção da amostra tratada com a razão de bagaço:líquido iônico de 1:1, que foi
15 submetida a 3 ciclos de extrusão.

Carga de bagaço (p%)	SSA (m ² /g)
Não tratado	0,8
1:8	131,1
1:5	136,4
1:3	132,1
1:1	98,4

Tabela 2: relação carga de bagaço SSA.

A figura 4A apresenta as características morfológicas da biomassa pré-tratada, que também evidencia o efeito da quantidade de líquido iônico utilizada na desestruturação da parede celular, o que está de acordo com os dados de
20 hidrólise e SSA discutida acima.

Nesta figura, a micrografias é de uma biomassa composta pelo bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado a 140 °C com uma razão de bagaço:[Emim][Ac] de (a) 1:1 por três
25 ciclos de extrusão; (b) 1:3 por dois ciclos de extrusão; (c) 1:5 por dois ciclos de extrusão.

A tabela 3 apresenta a relação entre a temperatura do cilindro de extrusão e a SSA do bagaço pré-tratado. Todas

as amostras correspondem a um ciclo de extrusão usando uma razão de bagaço:líquido iônico de 1:3.

Temperatura (°C)	SSA (m ² /g)
80	21,3
120	31,1
140	58,4
160	145,1
180	206,0

Tabela 3: relação entre a temperatura de extrusão e a SSA do bagaço.

5 Já a figura 4B apresenta micrografias da biomassa pré-tratada nas diversas temperaturas. As imagens são consistentes com os resultados de hidrólise enzimática, mostrando uma maior desestruturação da morfologia da superfície com o aumento da temperatura (Figuras 4B de a-
 10 d). As amostras pré-tratadas a 160 °C exibiram uma morfologia com estruturas que apresentaram espessura menor que 100 nm e menos ordenadas que as tratadas a 80 °C e 120 °C. A Figura 4B e, correspondente à biomassa tratada a 180 °C, onde se observa estruturas mais agregadas, o que pode
 15 estar relacionado ao preparo da amostra ou a efeitos negativos da temperatura elevada. Este teste foi realizado nas seguintes condições: razão bagaço:[Emim][Ac] de 1:3 por um ciclo de extrusão a (a) 80 °C, (b) 120 °C, (c) 140 °C, (d) 160 °C, (e) 180 °C.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo de produção de moléculas orgânicas a partir da biomassa caracterizado por compreender as etapas de:

- (a) pré-tratamento contínuo de uma biomassa com líquidos iônicos em um misturador;
- (b) hidrólise da biomassa pré-tratada;
- (c) separação do xarope de açúcares do sólido residual não hidrolisado rico em lignina; e,
- (d) fermentação do xarope de açúcares.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela etapa (a) ocorrer de forma contínua em um misturador; no qual uma razão entre a biomassa/liquido iônico é de entre 1:0,5 a 1:10 massa/massa (m/m) de uma, a mistura ocorre a uma temperatura de entre 40 a 200°C, durante 5 a 150 minutos em um misturador efetivo, capaz de promover uma eficiente mistura, a fim de possibilitar a atuação efetiva do líquido iônico na biomassa.

3. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, caraterizado pelo misturador ser uma extrusora onde a razão entre o comprimento do cilindro para o diâmetro da rosca (L/D) é de entre 10:1 a 100:1.

4. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caraterizado por serem realizados de 1 a 6 ciclos de extrusão, com velocidade de rotação da extrusora de até 400 rpm.

5. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo líquido iônico ser um sal contendo o cátion 1,3 dialquil-imidazólico, tetra-alkil amônio, fosfônio, alkil-piridinico.

6. Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo líquido iônico ser pertencente ao grupo consistido de: acetato de 1-butil-3-metilimidazólio

([Bmim] [Cl]), acetato de 1-etil-3-metilimidazólio
([Emim] [Ac]), acetato de 1-butil-3-metilimidazólio
([Bmim] [Ac]), cloreto de 1-alil-3-metilimidazólio
([Amim] [Cl]), fosfato de 1,3-dimetilimidazólio dimetil
5 ([Mmim] [DMP]), metanosulfato de 1-benzil-3-
metilimidazólio, metanosulfato de 1-(2-feniletil)-3-
metilimidazólio, metanosulfato de 1-(3-fenilpropil)-3-
metilimidazólio, metanosulfato de 1-(2,2-feniletila)-3-
metilimidazólio, tetrafluoroborato de 1-benzil-3-
10 metilimidazólio, hexafluorofosfato de 1-(3-fenilpropil)-3-
metilimidazólio, tetrafluoroborato de 1-benzil-3-
metilimidazólio, bis-(trifluormetanosulfonil) imidato de
1-benzil-3-metilimidazólio, bis-(trifluormetanosulfonil)
imidato de 1-(2-feniltil)-3-metilimidazólio, bis-
15 (trifluormetanosulfonil) imidato de 1-(3-fenilpropil)-3-
metilimidazólio, bis-(trifluormetanosulfonil) imidato de
1-(2,2-feniltil)-3-metilimidazólio, hexafluorofosfato de
1-(2-feniletil)-3-metilimidazólio, bis-
(trifluormetanosulfonil) imidato de 1-(2-cicloexiletil)-3-
20 metilimidazólio, bis-(trifluormetanosulfonil) imidato de
1-(3-cicloexilpropil)-3-metilimidazólio, bis-
(trifluormetanosulfonil) imidato de 1-(2,2-cicloexiletil)-
3-metilimidazólio, cloreto de 1-carboximetil-3-
metilimidazólio, ou uma mistura destes.

25 7. Processo de acordo com qualquer uma das
reivindicações anteriores, caracterizado pela biomassa ser
pertencente ao grupo consistido o bagaço de cana-de-
açúcar, palha de cana-de-açúcar, gramíneas, palha de
trigo, palha de arroz, palha de milho e resíduos de
30 celulose; e o líquido iônico é o 3-metilimidazólio
([Emim] [Ac]), fosfato de 1,3-dimetilimidazólio dimetil
([Mmim] [DMP]), ou uma mistura destes.

8. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por na etapa (b) a biomassa desestruturada ser submetida à hidrólise enzimática para a liberação dos açúcares contidos na biomassa, durante um período entre 3
5 a 72 horas.

9. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela etapa (d) ocorrer a fermentação dos açúcares obtidos ao final da etapa anterior, para a produção de etanol.

10 10. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela etapa (d) não ser realizada obtendo-se um resíduo sólido rico em lignina e uma solução de um ou mais açúcares livres.

15 11. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelas etapas (b), (c) e (d) não serem realizadas para a produção de um resíduo rico em celulose, hemicelulose e lignina.

