

# RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta **Tese** será disponibilizado somente a partir de 21/06/2024.

**Universidade Estadual Paulista  
“Júlio de Mesquita Filho”**

**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**

**Avaliação de pré-tratamento hidrotérmico de  
palha e bagaço de cana-de-açúcar para  
produção de xilo-oligossacarídeos e  
hidrolisado enzimático de glicose**

**Lídia Manfrin Dias**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição para obtenção do título de Doutor em Alimentos e Nutrição.

Área de Concentração: Ciência dos Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Masarin

Coorientador: Prof. Dr. Samuel  
Conceição de Oliveira

Araraquara  
2022

# **Avaliação de pré-tratamento hidrotérmico de palha e bagaço de cana-de-açúcar visando à produção de xilo-oligossacarídeos e etanol de segunda geração**

**Lídia Manfrin Dias**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição para obtenção do título de Doutor em Alimentos e Nutrição.

Área de Concentração: Ciência dos Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Masarin

Coorientador: Prof. Dr. Samuel Conceição de Oliveira

Araraquara  
2022

---

**D541a**

Dias, Lídia Manfrin.

Avaliação de pré-tratamento hidrotérmico de palha e bagaço de cana-de-açúcar para produção de xilo-oligossacarídeos e hidrolisado enzimático de glicose / Lídia Manfrin Dias. – Araraquara: [S.n.], 2022. 183 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição. Área de Concentração: Ciência dos Alimentos.

Orientador: Fernando Masarin.

Coorientador: Samuel Conceição de Oliveira.

1. Subprodutos de cana-de-açúcar. 2. Pré-tratamento hidrotérmico. 3. Delineamento Composto Central Rotacional. 4. Metodologia de Superfície de Resposta. 5. Xilooligossacarídeos. 6. Hidrólise enzimática. I. Masarin, Fernando, orient. II. Oliveira, Samuel Conceição de, coorient. III. Título.

---

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP Campus de Araraquara

**33004153070P3**

**Esta ficha não pode ser modificada**

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA TESE: Avaliação de pré-tratamento hidrotérmico da palha e bagaço de cana-de-açúcar visando à produção de xilo-oligossacarídeos e etanol de segunda geração

**AUTORA: LÍDIA MANFRIN DIAS**

**ORIENTADOR: FERNANDO MASARIN**

**COORIENTADOR: SAMUEL CONCEIÇÃO DE OLIVEIRA**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em ALIMENTOS E NUTRIÇÃO, área: Ciência dos Alimentos pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. FERNANDO MASARIN (Participação Virtual)

Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP Araraquara

Prof. Dr. MICHEL BRIENZO (Participação Virtual)

Laboratório de Caracterização de Biomassa / Instituto de Pesquisa em Bioenergia IPBEN

Prof. Dr. JOÃO RENATO CARVALHO MUNIZ (Participação Virtual)

Departamento de Física e Ciência Interdisciplinar / Instituto de Física de São Carlos - USP

Profa. Dra. VALÉRIA DE CARVALHO SANTOS EBINUMA (Participação Virtual)

Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Araraquara, 21 de junho de 2022

*Dedico este trabalho ao meu esposo Thales e  
às minhas filhas Laura e Laís.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Ao Prof. Dr. Fernando Masarin, pela orientação, oportunidade, dedicação e conhecimento compartilhado durante toda a condução do presente trabalho.

Ao Prof. Dr. Samuel Conceição de Oliveira, pela coorientação na análise estatística e matemática, dedicação e sabedoria.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF), Campus Araraquara-UNESP, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Departamento de Alimentos e Nutrição e Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia, por toda a infraestrutura e apoio.

À Seção Técnica da Pós-graduação.

Aos professores, funcionários e pós-graduandos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF), Araraquara.

À Deus, que permitiu que todas as conquistas em minha vida se concretizassem.

Ao meu esposo, por todo o amor, cuidado, paciência e incentivo.

Aos meus pais, pelo amor incondicional, incentivo, apoio e exemplo de sabedoria.

À minha irmã, minhas cunhadas e meus sogros pela compreensão, apoio e carinho.

Aos meus amigos e colegas de laboratório: Isabela, Giovana, Eddyn, Fernando Paz, Fernando Merz, Flávia, Abra, Leonardo, Igor, pela amizade e pelo auxílio durante a pesquisa.

A todos os envolvidos na construção, no desenvolvimento e finalização desse trabalho, muito obrigada.

## RESUMO

A busca por fontes de energias renováveis e ambientalmente corretas vem aumentando nos últimos anos culminando no conceito de biorrefinaria, o qual refere-se ao aproveitamento integral da biomassa lignocelulósica através da produção de múltiplos bioprodutos de interesse comercial. Uma forma de aproveitamento dos materiais lignocelulósicos durante o processo de produção de etanol de segunda geração (etanol celulósico) é a produção de xilo-oligossacarídeos (XOS) durante o pré-tratamento da biomassa. **Objetivo:** O objetivo deste trabalho foi otimizar a produção de XOS através de pré-tratamento hidrotérmico (PTH) em bagaço (BCA) e palha (PCA) de cana-de-açúcar e hidrolisar enzimaticamente a fração celulósica obtida após o PTH para produção de etanol (etanol 2G). **Metodologia:** O BCA e a PCA foram pré-tratadas hidrotermicamente sob diferentes condições de temperatura, tempo e consistência (carga mássica). Essas variáveis foram incorporadas ao um delineamento composto central rotacional em resposta a produção de XOS. As frações sólidas (resíduo rico em celulose e lignina) e líquidas (hidrolisado hemicelulósico) obtidas após os diferentes PTHs foram caracterizadas quimicamente. As frações sólidas obtidas na condição otimizada (BCA e PCA) foram hidrolisadas com preparado enzimático Cellic CTec 2 com diferentes cargas mássicas e enzimáticas. **Resultados:** As condições de PTH para máxima produção de XOS foram de 161,9 °C por 75,3 min e 10% de consistência para o BCA e 177,2 °C por 64,8 min e 10% de consistência para a PCA. Os PTHs do BCA e da PCA nessas condições resultaram na produção de 53,3 e 96,3 mg de XOS por grama de subproduto (base seca), respectivamente. As frações sólidas do BCA e da PCA obtidas após os PTHs nas condições previamente otimizadas apresentaram conversões máximas de celulose em glicose de 70 e 94%, respectivamente. O aumento da consistência não resultou em diminuição expressiva das conversões de celulose em glicose. As concentrações de glicose nos hidrolisados oriundos do BCA e da PCA com 20% de consistência foram de 64 e 112 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Desta forma, a condição de 20% de consistência foi selecionada para verificar o efeito do aumento da carga enzimática, a qual não resultou em aumento significativo das conversões de celulose em glicose, ambos BCA e PCA, com exceção a carga enzimática de 30 FPU por grama de substrato (base seca). **Conclusão:** Os resultados indicam que os PTHs nas condições otimizadas (BCA e PCA) foram excelentes para produção de XOS. Além disso, as frações sólidas ricas em celulose obtidas após os PTHs em condição previamente otimizada apresentaram potencial na hidrólise enzimática com preparado enzimático Cellic CTec 2, portanto, podendo ser uma estratégia para a produção de etanol de segunda geração (etanol celulósico).

**PALAVRAS-CHAVE:** Subprodutos de cana-de-açúcar; Pré-tratamento hidrotérmico; Delineamento Composto Central Rotacional; Metodologia de Superfície de Resposta; Xilooligossacarídeos; Hidrólise enzimática.

## ABSTRACT

The search for renewable and environmentally correct energy sources has increased in recent years, culminating in the concept of biorefinery, which refers to the full use of lignocellulosic biomass through the production of multiple bioproducts of commercial interest. One way of using lignocellulosic materials during the production process of second-generation ethanol (cellulosic ethanol) is the production of xylo-oligosaccharides (XOS) during the pre-treatment of biomass. **Objective:** The objective of this work was to optimize the production of XOS through hydrothermal pretreatment (PTH) in sugarcane bagasse (BCA) and straw (PCA) and to enzymatically hydrolyze the cellulosic fraction obtained after PTH to produce ethanol (2G ethanol). **Methodology:** BCA and PCA were hydrothermally pretreated under different conditions of temperature, time and consistency (mass load). These variables were incorporated into a central rotational composite design in response to XOS production. The solid (cellulose and lignin-rich residue) and liquid (hemicellulose hydrolyzate) fractions obtained after the different PTHs were chemically characterized. The solid fractions obtained in the optimized condition (BCA and PCA) were hydrolyzed with Cellic CTec 2 enzymatic preparation with different mass and enzymatic loads. **Results:** The PTH conditions for maximum XOS production were 161.9 °C for 75.3 min and 10% consistency for BCA and 177.2 °C for 64.8 min and 10% consistency for PCA. BCA and PCA PTHs under these conditions resulted in the production of 53.3 and 96.3 mg of XOS per gram of by-product (dry basis), respectively. The solid fractions of BCA and PCA obtained after PTHs under the previously optimized conditions showed maximum cellulose conversions to glucose of 70 and 94%, respectively. The increase in consistency did not result in a significant decrease in cellulose to glucose conversions. Glucose concentrations in hydrolysates from BCA and PCA with 20% consistency were 64 and 112 g.L<sup>-1</sup>, respectively. Thus, the condition of 20% consistency was selected to verify the effect of increasing the enzymatic load, which did not result in a significant increase in cellulose to glucose conversions, both BCA and PCA, with the exception of an enzyme load of 30 FPU per gram of substrate (dry weight). **Conclusion:** The results indicate that PTHs under optimized conditions (BCA and PCA) were excellent for XOS production. In addition, the cellulose-rich solid fractions obtained after PTHs in a previously optimized condition showed potential in enzymatic hydrolysis with the Cellic CTec 2 enzyme preparation, therefore, it could be a strategy for the production of second-generation ethanol (cellulosic ethanol).

**KEYWORDS:** Sugarcane by-products; Hydrothermal pre-treatment; Central Composite Rotational Design; Response Surface Methodology; Xylooligosaccharides; Enzymatic hydrolysis.