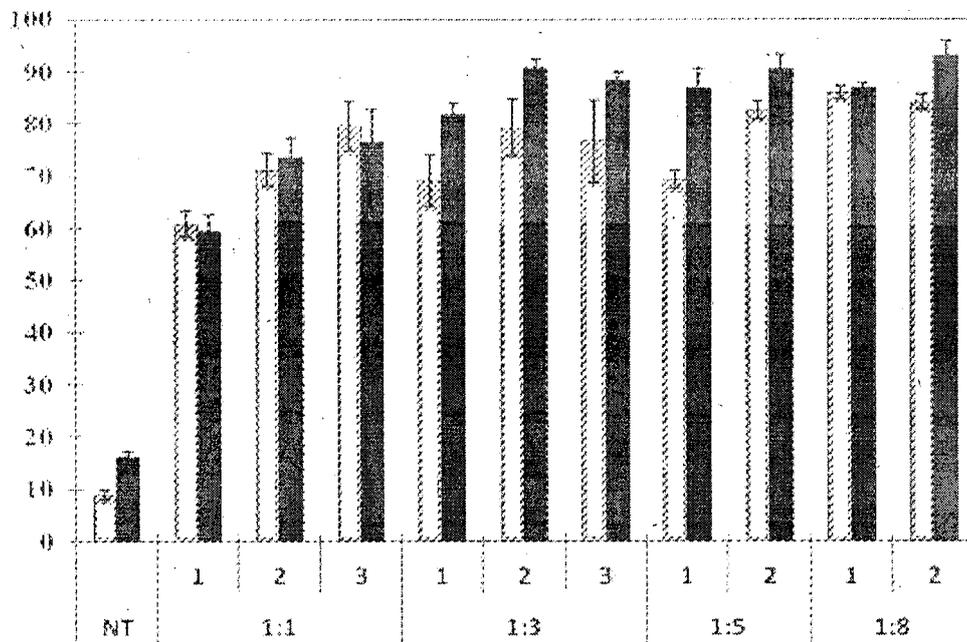


Figura 1

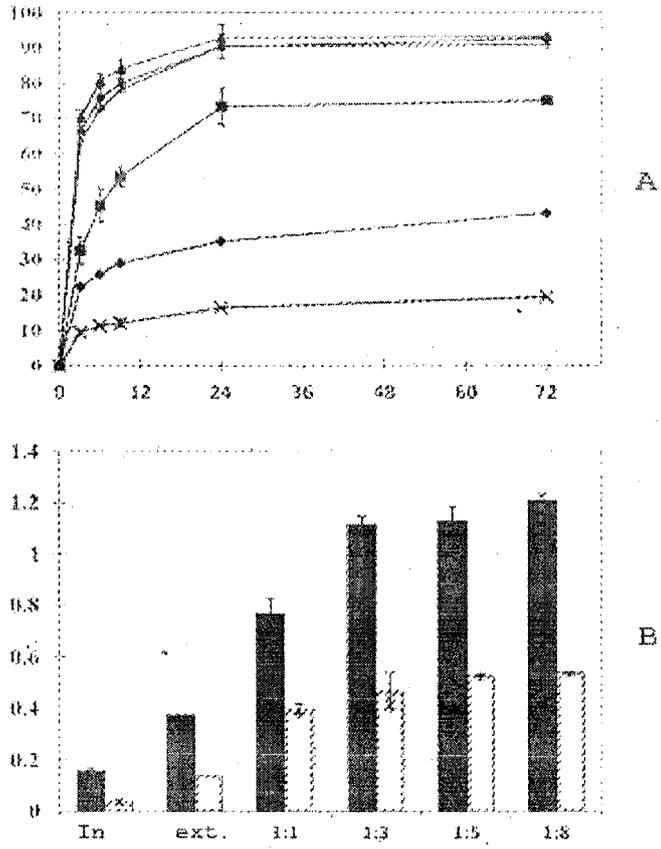
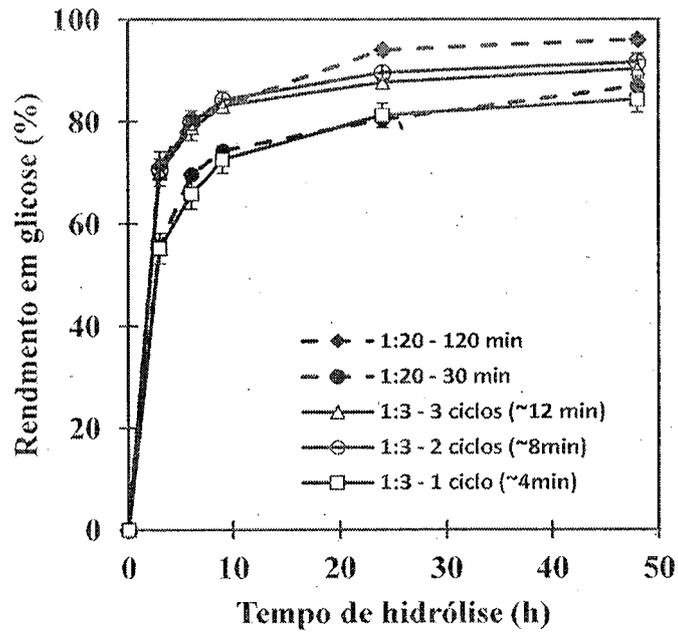


Figura 2

Figura 3



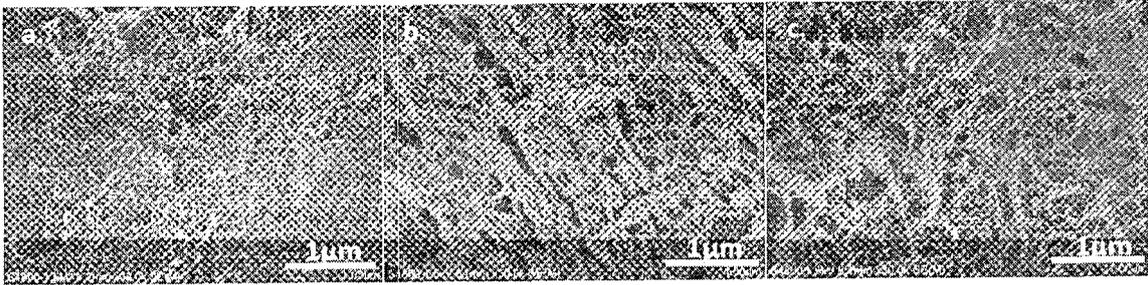


Figura 4A

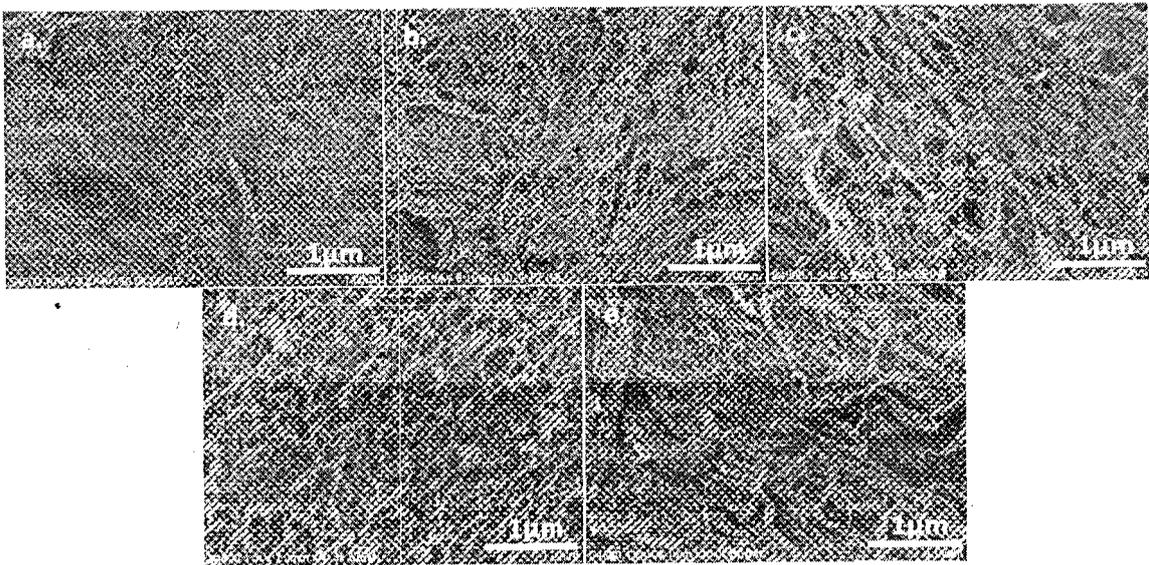


Figura 4B

RESUMO

PROCESSO DE PRODUÇÃO DE MOLÉCULAS ORGÂNICAS A PARTIR DA
BIOMASSA

5 Processo de produção de moléculas orgânicas a partir da
biomassa que compreende as etapas de:

(a) pré-tratamento contínuo de uma biomassa com
líquidos iônicos em um misturador;

(b) hidrólise da biomassa pré-tratada; e,

10 (c) separação do xarope de açúcares do sólido
residual não hidrolisado rico em lignina; e,

(d) fermentação do xarope de açúcares,

onde a etapa (a) ocorre de forma contínua em um misturador,
no qual uma razão de elevada de biomassa:líquido iônico é
misturada possibilitando a atuação efetiva do líquido iônico
15 na biomassa.