## LISTA DE ABREVIATURAS

BCA	Bagaço de cana-de-açúcar
PCA	Palha de cana-de-açúcar
PTH	Pré-tratamento Hidrotérmico
XOS	Xilooligossacarídeos
GP	Grau de polimerização
X <sub>2</sub>	Xilobiose
X <sub>3</sub>	Xilotriose
X <sub>4</sub>	Xilotetraose
X <sub>5</sub>	Xilopentaose
X <sub>6</sub>	Xilohexaose
X <sub>7</sub>	Xiloheptaose
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

<b>Table 2.1.</b> Experimental conditions outlined by the proposed CCRD for HP of the sugarcane by-products	53
<b>Table 2.2.</b> Effects and coefficients of the model calculated for the CCRD having as response variable the xylan conversion to XOS after HP of SB	75
<b>Table 2.3.</b> Effects and coefficients of the model calculated for the CCRD having as response variable the xylan conversion to XOS after HP of SS	75
<b>Table 2.4.</b> ANOVA for the model fit to the experimental data of xylan conversion from SB to XOS after HP	78
<b>Table 2.5.</b> ANOVA for the model fit to the experimental data of xylan conversion from SS to XOS after HP	78
<b>Table 2.6.</b> Optimal values of the independent variables for the HP owing to maximization of XOS production from SB and SS	80
<b>Table 2.7.</b> Calculated and experimental values of xylan conversion to XOS for the HP of SB and SS under optimized conditions (data presented in percentage in dry weight)	82
<b>Table 2.8.</b> Yield and chemical composition of SB and SS untreated, thermotreated under the optimized conditions, and the HP mass balance in recovered solids. Component contents presented as percentage in dry weight	83
<b>Table 2.9.</b> Mass recovery, hemicellulose mass in the pulp, products not found, degradation products, and XOS in the hemicellulosic fraction of SB and SS under optimized HP conditions	89

### CAPÍTULO 2

<b>Table 3.1.</b> Kinetic parameters of enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse (SB) and straw (SS) thermotreated under different consistency (w/v ratios)	132
--	-----

**Table 3.2.** Kinetic parameters of enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse (SB) and straw (SS) thermotreated under different enzyme load 136

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO

- Figura 1.1.** Esquema da orientação das microfibrilas nas camadas das paredes primária e secundária de uma célula vegetal. Na parede primária (P) as microfibrilas de celulose são depositadas em um arranjo entrelaçado. Na parede secundária (S1, S2 e S3) a deposição ocorre de forma ordenada, variando a orientação nas diferentes camadas (adaptado de HARRIS e STONE, 2008) 26
- Figura 1.2.** Estrutura molecular da celulose. Adaptado de Trache et al. (47) 28
- Figura 1.3.** Organização estrutural da celulose. Adaptado de Trache et al. (47) 29
- Figura 1.4.** Representação esquemática da estrutura geral da molécula de glucuronoarabinoxilana PAZ-CEDENO et al. (53) 30
- Figura 1.5.** Esquema mostrando resíduos de ferulato acoplados à lignina, ambos resíduos de alcoóis coniferílico e sinapílico são ligados com ferulatos (53,55,56) 31
- Figura 1.6.** Modelo proposto para representar os componentes macromoleculares na estrutura dos subprodutos de cana-de-açúcar. Adaptado de Sjöström e Westermark (59) 33
- Figura 1.7.** Disposição entre celulose, hemiceluloses e lignina na parede celular antes e após o pré-tratamento. Adaptado de Kumar et al. (1) 34
- Figura 1.8.** Principais produtos formados na hidrólise por pré-tratamento hidrotérmico (PTH) de arabinosilana dos subprodutos de cana-de-açúcar. Adaptado de Xiao et al. (62) 37
- Figura 1.9.** Estrutura dos xilooligossacarídeos. Adaptado de Carvalho et al. (69) 38
- Figura 1.10.** Modo de ação das enzimas do complexo celulolítico de *Trichoderma reesei*. Martins et al. (72) 41

## CAPÍTULO 1

- Figure 2.1.** Components and yield of the insoluble fraction of SB and SS obtained by HP as dependente on the severity factor (log R0). Components were presented as percentage in dry weight. The bars for each experiment are in increasing order of severity factor and follow the order 9, 1, 5, 11, 7, 3, 13, 14, mean of the central point (15, 16, and 17), 12, 6, 2, 8, 4, and 10 according to Table 2.1, which correspond to the letters “a” to “p” that are on the bars, respectively. The first bar corresponds to the byproduct untreated 59
- Figure 2.2.** XOS contents in the SB and SS in HH obtained by HP as dependent on the severity factor (log R0). The levels of components were presented in milligrams of product per gram of pretreated material (dry weight). The bars for each experiment are in increasing order of severity factor and follow the order 9, 1, 5, 11, 7, 3, 13, 14, mean of the central point (15, 16, and 17), 12, 6, 2, 8, 4, and 10 according to Table 2.1, which correspond to the letters “a” to “p” that are on the bars, respectively 64
- Figure 2.3.** Unwanted products contents in the SB and SS in HH obtained by HPas dependente on the severity factor (log R0). The levels of componentes were presented in milligrams of product per gram of pretreated material (dry weight). The bars for each experiment are in increasing order of severity factor and follow the order 9, 1, 5, 11, 7, 3, 13, 14, mean of the central point (15, 16, and 17), 12, 6, 2, 8, 4, and 10 according to Table 2.1, which correspond to the letters “a” to “p” that are on the bars, respectively 65
- Figure 2.4.** XOS and sugar degraded products in the HH obtained after HP under SB and SS as dependent on the severity factor (log R0). Xylan conversion to products presented as percentage in dry weight. The bars for each experiment are in increasing order of severity factor and follow the order 9, 1, 5, 11, 7, 3, 13, 14, mean of the central point (15, 16, and 17), 12, 6, 2, 8, 4, and 10 according to Table 2.1, which correspond to the letters “a” to”p” that are on the bars, respectively 71
- Figure 2.5.** Mass recovery of the hemicellulosic fraction converted into products after the HP under SB and SS as dependente on the severity factor (log R0). Components are presented as percentage in dry weight. The bars for each experiment are in increasing order of severity factor and follow the order 9, 1, 5, 11, 7, 3, 13, 14, mean of the central point (15, 16, and 17), 12, 6, 2, 8, 4, and 10 according to Table 2.1, which correspond to the letters “a” to “p” that are on the bars, respectively 73

<b>Figure 2.6.</b> Response surfaces and contour curves for the xylan conversion to XOS from SB (ab) and SS (cd) as dependent on the temperature and time (mass load = 10%, w/v)	79
<b>Figure 2.7.</b> Untreated SB and SS (ad); Recovered solids after HP in SB and SS under optimized conditions (be); HH from SB and SS after HP under optimized conditions (cf), respectively	81
<b>Figure 2.8.</b> XOS contents in the SB and SS in HH after HP under optimized conditions. Xylan conversion to products presented as percentage in dry weight	85
<b>Figure 2.9.</b> Unwanted products contents in the SB and SS in HH after HP under optimized conditions (data in milligrams of products per gram of raw material, dry weight). Total = xylose + glucose + arabinose + acetic acid + formic acid + aromatics + furfural	86
 <b>CAPÍTULO 2</b>	
<b>Figure 3.1.</b> Enzymatic hydrolysis of thermotreated SB (a,b) and SS (c,d) under different consistencies or mass loads presented in percentage (w/v): (a,c) Cellulose conversion to glucose. (b,d) Glucose concentration. The error bars that are not visible are less than the own symbols	130
<b>Figure 3.2.</b> Visual aspect of the enzymatic hydrolysis tests of thermotreated sugarcane bagasse and straw at different mass loads	131
<b>Figure 3.3.</b> Glucose concentration in 72 hours of enzymatic hydrolysis of thermotreated SB (a) and SS (b) under different consistencies or mass load	133
<b>Figure 3.4.</b> Enzymatic hydrolysis of thermotreated SB (a,b) and SS (c,d) under different enzymatic load presented in percentage (w/v): (a,c) Cellulose conversion to glucose. (b,d) Glucose concentration. The error bars that are not visible are less than the own symbols	135
<b>Figure 3.5.</b> Visual aspect of enzymatic hydrolysis tests of thermotreated sugarcane bagasse and straw at different enzymatic loads	136
<b>Figure 3.6.</b> Enzymatic hydrolysis of thermotreated SB (a,b) and SS (c,d) under consistency of 20% (w/v) carried out in the Erlenmeyer and in the bioreactor: (a,c) Cellulose conversion to glucose. (b,d) Glucose concentration	140

**Figure 3.7.** Visual aspect of the enzymatic hydrolysis assays of thermotreated sugarcane bagasse at a consistency of 20% (w/v) and enzymatic load of 15 FPU: (a) Hydrolysis carried out in a bioreactor. (b) Enzymatic hydrolysis performed in an Erlenmeyer flask

141

## SUMÁRIO

Resumo	vi
Abstract	vii
Lista de Abreviaturas	viii
Lista de Tabelas	ix
Lista de Figuras	xi
1. INTRODUÇÃO	16
2. CAPÍTULO 1. Experimental design, modeling, and optimization of production of xylooligosaccharides by hydrothermal pretreatment of sugarcane bagasse and straw.	45
Abstract	47
Introduction	48
Material and methods	50
Results and discussion	58
Conclusion	89
References	91
3. CAPÍTULO 2. Efficiency of the enzymatic hydrolysis on sugarcane bagasse and straw thermotrated: Assessment in batch systems subject to high mass loads.	117
Abstract	119
Introduction	120
Material and methods	123
Results and discussion	128
Conclusion	141
References	142
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	162
5. REFERÊNCIAS	163

## 1. INTRODUÇÃO

O aumento substancial da população e urbanização têm aumentado cada vez mais a demanda e o consumo de energia em todo o mundo. O uso de combustíveis fósseis tem atendido essa necessidade, porém, nas últimas décadas ficou evidente que este é um recurso limitado e as reservas não suprirão a demanda em um futuro próximo. Além disso, questões relacionadas ao impacto ambiental causado pela queima dos combustíveis fósseis têm gerado preocupações e esforços na busca por novas fontes de origem renovável e ecologicamente corretas (1). Um dos principais objetivos do uso dos biocombustíveis é a substituição de combustíveis fósseis, permitindo a diminuição da dependência por recursos não renováveis e a redução das emissões de gases de efeito estufa (2).

Para se alcançar transformações sociais sustentáveis é necessário adotar tecnologias ambientalmente corretas e formas de reaproveitamento de todos os subprodutos da cadeia produtiva (biorrefinaria). Este conceito integra tecnologias unitárias de conversão de biomassa para produzir biocombustíveis e produtos bioquímicos de valor agregado a partir de subprodutos agroindustriais (3).

O Brasil, um dos maiores produtores agrícolas do mundo, gera quantidades significativas de subprodutos de biomassa em atividades decorrentes da colheita e transformação de produtos. De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (4), na safra 2021/22, foram produzidos 585,1 milhões de toneladas de cana-de-açúcar. A produção brasileira de etanol, para esta safra, será de cerca de 26,7 bilhões de litros.

Dois principais subprodutos são produzidos no processamento da cana-de-açúcar: palha de cana-de-açúcar (PCA, durante a colheita) e bagaço de cana-de-açúcar (BCA, na etapa de extração de sacarose, no processo industrial). No Brasil, cerca de 40% da oferta interna de energia é baseada em matéria-prima do tipo renovável (bioenergia); sendo 15,7% de energia oriunda de biomassa vegetal, que está diretamente associada com o cultivo de cana-de-açúcar e seus derivados (5). A utilização do BCA tem a vantagem de já se encontrar disponível na indústria, pois é gerado após a etapa de extração do caldo de cana-de-açúcar (6). Quanto ao destino da PCA, o governo do estado de São Paulo criou uma lei estadual que proíbe de forma gradativa a queima da palha de cana-de-açúcar no campo resultando no aumento da mecanização da colheita da cana-de-açúcar por parte das indústrias e consequente acúmulo da PCA no campo (7). Atualmente em média 80% do BCA são queimados nas plantas termoelétricas das Usinas do setor sucroenergético para cogeração de energia o que é fundamental para tornar o processo viável economicamente. Todavia, a PCA não é utilizada para cogeração de energia, pois essa biomassa contém altos teores de matéria inorgânica (principalmente sílica) (8). Desta forma, parte da PCA deve ser removida do campo para sua transformação em bioprodutos e/ou bioenergia, todavia, parte da PCA deve permanecer no campo para a manutenção dos níveis adequados de microrganismos no solo, que são fundamentais para sua fertilidade, além do crescimento das plantas, de forma a sustentar o cultivo de cana-de-açúcar (9).

Uma alternativa de melhor aproveitamento dos subprodutos de cana-de-açúcar (BCA e PCA) é a produção de xilo-oligossacarídeos (XOS, fração hemicelulósica), etanol 2G (etanol de segunda geração ou celulósico, fração celulósica) e lignina. Para este fim, o pré-tratamento hidrotérmico (PTH) é uma alternativa para fracionar o material em duas frações: fração líquida (remoção da fração hemicelulósica por hidrólise química resultando na formação de XOS) e fração sólida (rica em celulose e lignina) (10–13). A fração sólida pode ainda ser fracionada em mais duas frações: fração líquida (extração de lignina por uso de solventes orgânicos convencionais e líquidos iônicos) e fração sólida (rica em celulose) (14–17). Por fim a fração celulósica pode ser hidrolisada enzimaticamente por celulasas obtendo-se hidrolisado de glicose que pode ser fermentado a etanol (etanol celulósico). Desta forma, os subprodutos de cana-de-açúcar podem ser utilizados para a produção de bioprodutos de alto valor agregado (XOS e lignina de alta pureza), além de combustível de fonte renovável (etanol celulósico e lignina de baixa pureza).

Os XOS, os quais são constituídos principalmente por unidades de xilose, são responsáveis por diversos efeitos benéficos como a prevenção de cáries, a diminuição de níveis séricos de colesterol e o estímulo do crescimento de bifidobactérias no trato-gastrointestinal. Por serem moderadamente doces, estáveis em uma ampla faixa de pH e temperatura, também conferem características organolépticas aos alimentos. A utilização de XOS já é uma realidade em alguns países. No Japão, por exemplo, essas substâncias já são comumente empregadas em vários produtos alimentícios para humanos e animais (18–24).

Os subprodutos de cana-de-açúcar podem ser mais bem aproveitados como, por exemplo, na produção de XOS (bioproduto de alto valor agregado), pois a hemicelulose e celulose têm baixo aproveitamento de energia em sua oxidação (queima). Desta forma, a proposta é produzir XOS a partir da fração hemicelulósica e etanol celulósico a partir da fração celulósica culminando em um “resíduo rico em lignina” que pode ser de baixa ou alta pureza. A lignina de baixa pureza pode ser aplicado na queima para cogeração de energia (produção de vapor d’água/energia elétrica), pois a lignina tem um alto aproveitamento de energia em sua queima e a lignina de alta pureza tem aplicação nos setores de química e de construção civil a partir da formulação de aglutinantes naturais, adesivos, compósitos, fibra de carbono, dentre outros bioprodutos.

### ***Cana-de-açúcar***

A cana-de-açúcar é uma gramínea da classe das monocotiledôneas, pertencente à família *Poaceae* e gênero *Saccharum*, seu crescimento em altura ocorre até a limitação no abastecimento de água, baixas temperaturas, ou floração. Devido à falta de resistência a baixas temperaturas, é uma planta amplamente cultivada em regiões tropicais e subtropicais e foi a primeira cultura introduzida no Brasil, há quatro séculos, no litoral do nordeste (25,26).

A cana-de-açúcar é uma importante fonte de renda e desenvolvimento, sendo a principal matéria-prima para a produção de açúcar e uma das mais importantes fontes para a produção de etanol e bebidas alcoólicas (26). No Brasil, a área total de mudas, plantio e colheita de cana-de-açúcar na safra de

2021/22 atingiu 8.317,3 mil hectares e a produtividade deve atingir 70.357 Kg/ha (4).

Atualmente o Brasil ocupa o primeiro lugar como maior produtor mundial de açúcar e o segundo lugar no *ranking* dos países maiores produtores de etanol, ficando atrás dos Estados Unidos, que produzem etanol a partir do milho, porém é o maior exportador mundial de etanol (27).

Provavelmente o desenvolvimento mais significativo na produção de co-produtos da cana-de-açúcar no Brasil tenha ocorrido com o estabelecimento do Programa Nacional do Álcool (Programa ProÁlcool), criado em novembro de 1975 em resposta aos altos preços do petróleo e ao aumento dos custos de importação dessa matéria-prima. O ProÁlcool aumentou a demanda interna por etanol, resultando na rápida expansão da indústria da cana-de-açúcar, aumentando a escala das fábricas, reduzindo custos de produção de açúcar e etanol e aumentando a capacidade técnica. O ProÁlcool representou e ainda representa impacto no mercado mundial de açúcar e etanol, tornando o Brasil uma importante potência global na produção de cana-de-açúcar além de apresentar essa cultura como uma importante matéria-prima para produção de produtos energéticos e não apenas alimentícios (28).

Espera-se que o Brasil seja o país que contribua com a maior parte do aumento no consumo e produção de etanol segundo as projeções da FAO (27) até 2030. Esse aumento é devido, principalmente, ao programa RenovaBio, assinado em janeiro de 2018 e que entrou em vigor a partir de 2020. RenovaBio é a Política Nacional de Biocombustíveis, instituída pela Lei nº13.576 de 2017 que possui como objetivos a contribuição com a relação de

eficiência energética e redução na emissão de gases causadores do efeito estufa na produção, comercialização e uso de biocombustíveis; contribuir para o cumprimento aos compromissos do Brasil no contexto do Acordo de Paris; promover a expansão na produção e uso dos biocombustíveis na matriz energética nacional, destacando a regularidade do abastecimento de biocombustíveis além da promoção da participação competitiva dos diversos biocombustíveis no mercado nacional.

O principal mecanismo do RenovaBio é a instituição de metas anuais para a redução de emissões na matriz de combustíveis no país. Essas metas foram definidas pela Resolução CNPE nº5, de 5 de julho de 2018 para um período de 10 anos e serão desdobradas em metas individuais aplicadas a todos os distribuidores de biocombustíveis, sendo proporcionais à sua respectiva participação no mercado na comercialização de combustíveis fósseis em relação ao ano anterior.

Dessa forma, fica claro o crescente aumento para os próximos anos na demanda e conseqüente produção de biocombustíveis no Brasil, sendo o etanol de cana-de-açúcar o mais importante deles.

### ***A biorrefinaria de cana-de-açúcar***

Biorrefinarias são instalações de processamento integrado que produzem múltiplos coprodutos a partir da biomassa, por exemplo a cana-de-açúcar, a partir de um processamento sustentável da biomassa a fim de produzir uma variedade de bioprodutos com alto valor agregado, além de biocombustíveis (29).

A cana-de-açúcar é considerada uma das melhores fontes de matéria-prima para uma biorrefinaria, por apresentar vantagens como ser uma planta C<sub>4</sub>, ou seja, possui alta eficiência na capacidade de processamento de energia solar em biomassa, sem muita exigência de água e nutrientes; é uma cultura amplamente distribuída no mundo, com uma prática agrícola, controle de pragas e doenças e desenvolvimento de variedades bem compreendida e estabelecida além do fato de tanto o BCA quanto a PCA já estarem presentes em uma instalação de processamento, como as fábricas do setor sucroenergético (28).

Em uma biorrefinaria de cana-de-açúcar, a indústria não apenas processa a cana produzindo açúcar e etanol como também produz energia renovável e produtos biotecnológicos a partir da biomassa lignocelulósica. A biomassa lignocelulósica refere-se à matéria vegetal composta principalmente por celulose, hemicelulose e lignina (28).

O processamento da cana-de-açúcar na indústria sucroenergética gera subprodutos em quantidades significativas, que devem aumentar nos próximos anos em decorrência do aumento da produção agroindustrial para a obtenção de etanol, principalmente. O uso desses subprodutos como matéria-prima para produção de novos produtos torna-se imprescindível tanto do ponto de vista ambiental como uma forma de evitar o desperdício de material rentável (30).

Durante a colheita da cana-de-açúcar, as folhas e ponteiros são deixadas no campo, enquanto os colmos (caules) são transportados para a fábrica, onde são triturados e moídos para a extração do caldo rico em açúcar

para a produção de açúcar. Dessa forma, os principais subprodutos gerados no processamento de cana-de-açúcar são o BCA e a PCA. O BCA é a fração resultante da limpeza, preparação e extração do caldo de cana e é heterogêneo no tamanho e formato de partículas. A PCA compreende as folhas verdes e secas, ponteiros e suas frações, frações de raízes e partículas de terra aderidas a elas (8,31).

O BCA atualmente é queimado/oxidado nas fábricas para cogeração de energia, no entanto, há mais energia no BCA em relação a necessidade que é requerido para o processo da fábrica resultando em acúmulo de BCA. Cada tonelada de cana-de-açúcar colhida e processada pelas usinas gera cerca de 270-280 kg de BCA e 140 kg de PCA (ambas com aproximadamente 50% de umidade) (28,32).

No entanto, estudos sobre o comportamento da celulose, hemicelulose e lignina, principais componentes do BCA e PCA, na pirólise e combustão para a produção de energia através do calor gerado, indicam que biomassas com maior teor de carbono e alto teor de lignina, resultam em uma maior conversão em gramas de material para *kilojoule* (kJ) de energia térmica produzida, além de apresentarem maior rendimento em carvão, que pode estar relacionada à maior conversão termoquímica. Desta forma, biomassas com maior teor de lignina apresentam melhor eficiência na combustão, podendo produzir mais calor por quilograma de material (33,34).

O BCA apresenta teores de celulose, hemicelulose e lignina que variam de 34,1 a 45,5%; 16,8 a 32,2% e 17,1 a 32,4% (base seca), respectivamente. A PCA apresenta teores de celulose, hemicelulose e lignina que variam de

33,6 a 40,8%; 26,2 a 30,8% e 19,6 a 31,8% (base seca), respectivamente (8,24,35). O alto teor de polissacarídeos (celulose e hemicelulose) presentes nessas biomassas em comparação ao baixo conteúdo em lignina, torna-as promissoras para a utilização na produção de produtos de maior valor agregado em uma biorrefinaria.

A celulose e hemicelulose são polissacarídeos constituintes da parede celular da cana-de-açúcar que podem ser hidrolisados e convertidos em produtos, como por exemplo: glicose, que pode ser fermentada a bioetanol; ácido glucônico; ácido aspártico, ácido glicólico, ácido levulínico; XOS e álcoois como glicerol, sorbitol, xilitol. A lignina pode dar origem a resinas, fenol, benzeno, tolueno, vanilina, ácido vanílico, e muitos outros produtos promissores que tornam os subprodutos de cana-de-açúcar uma matéria-prima ideal para transformar o processamento da cana em uma biorrefinaria ambientalmente correta e lucrativa (28,36).

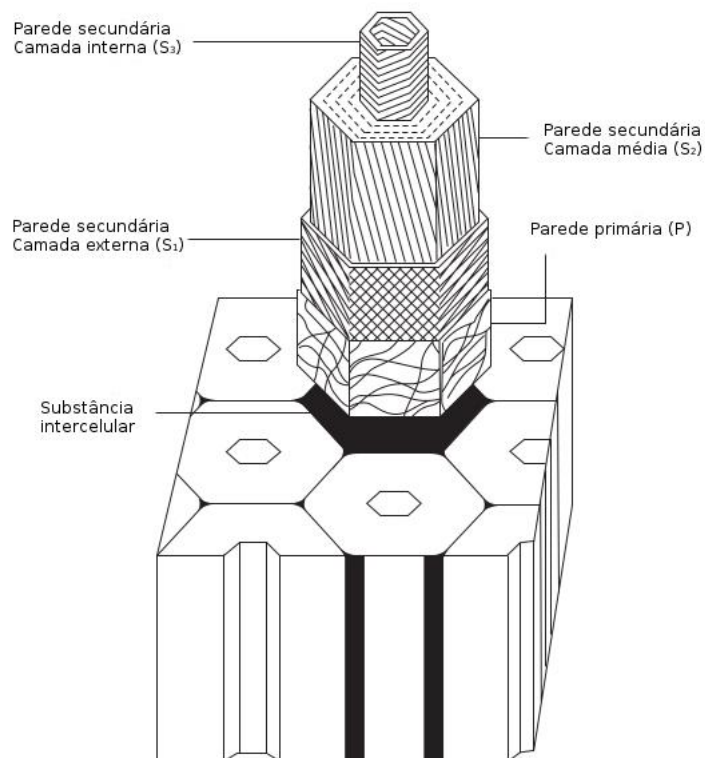
### ***Estrutura da parede celular da cana-de-açúcar***

A estrutura dos tecidos de uma planta são classificadas como dérmicos, tecidos fundamentais e tecidos vasculares. O tecido vascular é envolvido pelo sistema fundamental e o sistema dérmico reveste a planta. Este é constituído pela epiderme, o revestimento mais externo dos órgãos vegetais em estrutura primária e pode ser substituído pela periderme em órgãos com crescimento secundário. O sistema fundamental é constituído por células de colênquima e esclerênquima, que são células vivas com paredes celulares não lignificadas (floema) e o tecido vascular (xilema) constituído por vasos condutores, fibras,

traqueídeos, células epiteliais (células mortas e lignificadas após sua maturação) e células de parênquima (células vivas e não lignificadas) (37).

As células eucarióticas vegetais são semelhantes às células animais, porém possuem características típicas como parede celular, vacúolos e plastídios. A parede celular envolve externamente a membrana plasmática da célula. A primeira camada de parede celular formada constitui a parede primária, esta é formada por deposição de microfibrilas de celulose em um arranjo entrelaçado. Paredes primárias são formadas enquanto as células ainda estão em crescimento e desenvolvimento, assim, não são lignificadas e podem representar a única parede de certos tipos de células, como algumas células do parênquima (37,38).

Em outras células, entretanto, ocorrem deposições de camadas adicionais internamente à camada primária, por aposição, ou seja, ocorre deposição de microfibrilas de celulose em um arranjo ordenado. A primeira, segunda e terceira camadas da parede secundária são denominadas de S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> e S<sub>3</sub>, respectivamente (Figura 1.1).



**Figura 1.1.** Esquema da orientação das microfibrilas nas camadas das paredes primária e secundária de uma célula vegetal. Na parede primária (P) as microfibrilas de celulose são depositadas em um arranjo entrelaçado. Na parede secundária ( $S_1$ ,  $S_2$  e  $S_3$ ) a deposição ocorre de forma ordenada, variando a orientação nas diferentes camadas (adaptado de HARRIS e STONE, 2008).

Essas camadas são caracterizadas pela mudança de orientação da deposição. As paredes secundárias são depositadas internamente à parede primária após o completo desenvolvimento da célula e são caracteristicamente lignificadas após atingir a maturidade. A lamela média é a camada interfacial entre as células adjacentes e também é tipicamente lignificada (37,38).

As paredes celulares primária e secundária geralmente são compostas por longas microfibrilas de celulose e por polissacarídeos não celulósicos que

a interconectam, como (1→3,1→4)-β-D-glucanas, heteroxilanas, heteroglucanas, heteromananas e pectinas (39).

Levando-se em consideração a composição polissacarídica, três tipos de paredes celulares não celulósicas foram propostas por Carpita e Gibeaut (40). A do Tipo I é rica em xiloglucana, a do Tipo II é rica em arabinoxilana e a do Tipo III é rica em manana. As paredes celulares tipicamente encontradas em cana-de-açúcar são do Tipo II (41).

Os colmos e folhas da cana-de-açúcar *in natura* são compostos principalmente por celulose na forma de microfibrilas de glucanas; arabinoxilana, β-glucana, xiloglucana e traços de manana; pectinas, incluindo homogalacturonana, arabinogalactana e arabinana e lignina. Polissacarídeos, pectinas e lignina podem ser encontrados em diferentes proporções de acordo com a idade da planta, espécie e linhagem utilizada para a análise (42).

Além das macromoléculas citadas, as paredes celulares vegetais contêm ainda pequenas quantidades de substâncias químicas, não estruturais denominadas de extrativos. São caracterizados por serem materiais cerosos e aromáticos de baixa massa molar, incluindo flavonóides, estilbenos, taninos, sais inorgânicos, ceras, alcalóides, proteínas, fenólicos simples e complexos, açúcares simples, pectinas, mucilagens, terpenos, amido, glicosídeos, óleos essenciais (43,44). Esses compostos podem ser extraídos com água, solventes orgânicos ou uma mistura destes (8,45).

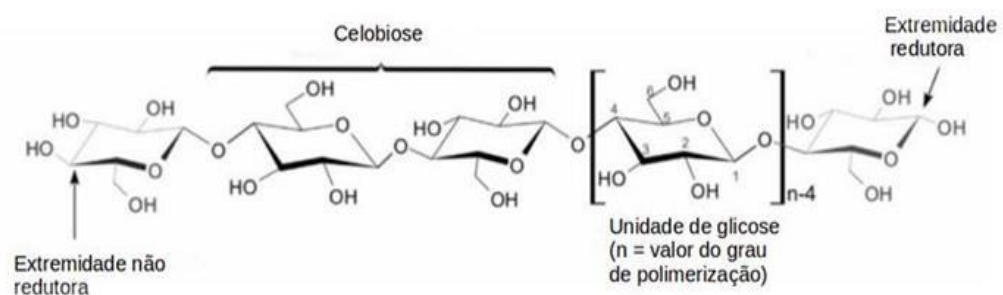
As cinzas são materiais inorgânicos que estão ligados à estrutura física da biomassa e podem ser removidos em parte lavando-se ou extraído o material (46). O BCA e a PCA de cana-de-açúcar apresentam teores variáveis

de extrativos, que podem estar de 1,6 a 9,2% (base seca). Os teores de cinzas encontrados para o BCA variam de 1,0 a 7,9% (base seca) e da PCA variam de 2,4 a 5,7% (base seca) (8).

### **Celulose**

A celulose é o biopolímero natural mais abundante na Terra e é considerado o composto orgânico produzido mais importante na biosfera. É sintetizada por um amplo número de organismos, que varia de plantas e animais, bactérias e fungos, sendo que mais de 99% desses organismos são plantas (12,47,48).

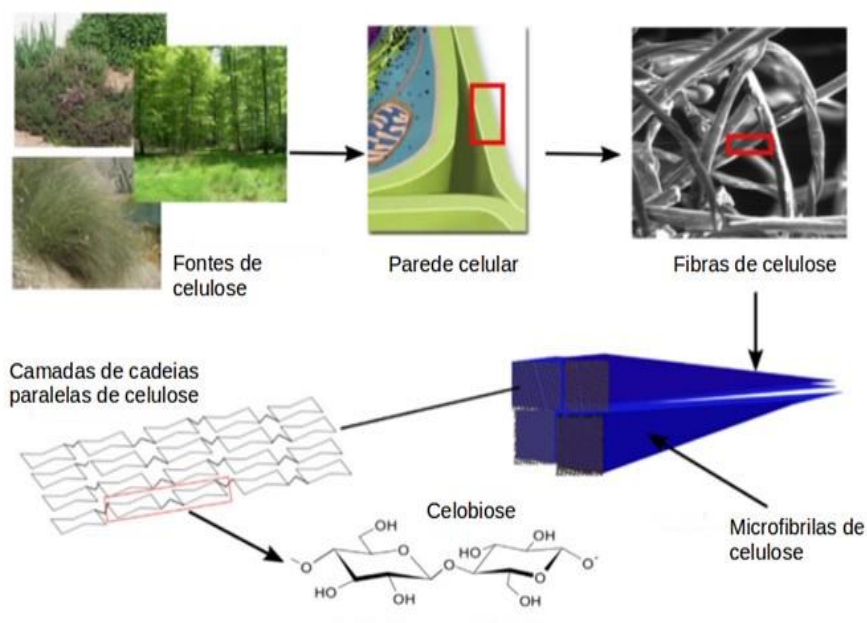
A celulose é um homopolímero linear com fórmula molecular  $(C_6H_{10}O_5)_n$  composto por unidades de D-anidroglicopiranosose, também conhecidas como unidades de glicose. Estas estão unidas por ligações do tipo  $\beta$ -(1-4)-glicosídicas, formando um dímero conhecido como celobiose, a unidade repetitiva da molécula de celulose (Figura 1.2).



**Figura 1.2.** Estrutura molecular da celulose. Adaptado de Trache et al. (47).

O tamanho das moléculas de celulose é expresso como grau de polimerização (GP), que indica o tamanho em termos de número de unidades de monômero por cadeia de celulose. O grau de polimerização pode variar de 100, em celulose microcristalina a 15.000 em fibras de algodão (12,47–49).

As ligações de hidrogênio (intramoleculares e intermoleculares) e as interações de *van der waals* presentes na cadeia de celulose impedem a rotação das moléculas de glicose, enrijecendo a cadeia resultando na formação de regiões ordenadas da molécula (regiões cristalinas) e regiões desordenadas (amorfas). As cadeias de celulose se agrupam formando microfibrilas, que juntas, formam as fibras de celulose (Figura 1.3). As microfibrilas de celulose são formadas por 36 cadeias de celulose (12,47,49).

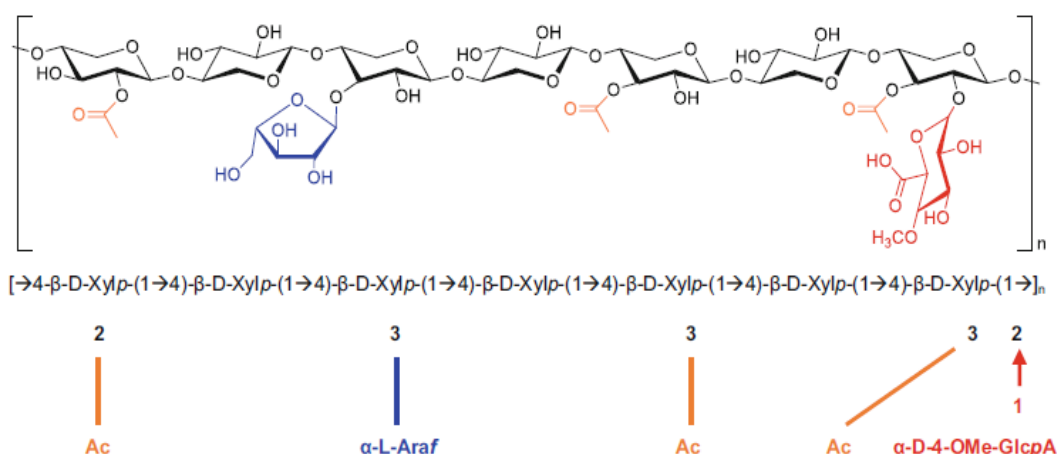


**Figura 1.3.** Organização estrutural da celulose. Adaptado de Trache et al. (47).

## Hemicelulose

As hemiceluloses são heteropolímeros de cadeias curtas contendo grupos laterais compostos de unidades de pentoses (xilose e arabinose), hexoses (glicose, manose, ramnose e galactose) e ácidos urônicos (galacturônico e metil-glucurônico). Esses heteropolímeros entremeiam as microfibrilas de celulose conferindo resistência e flexibilidade à parede celular da planta. A hemicelulose representa o terceiro polímero mais abundante na biosfera, ficando atrás da celulose e quitina (12,36,48,50).

As hemiceluloses dos subprodutos de cana-de-açúcar são compostas principalmente por arabinoxilana (3). As arabinoxilanas possuem um esqueleto que consiste em resíduos  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-xilopiranosil, sendo que alguns pontos há cadeias laterais, como por exemplo, grupos arabinosil ( $\alpha$ -L-arabinoxilana), grupos acetil e ácido-metil-glucurônico (4-O-metil) (Figura 1.4) (51–53).

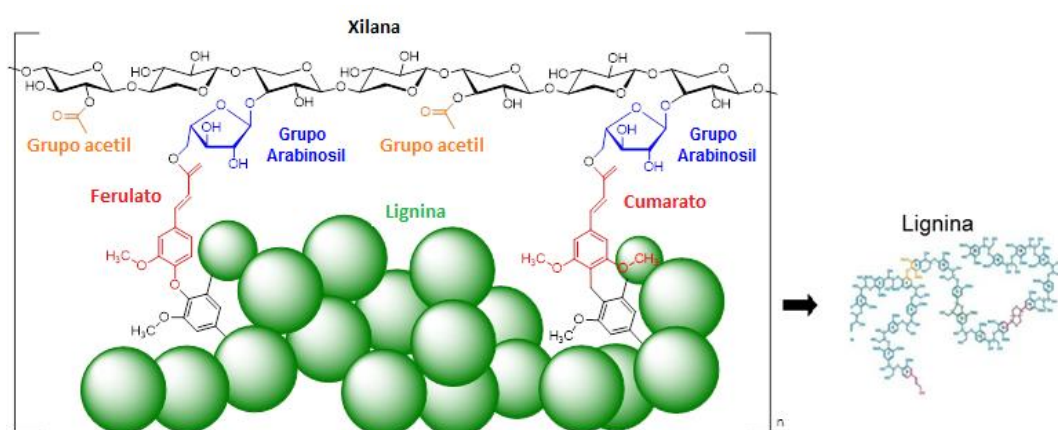


**Figura 1.4.** Representação esquemática da estrutura geral da molécula de glucuronoarabinoxilana (PAZ-CEDENO et al. (53)).

A arabinoxilana apresenta grande potencial para produção de bioprodutos de interesse comercial e alto valor agregado, por exemplo, os XOS, que possuem propriedades prebióticas proporcionando vários benefícios à saúde. Além de poder ser convertida em etanol, xilitol, ácido láctico, oligossacarídeos funcionais, dentre outros (36,54).

### **Lignina**

A lignina é uma macromolécula composta por três principais tipos de álcoois hidroxicinamil: álcool *p*-cumárico, álcool coniferílico e álcool sinapílico. Quando polymerizados, esses monolignóis são denominados como unidades monoméricas da lignina, como se segue: *p*-hidroxifenil (unidade H), guaiacil (unidade G) e siringil (unidade S). Essas unidades monoméricas encontram-se irregularmente conectadas quimicamente a uma variedade de ligações do tipo éter, onde a mais comum é a arilglicerol- $\beta$ -aril ( $\beta$ -O-4') (42).

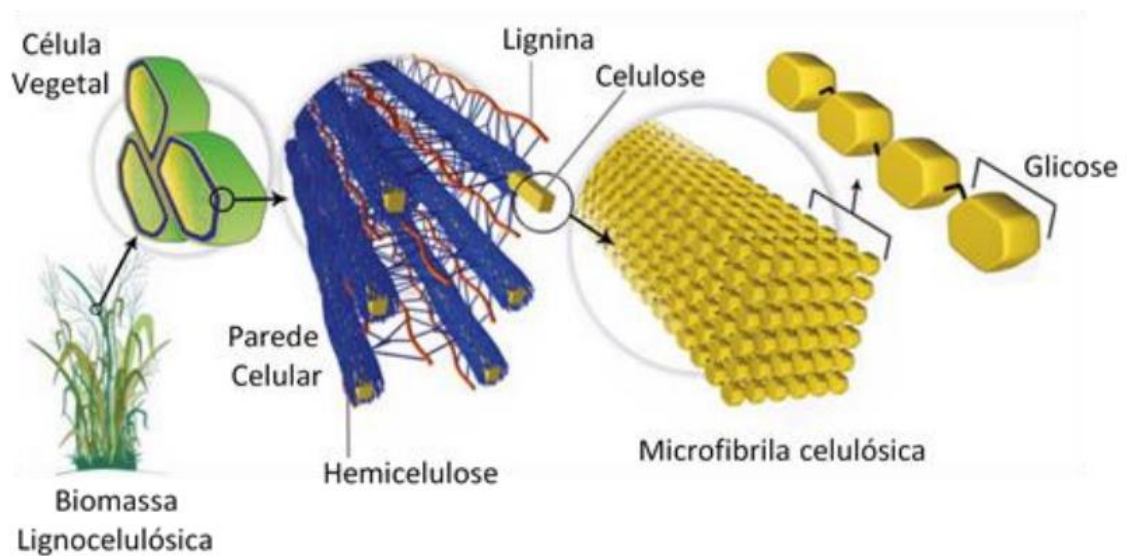


**Figura 1.5.** Esquema mostrando resíduos de ferulato acoplados à lignina, ambos resíduos de álcoois coniferílico e sinapílico são ligados com ferulatos (53,55,56).

A proporção entre os constituintes da lignina varia de acordo com o tipo de célula, tecidos vegetais e a espécie da planta. A lignina de madeiras de folhosas, é composta por unidades S e G em proporções semelhantes e pequenas quantidades de unidades H. Nas madeiras de coníferas, encontra-se principalmente ligninas compostas por unidades G e apenas pequenas quantidades de unidades H. As gramíneas, por sua vez, apresentam ligninas compostas pelas três unidades, com unidades H comparativamente menores (31,42).

A lignina dos subprodutos de cana-de-açúcar está localizada principalmente nos feixes vasculares (parede celular de células de vasos e fibras) e em menor quantidade localizada nas paredes das células de células de parênquima, que armazenam sacarose (57). A arabinoxilana é a principal hemicelulose ligada quimicamente à lignina, através de seus grupos laterais (grupo arabinosil) conectados nas unidades de xilose da cadeia principal de xilana (Figura 1.5) (57).

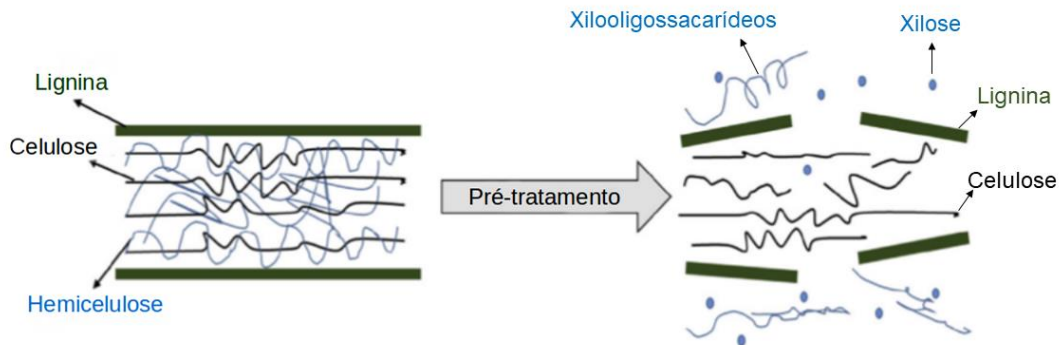
A Figura 1.6 apresenta a estrutura geral das fibras dos subprodutos de cana-de-açúcar que é formada por longas cadeias de celulose interligadas por ligações de hidrogênio com moléculas de hemicelulose entrelaçadas, o que resulta em uma estrutura altamente complexa que é encapsulada pela lignina. Assim, as microfibrilas de celulose estão organizadas de forma paralela e encaixadas em uma matriz de hemicelulose e lignina (12,48,58).



**Figura 1.6.** Modelo proposto para representar os componentes macromoleculares na estrutura dos subprodutos de cana-de-açúcar. Adaptado de Sjöström e Westermarck (59).

### ***Pré-tratamento hidrotérmico (PTH)***

O pré-tratamento, desestruturação ou fracionamento da biomassa lignocelulósica é uma importante técnica, pois objetiva a desconstrução da organização e associações entre lignina, hemicelulose e celulose da parede celular, permitindo o fracionamento do subproduto e a recuperação de seus componentes (Figura 1.7).



**Figura 1.7.** Disposição entre celulose, hemiceluloses e lignina na parede celular antes e após o pré-tratamento. Adaptado de Kumar et al. (1).

Os métodos de pré-tratamento tradicionais alteram a composição química e a ultraestrutura do material, diminuindo ou aumentando o índice de cristalinidade do material e aumentando a acessibilidade da parede celular a microrganismos ou produtos químicos. Os pré-tratamentos promovem a clivagem das ligações do tipo éter e éster das macromoléculas da parede celular, podendo remover as frações de hemicelulose e lignina, além de aumentar o volume dos poros e a área de superfície do material facilitando a acessibilidade de enzimas hidrolíticas (60,61).

Vários métodos de pré-tratamentos foram desenvolvidos e podem ser classificados da seguinte forma: biológicos; físicos (trituração, extrusão mecânica, dentre outros); químicos (ácidos, bases, ozônio, clorito, solventes orgânicos, líquidos iônicos, dentre outros) e físico-químicos, ou seja, pré-tratamento químico combinado com físico (explosão a vapor, micro-ondas, ultrassom, hidrotérmico, dentre outros). Normalmente, os pré-tratamentos químicos em pH alcalino levam a dissolução/degradação da lignina em

fragmentos solúveis, enquanto os pré-tratamentos em pH ácido resultam em uma fração líquida contendo fragmentos de açúcares monoméricos e oligoméricos, produtos de degradação de açúcares e de lignina (60,62,63).

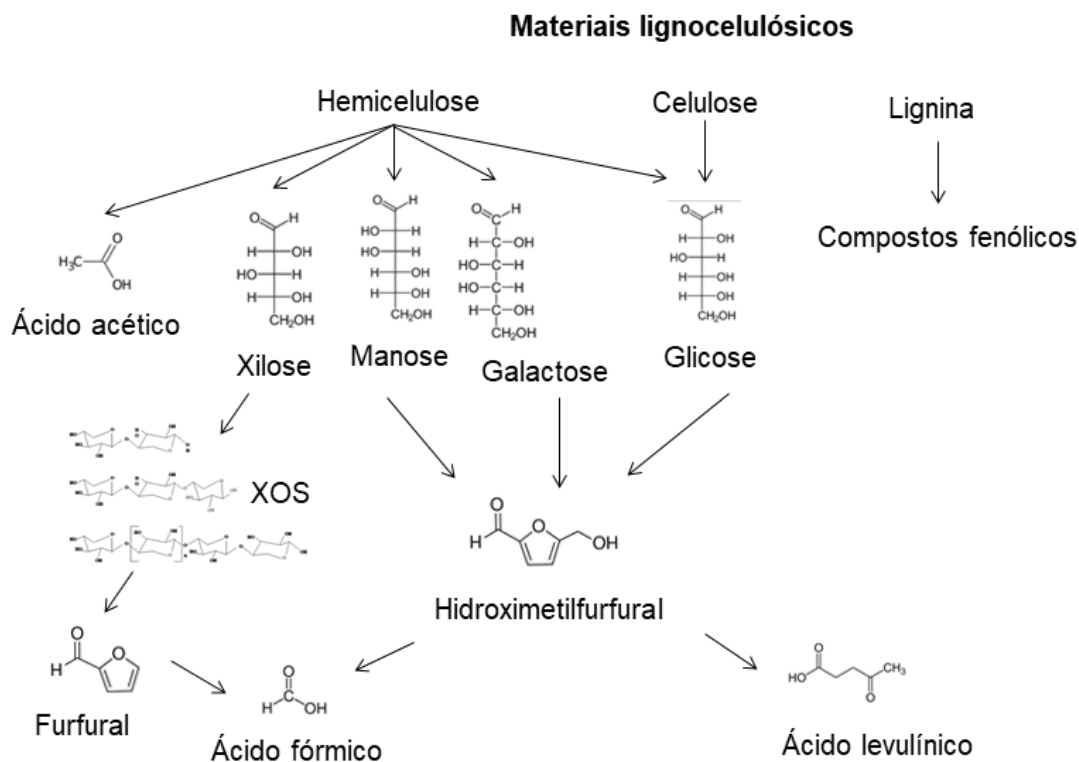
O PTH utiliza apenas água como meio reacional, que pode estar em sua forma de vapor ou líquida. O PTH consiste em uma tecnologia em que os materiais lignocelulósicos são tratados com água a quente comprimida a altas pressões (entre 5-20 Kgf.cm<sup>-2</sup>), e temperaturas (entre 150-220°C), e a uma razão líquido/sólido (proporção de volume de água para massa de biomassa lignocelulósica) pré-determinada. O PTH apresenta vantagens por ser um processo ecológico e ambientalmente correto, ou seja, não necessita de produtos químicos e utiliza apenas água como meio reacional, não apresentando problemas de corrosão em equipamentos (10,12,13,29,60,64).

O PTH promove o decaimento do pH da solução do meio reacional devido à liberação de ácido acético e ácido metil-glucurônico presentes nas cadeias laterais da arabinoxilana. Além disso, a altas temperaturas (150-230°C), as ligações de hidrogênio da água se enfraquecem, resultando na sua autoionização em íons hidrônio (H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>), que atuam como catalisadores e contribuem para a diminuição do pH do meio (11). A principal fração dos subprodutos de cana-de-açúcar a ser hidrolisada no PTH é a arabinoxilana por ser a mais instável dos três principais constituintes da parede celular (10-13,29,64).

Desta forma, no PTH a degradação da arabinoxilana ocorre em três etapas: inicialmente ocorrem reações na superfície do material que resultam na formação dos produtos primários (XOS), xilose, ácido metil-glucurônico e

ácido acético, que são produzidos pela clivagem das ligações do tipo éter e éster. Os XOS em condições mais severas de temperatura e tempo são hidrolisados a xilose. A xilose é instável em meio ácido e em altas temperaturas, sendo desidratada em furfural que por sua vez pode ser oxidado a ácido fórmico (Figura 1.8) (10,12,13,60,63,65).

Na celulose, ocorre hidrólise aleatória das ligações glicosídicas, diminuindo o grau de polimerização. Devido à natureza cristalina da celulose, as regiões amorfas, que são mais acessíveis, são removidas inicialmente. Assim como as hemiceluloses, a glicose liberada da celulose pode sofrer degradação formando produtos como hidroximetilfurfural (HMF) e ácido levulínico em meio ácido e altas temperaturas (Figura 1.8) (60,65). Segundo Sakaki et al. (66) essa degradação se inicia a temperaturas acima de 230°C e quase toda a celulose é decomposta a 295°C, todavia, o tempo de reação é outra variável importante na degradação dos açúcares a furfural e HMF.



**Figura 1.8.** Principais produtos formados na hidrólise por pré-tratamento hidrotérmico (PTH) de arabinoxilana dos subprodutos de cana-de-açúcar. Adaptado de Xiao et al. (62).

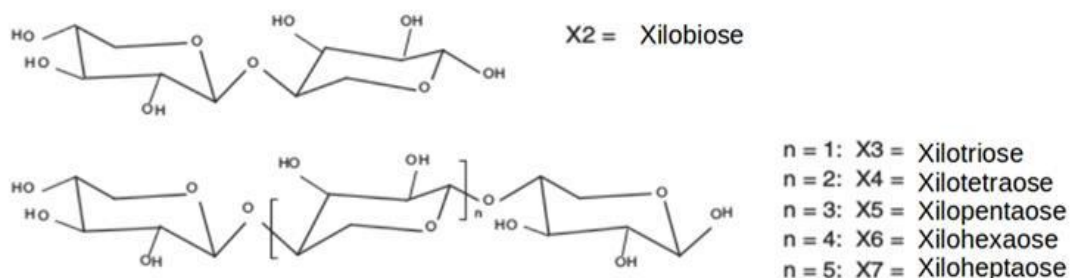
Comparado com a hemicelulose e a celulose, a remoção de lignina durante o PTH é limitada podendo ocorrer despolimerização e repolimerização simultaneamente. Sugere-se que a lignina sofra uma reação em duas etapas: na primeira ocorre a clivagem das ligações entre lignina e carboidratos, ocorrendo hidrólise principalmente das ligações do tipo éter  $\beta$ -O-4 da lignina liberando fragmentos baixa massa molar e solúveis em água; e em uma segunda etapa ocorre a recondensação e repolimerização dos fragmentos solúveis na presença dos ácidos orgânicos liberados no processamento hidrotérmico (60,65).

No hidrolisado hemicelulósico são encontrados monômeros aromáticos, sendo que o tipo e quantidade destes compostos variam de acordo com as condições de hidrólise e a composição da biomassa pré-tratada. Os principais componentes derivados da fração de lignina identificados no hidrolisado hemicelulósico de BCA após PTH são ácido p-cumárico, ácido ferúlico, catecol, ácido cafeico, guaiacol, ácido hidroxibenzoico, ácido vanílico, vanilina, siringaldeído, dentre outros (67).

A severidade do PTH determina o efeito do mesmo sob a biomassa e os produtos que serão formados, além das características da biomassa em termos de composição química.

### ***Produção de xilo-oligossacarídeos (XOS)***

XOS são oligômeros constituídos por unidades de xilose unidas por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,4, formando oligossacarídeos entre 2-12 unidades de xilose, como por exemplo, xilobiose ( $X_2$ ), xilotriose ( $X_3$ ), xilotetraose ( $X_4$ ), xilopentose ( $X_5$ ), xilohexaose ( $X_6$ ), xiloheptaose ( $X_7$ ), dentre outros (Figura 1.9) (68).



**Figura 1.9.** Estrutura dos xilooligossacarídeos. Adaptado de Carvalho et al. (69).

Os XOS possuem diversas propriedades biológicas, entre elas, a atividade prebiótica, ou seja, são oligossacarídeos não digeríveis, mas fermentescíveis, que possuem a capacidade de estimular seletivamente o crescimento e manutenção de bactérias benéficas no trato gastrointestinal conhecidas como probióticos. Os prebióticos aumentam o crescimento e número das bactérias benéficas, que além de excluírem várias bactérias patogênicas também conferem uma variedade de benefícios à saúde (70).

A atividade prebiótica dos XOS, no entanto, depende de sua massa molar. XOS  $\leq$  4 unidades de monômeros promovem a proliferação de bifidobactérias benéficas no intestino humano que inibe o crescimento de bactérias patogênicas. Os XOS não são digeríveis, sendo considerados como fibras alimentares solúveis, pois o corpo humano não produz enzimas específicas para hidrólise de ligações do tipo  $\beta$  e, dessa forma, não possuem calorias, podendo ser consumidos em dietas de baixo valor calórico e por portadores de diabetes (19,21,24,69).

Além disso, propriedades antialérgicas e antioxidantes são conferidas pelos substituintes fenólicos (ácido metil-glucurônico) encontrados lateralmente à cadeia principal de alguns XOS. Desta forma, esses XOS podem apresentar atividades, como por exemplo, anticariogênica, imunomodulatória, citotóxica seletiva, protetora contra doenças cardiovasculares e risco de câncer de cólon devido à produção de ácidos graxos de cadeia curta pelos microrganismos da microbiota intestinal, capacidade de redução nos níveis de triglicerídeos séricos e colesterol, assim

como lipoproteína de baixa densidade e aumento nos níveis de lipoproteína de alta densidade também descritos na literatura (18,23,68,69).

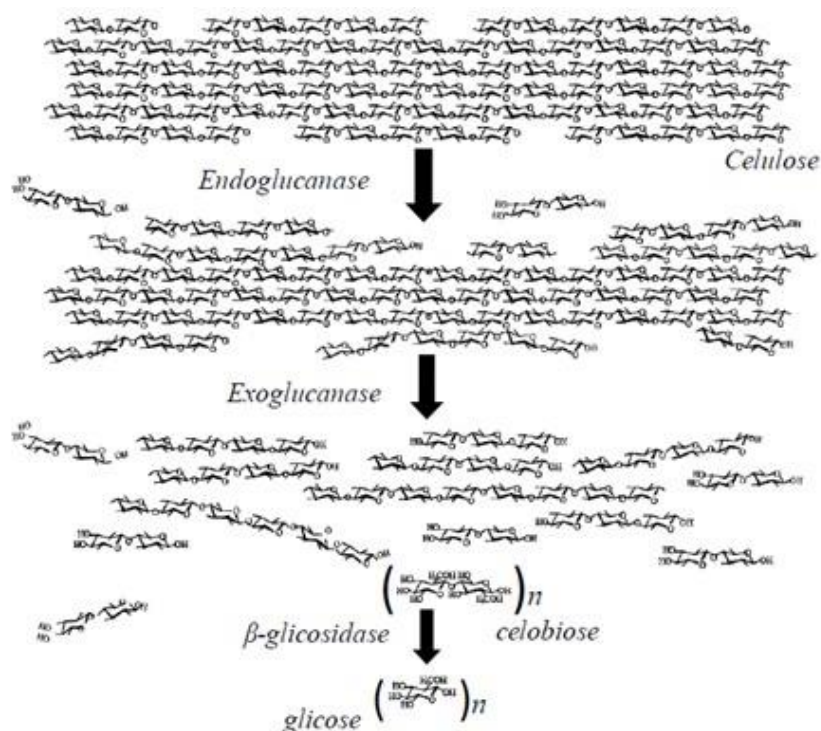
Os XOS são produzidos pela hidrólise da molécula de arabinoxilana e podem diferir quanto ao grau de polimerização, ou seja, quantidade de unidades monoméricas; grau de substituição, razão entre arabinose e xilose e ligações entre eles. Podem ser produzidos por meio de duas estratégias principais, hidrólise enzimática, pela ação de endoxilanases que hidrolisam a xilana a XOS, ou pelo PTH (71). Durante o PTH há a liberação de ácido acético da cadeia de arabinoxilana, o que diminui o pH e determina o grau de polimerização dos XOS produzidos. O teor de XOS produzidos dependerá de um equilíbrio entre a decomposição da fração de arabinoxilana em XOS e em xilose. Em pH muito ácidos, a arabinoxilana é hidrolisada em monômeros de xilose, que podem ainda ser degradados, formando produtos como furfural e ácido levulínico (68).

### ***Hidrólise enzimática da celulose***

A celulose presente na fração sólida resultante do PTH pode ser utilizada para produção de bioetanol e o mais importante passo nesse processo é a hidrólise enzimática, que agrega alto custo ao processo de sacarificação devido ao custo das enzimas utilizadas.

As enzimas responsáveis pela clivagem da celulose são as celulasas, um grupo das hidrolases que clivam as ligações do tipo  $\beta$ -1,4-glicosídicas e são classificadas em três grupos: as endoglucanases, que clivam as ligações internas das fibras da molécula de celulose presentes na parte amorfa da

celulose; as exoglucanases ou celobiohidrolases, que atuam na região externa da molécula de celulose (redutora ou não redutora) e as  $\beta$ -glicosidasases ou celobiasases que hidrolisam oligossacarídeos solúveis e celobiose em glicose. Essas enzimas são adquiridas na forma de coquetéis comerciais com complexos de celulases e hemicelulases (Figura 1.10) (51).



**Figura 1.10.** Modo de ação das enzimas do complexo celulolítico de *Trichoderma reesei*. Martins et al. (72).

Os principais desafios na eficiência da hidrólise enzimática, além do alto custo das enzimas, são difusão da enzima da solução aquosa para as partículas do substrato e adsorção produtiva da enzima na molécula de celulose. O tamanho e formato das partículas e dos poros das superfícies da biomassa também influencia na área de superfície do substrato e quanto

maior a área acessível, melhor a adsorção da enzima e a eficiência de hidrólise enzimática (73).

A adsorção não produtiva da enzima à lignina reduz a atividade da enzima uma vez que a lignina inibe o acesso da enzima à celulose formando uma barreira física restringindo a acessibilidade da celulose às celulasas (74).

A alta carga de sólidos (alta consistência) é muito utilizada devido a algumas vantagens, como se segue: redução no consumo de energia, baixo consumo de água e diminuição na geração de resíduos, porém, apresenta limitações relacionadas à efeitos de restrição de água, inibição pelo produto final, fatores reológicos que dificultam a mistura adequada e transferência de massa durante a hidrólise do substrato (73).

A melhora na eficiência de conversão de carboidratos presentes no material lignocelulósico pode ser alcançada variando-se parâmetros operacionais como carga enzimática, consistência (razão sólido/líquido), velocidade de agitação, presença de aditivos e tempo de hidrólise (75).

## **OBJETIVO**

### ***Geral***

Otimizar o pré-tratamento hidrotérmico (PTH) dos subprodutos de cana-de-açúcar (BCA e PCA) utilizando a metodologia de superfície de resposta, visando à produção de XOS e hidrolisado enzimático de glicose.

### ***Específicos***

- ✓ Identificar as condições ótimas de processo para selecionar as variáveis de operação como a temperatura, tempo e consistência para a produção máxima de XOS;
  
- ✓ Realizar os PTHs nas condições previamente otimizadas para validação dos modelos matemáticos e acúmulo das frações sólidas ricas em celulose;
  
- ✓ Hidrolisar enzimaticamente as frações celulósicas, obtidas anteriormente, visando à produção de hidrolisado de glicose em frascos tipo Erlenmeyer e biorreator.

Na sequência da tese de doutorado são apresentados os capítulos 1 e 2.

O capítulo 1 refere-se ao artigo científico publicado na íntegra na revista *Biomass Conversion and Biorefinery* intitulado “Experimental design, modeling, and optimization of production of xylooligosaccharides by hydrothermal pretreatment of sugarcane bagasse and straw” o qual corresponde as etapas de otimização da produção de XOS por PTH em BCA e PCA.

O capítulo 2 refere-se ao manuscrito em fase final de preparação intitulado “Efficiency of the enzymatic hydrolysis on sugarcane bagasse and straw thermotreated: Assessment in batch systems subject to high mass loads” o qual refere-se à avaliação da eficiência da hidrólise enzimática sob altas consistências de BCA e PCA previamente termotratadas em suas condições otimizadas.

O tópico 4 refere-se às considerações finais referentes aos capítulos 1 e 2 e o tópico 5 às referências citadas na introdução expandida (tópico 1).

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O bagaço (BCA) e a palha (PCA) de cana-de-açúcar foram submetidos a pré-tratamentos hidrotérmicos (PTHs), variando-se o tempo, a consistência (relação massa/volume de água) e a temperatura em um planejamento fatorial completo (delineamento composto central rotacional, DCCR) a fim de se obter uma condição otimizada no qual houvesse a máxima produção de xilooligossacarídeos (XOS). Assim, aplicando-se esta metodologia foi possível obter e validar a melhor condição de tempo, temperatura e consistência de máxima produção de XOS em ambos os subprodutos.

As frações sólidas ricas em celulose obtidas após os PTHs do BCA e da PCA nas condições previamente otimizadas foram submetidas à hidrólise enzimática com preparado enzimático Cellic CTec 2, variando-se a carga mássica (consistência) e enzimática a fim de se obter as melhores condições de conversão de celulose em glicose para produção de hidrolisado rico em glicose .

Desta forma, foi possível obter através da metodologia de DCCR um excelente rendimento na produção de XOS, além disso, as frações sólidas ricas em celulose, resultantes dos PTHs, foram hidrolisadas enzimaticamente em glicose apresentando potencial para produção de etanol de segunda geração (etanol celulósico).

Por fim, a estratégia de produção de XOS via PTH acoplado a hidrólise enzimática da fração rica em celulose visando à produção de bioetanol de segunda geração (bioetanol celulósico) é interessante, pois os XOS tem alto

valor agregado e o bioetanol é um combustível automotivo de origem renovável e tem um alto impacto na sociedade como um todo.

## 5. REFERÊNCIAS

1. Singh LK, Chaudhary G. *Advances in Biofeedstocks and Biofuels*. 1st ed. Singh LK, Chaudhary G, editors. Hoboken: Wiley; 2017. 258 p.
2. Santos FA, De Queiróz JH, Colodette JL, Fernandes SA, Guimaraes VM, Rezende ST. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. *Quim Nova*. 2012;35(5):1004–10.
3. Igbokwe VC, Ezugworie FN, Onwosi CO, Aliyu GO, Obi CJ. Biochemical biorefinery : A low-cost and non-waste concept for promoting sustainable circular bioeconomy. *J Environ Manage* [Internet]. 2022;305(December 2021):114333. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.114333>
4. CONAB. CNDA. *Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar*. 1st ed. Vol. 9, Companhia Nacional de Abastecimento. Brasília; 2022. 58 p.
5. Brasil. *Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar*. Safra 2015/2016 N. 1- Primeiro levantamento Abril [Internet]. Ministério da Agricultura. Companhia Nacional de Abastecimento. 2016 [cited 2016 Nov 11]. Available from: <http://www.conab.gov.br>
6. Ferreira-Leitao V, Gottschalk LMF, Ferrara MA, Nepomuceno AL, Molinari HBC, Bon EPS. *Biomass residues in Brazil: Availability and potential uses*.

- Waste and Biomass Valorization. 2010;1(1):65–76.
7. Ribeiro H, Ficarelli TR de A. Queimadas nos canaviais e perspectivas dos cortadores de cana-de-açúcar em Macatuba, São Paulo. Saude e Soc. 2010;19(1):48–63.
  8. Szczerbowski D, Pitarelo AP, Zandoná Filho A, Ramos LP. Sugarcane biomass for biorefineries: Comparative composition of carbohydrate and non-carbohydrate components of bagasse and straw. Carbohydr Polym [Internet]. 2014;114:95–101. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.07.052>
  9. Morais MC, Ferrari BM, Borges CD, Cherubin MR, Tsai SM, Cerri CC, et al. Does Sugarcane Straw Removal Change the Abundance of Soil Microbes? Bioenergy Res. 2019;12(4):901–8.
  10. Ruiz HA, Conrad M, Sun SN, Sanchez A, Rocha GJM, Romaní A, et al. Engineering aspects of hydrothermal pretreatment: From batch to continuous operation, scale-up and pilot reactor under biorefinery concept. Bioresour Technol [Internet]. 2020;299:122685. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122685>
  11. Chen H, Liu J, Chang X, Chen D, Xue Y, Liu P, et al. A review on the pretreatment of lignocellulose for high-value chemicals. Fuel Process Technol [Internet]. 2017;160:196–206. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuproc.2016.12.007>
  12. Ek M, Gellerstedt G, Heriksson G. Wood Chemistry and Wood Biotechnology, v1, Pulp and Paper Chemistry and Technology. 2nd ed. Ek M, Gellerstedt G, Heriksson G, editors. Vol. 1. Berlin: Walter de Gruyter;

2009. 320 p.
13. Canilha L, Santos VTO, Rocha GJM, Almeida E Silva JB, Giuliatti M, Silva SS, et al. A study on th1. Canilha L, Santos VTO, Rocha GJM, et al (2011) A study on the pretreatment of a sugarcane bagasse sample with dilute sulfuric acid. *J Ind Microbiol Biotechnol* 38:1467–1475. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0931-2> pretreatment of a sugar. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2011;38(9):1467–75.
  14. Eminov S, Wilton-Ely JDET, Hallett JP. Highly selective and near-quantitative conversion of fructose to 5-hydroxymethylfurfural using mildly acidic ionic liquids. *ACS Sustain Chem Eng*. 2014;2(4):978–81.
  15. Brandt-Talbot A, Gschwend FJV, Fennell PS, Lammens TM, Tan B, Weale J, et al. An economically viable ionic liquid for the fractionation of lignocellulosic biomass. *Green Chem*. 2017;19(13):3078–102.
  16. Michud A, Tantt M, Asaadi S, Ma Y, Netti E, Kääriäinen P, et al. Ioncell-F: ionic liquid-based cellulosic textile fibers as an alternative to viscose and Lyocell. *Text Res J*. 2016;86(5):543–52.
  17. Halder P, Kundu S, Patel S, Setiawan A, Atkin R, Parthasarthy R, et al. Progress on the pre-treatment of lignocellulosic biomass employing ionic liquids. *Renew Sustain Energy Rev [Internet]*. 2019;105(January):268–92. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.01.052>
  18. Samanta AK, Jayapal N, Jayaram C, Roy S, Kolte AP, Senani S, et al. Xylooligosaccharides as prebiotics from agricultural by-products: Production and applications. *Bioact Carbohydrates Diet Fibre [Internet]*. 2015;5(1):62–71. Available from:

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcdf.2014.12.003>
19. Vázquez MJ, Alonso JL, Domínguez H, Parajó JC. Xylooligosaccharides: manufacture and applications. *Trends Food Sci Technol.* 2000;11(November):387–93.
  20. de Figueiredo FC, Carvalho AFA, Brienzo M, Campioni TS, de Oliva-Neto P. Chemical input reduction in the arabinoxylan and lignocellulose alkaline extraction and xylooligosaccharides production. *Bioresour Technol* [Internet]. 2017;228:164–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.097>
  21. Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. *J Nutr.* 1995;125(6):1401–12.
  22. Nieto-Domínguez M, de Eugenio LI, York-Durán MJ, Rodríguez-Colinas B, Plou FJ, Chenoll E, et al. Prebiotic effect of xylooligosaccharides produced from birchwood xylan by a novel fungal GH11 xylanase. *Food Chem.* 2017;232:105–13.
  23. Singh RD, Banerjee J, Arora A. Prebiotic potential of oligosaccharides: A focus on xylan derived oligosaccharides. *Bioact Carbohydrates Diet Fibre* [Internet]. 2015;5(1):19–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcdf.2014.11.003>
  24. Hasan MT, Jang WJ, Lee S, Kim KW, Lee B, Han H, et al. Effect of  $\beta$ -glucooligosaccharides as a new prebiotic for dietary supplementation in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) aquaculture. *Aquac Res.* 2018;49(3):1310–9.

25. Embrapa. Agroecologia da Cana-de-Açúcar [Internet]. 2022 [cited 2019 Oct 8]. Available from: <http://www.cana.cnpm.embrapa.br/agroeco.html>
26. Santos F, Diola V. Physiology. In: Santos F, Borém A, Caldas C, editors. London: Elsevier; 2015. p. 463.
27. OECD-FAO. OECD-FAO Agricultural Outlook 2021–2030 [Internet]. OECD-FAO Agricultural Outlook 2021–2030. 2021. 337 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1787/agr-outl-data-%0Ahttp://www.fao.org/documents/card/en/c/cb5332en>
28. O'Hara IM. The sugarcane industry, biofuel, and bioproduct perspectives. In: O'Hara IM, Mundree SG, editors. Sugarcane-Based Biofuels and Bioproducts. 1st ed. Hoboken: John Wiley & Sons; 2016. p. 407.
29. Zanuso E, Lara-Flores AA, Aguilar DL, Velazquez-Lucio J, Aguilar CN, Rodríguez-Jasso RM, et al. Kinetic Modeling, Operational Conditions, and Biorefinery Products from Hemicellulose: Depolymerization and Solubilization During Hydrothermal Processing. In: Ruiz HA, Thomsen MH, Trajano HL, editors. Hydrothermal Processing in Biorefineries. 1st ed. Cham: Springer International Publishing AG; 2017. p. 524.
30. Rabelo SC, Da Costa AC, Rossell CEV. Industrial Waste Recovery. In: Santos F, Borém A, Caldas C, editors. Sugarcane: Agricultural Production, Bioenergy, and Ethanol. 1st ed. San Diego: Elsevier; 2015. p. 493.
31. del Río JC, Lino AG, Colodette JL, Lima CF, Gutiérrez A, Martínez ÁT, et al. Differences in the chemical structure of the lignins from sugarcane bagasse and straw. *Biomass and Bioenergy*. 2015;81:322–38.

32. Canilha L, Chandel AK, Suzane Dos Santos Milessi T, Antunes FAF, Luiz Da Costa Freitas W, Das Graças Almeida Felipe M, et al. Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: An overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. *J Biomed Biotechnol.* 2012;1–15.
33. Dorez G, Ferry L, Sonnier R, Taguet A, Lopez-Cuesta JM. Effect of cellulose, hemicellulose and lignin contents on pyrolysis and combustion of natural fibers. *J Anal Appl Pyrolysis* [Internet]. 2014;107:323–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaap.2014.03.017>
34. Barmina I, Lickrastina A, Valdmanis R, Zake M, Arshanitsa A, Solodovnik V, et al. Effects of biomass composition variations on gasification and combustion characteristics. *Eng Rural Dev.* 2013;(Table 1):382–7.
35. Dias LM, Neto FSPP, Brienzo M, de Oliveira SC, Masarin F. Experimental design, modeling, and optimization of production of xylooligosaccharides by hydrothermal pretreatment of sugarcane bagasse and straw. *Biomass Convers Biorefinery* [Internet]. 2022;(0123456789). Available from: <https://doi.org/10.1007/s13399-021-02151-z>
36. Zhou X, Zhang H, Xu Y. Biodegradation and Utilization of Hemicellulose. In: Chen J, Zhu Y, Liu S, editors. *Functional Carbohydrates Development, Characterization, and Biomanufacture.* 1st ed. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group; 2018. p. 322.
37. Kraus JE, Louro RP, Estelita MEM, Arduin M. A Célula Vegetal. In: Appezzato-da-Glória B, Carmelo-Guerreiro SM, editors. *Anatomia Vegetal.*

- 2nd ed. Viçosa: Editora UFV; 2006. p. 438.
38. Ding S-Y, Himmel M. Anatomy and Ultrastructure of Maize Cell Walls: An Example of Energy Plants. In: Himmel M, editor. Biomass Recalcitrance: Deconstructing the Plant Cell Wall for Bioenergy. 1st ed. New Delhi: Blackwell Publishing Ltd; 2008. p. 539.
  39. Harris PJ, Stone BA. Chemistry and Molecular Organization of Plant Cell Walls. In: Himmel ME, editor. Biomass Recalcitrance Deconstructing the Plant Cell Wall for Bioenergy. 1st ed. New Delhi: Blackwell Publishing Ltd; 2008. p. 539.
  40. Carpita NC, Gibeaut DM. Structural models of primary cell walls in flowering plants: Consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.* 1993;3(1):1–30.
  41. Buckeridge MS, Dos Santos WD, Tiné MAS, De Souza A. The Cell Wall Architecture of Sugarcane and its Implications to Cell Wall Recalcitrance. In: Lam E, Carrer H, Da Silva J, Kole C, editors. Compendium of Bioenergy Plants: SUGARCANE. 1st ed. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group; 2016. p. 127.
  42. De Oliveira DM, Finger-Teixeira A, De Freitas DL, Barreto GE, De Lima RB, Soares AR, et al. Phenolic Compounds in Plants: Implications for Bioenergy. In: Buckeridge MS, De Souza AP, editors. Advances of Basic Science for Second Generation Bioethanol from Sugarcane. 1st ed. Cham: Springer International Publishing AG; 2017. p. 217.
  43. Sheshmani S. Effects of extractives on some properties of bagasse/high density polypropylene composite. *Carbohydr Polym* [Internet].

- 2013;94(1):416–9. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.067>
44. Masarin F, Gurpilhares DB, Baffa DCF, Barbosa MHP, Carvalho W, Ferraz A, et al. Chemical composition and enzymatic digestibility of sugarcane clones selected for varied lignin content. *Biotechnol Biofuels*. 2011;4:1–10.
45. Sluiter A, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D. Determination of Extractives in Biomass. 2008.
46. Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D, et al. Determination of Ash in Biomass. 2008.
47. Trache D, Hussin MH, Hui Chuin CT, Sabar S, Fazita MRN, Taiwo OFA, et al. Microcrystalline cellulose: Isolation, characterization and bio-composites application—A review. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2016;93:789–804. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.09.056>
48. Fengel D, Wegener G. *Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions*. 1st ed. Fengel D, Wegener G, editors. Berlin: Walter de Gruyter; 1989. 613 p.
49. Suhas, Gupta VK, Carrott PJM, Singh R, Chaudhary M, Kushwaha S. Cellulose: A review as natural, modified and activated carbon adsorbent. *Bioresour Technol* [Internet]. 2016;216:1066–76. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.106>
50. Held MA, Jiang N, Basu D, Showalter AM, Faik A. Plant Cell Wall Polysaccharides: Structure and Biosynthesis. In: Ramawat KG, Mérillon J-M, editors. *Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology*. 1st ed. Cham: Springer International Publishing AG; 2015. p. 2234.

51. Buckeridge MS, De Souza AP. *Advances of Basic Science for Second Generation Bioethanol from Sugarcane*-Springer International Publishing (2017).pdf. 2017. 217 p.
52. Peng F, Peng P, Xu F, Sun RC. Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. *Biotechnol Adv.* 2012;30(4):879–903.
53. Paz-Cedeno FR, Solorzano-Chavez EG, Dias LM, Otaviano CA, Bustamante LJA, Monti R, et al. Composition and Chemical Structure of Hemicelluloses and Polysaccharides with Capability of Gel Formation. In: Brienzo M, editor. *Hemicellulose Biorefinery: A Sustainable Solution for Value Addition to Bio- Based Products and Bioenergy.* 1st ed. Singapura: Springer Nature; 2022. p. 111–37.
54. Ebringerová A, Hromádková Z, Heinze T. Hemicellulose. *Adv Polym Sci.* 2005;186:1–67.
55. Hatfield RD, Ralph J, Grabber JH. Review Cell wall cross-linking by ferulates and diferulates in grasses <sup>1</sup>. *J Sci Food Agric J Sci Food Agric.* 1999;79:403–7.
56. Ralph J, Lundquist K, Brunow G, Lu F, Kim H, Schatz PF, et al. Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl- propanoids. Vol. 3, *Phytochemistry Reviews.* 2004. p. 29–60.
57. Buckeridge MS, De Souza AP. *Advances of Basic Science for Second Generation Bioethanol from Sugarcane*-Springer International Publishing (2017).pdf. 1st ed. Buckeridge MS, De Souza AP, editors. Cham: Springer Nature; 2017. 217 p.
58. Brandt A, Gräsvik J, Hallett JP, Welton T. Deconstruction of lignocellulosic

- biomass with ionic liquids. *Green Chem.* 2013;15(3):550–83.
59. Sjöström E, Westermark U. Chemical composition of wood and pulps: basic constituents and their distribution. In: *Analytical methods in wood chemistry, pulping and papermaking* [Internet]. 1st ed. Berlin: Springer, Berlin, Heidelberg; 1998. p. 1–20. Available from: [http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=U-0k4NCbbNQC&oi=fnd&pg=PA1&dq=Analytical+Methods+in+Wood+Chemistry,+Pulping,+and+Papermaking&ots=38DL0qbMh\\_&sig=7v--RmANcXxMeyBaVdH9GtgYx1o%5Cnhttp://books.g](http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=U-0k4NCbbNQC&oi=fnd&pg=PA1&dq=Analytical+Methods+in+Wood+Chemistry,+Pulping,+and+Papermaking&ots=38DL0qbMh_&sig=7v--RmANcXxMeyBaVdH9GtgYx1o%5Cnhttp://books.g)
  60. Chen J, Yuan Z, Zanuso E, Trajano HL. Response of Biomass Species to Hydrothermal Pretreatment. In: Ruiz HA, Thomsen MH, Trajano HL, editors. *Hydrothermal Processing in Biorefineries*. 1st ed. Cham: Springer International Publishing AG; 2017. p. 524.
  61. Yao K, Wu Q, An R, Meng W, Ding M, Li B, et al. Hydrothermal pretreatment for deconstruction of plant cell wall: Part I. Effect on lignin-carbohydrate complex. *AIChE J.* 2018;64(6):1938–53.
  62. Xiao L-P, Song G-Y, Sun R-C. Effect of Hydrothermal Processing on Hemicellulose Structure. In: Ruiz HA, Thomsen MH, Trajano HL, editors. *Hydrothermal Processing in Biorefineries*. 1st ed. Cham: Springer International Publishing AG; 2017. p. 524.
  63. Zhuang X, Wang W, Yu Q, Qi W, Wang Q, Tan X, et al. Liquid hot water pretreatment of lignocellulosic biomass for bioethanol production accompanying with high valuable products. *Bioresour Technol* [Internet]. 2016;199:68–75. Available from:

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.051>
64. Singh A, Rodríguez Jasso RM, Gonzalez-Gloria KD, Rosales M, Belmares Cerda R, Aguilar CN, et al. The enzyme biorefinery platform for advanced biofuels production. *Bioresour Technol Reports* [Internet]. 2019;7(April):100257. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100257>
  65. Ewanick S, Bura R. Hydrothermal pretreatment of lignocellulosic biomass. In: Waldron K, editor. *Bioalcohol production: Biochemical conversion of lignocellulosic biomass*. 1st ed. Boca Raton: Woodhead Publishing Limited; 2010. p. 485.
  66. Sakaki T, Shibata M, Sumi T, Yasuda S. Saccharification of cellulose using a hot-compressed water-flow reactor. *Ind Eng Chem Res*. 2002;41(4):661–5.
  67. Martín C, Galbe M, Nilvebrant NO, Jönsson LJ. Comparison of the fermentability of enzymatic hydrolyzates of sugarcane bagasse pretreated by steam explosion using different impregnating agents. *Appl Biochem Biotechnol - Part A Enzym Eng Biotechnol*. 2002;98–100:699–716.
  68. de Freitas C, Carmona E, Brienza M. Xylooligosaccharides production process from lignocellulosic biomass and bioactive effects. *Bioact Carbohydrates Diet Fibre* [Internet]. 2019;18(March 2018):100184. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2019.100184>
  69. Carvalho AFA, Neto P de O, da Silva DF, Pastore GM. Xylooligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. *Food Res*

- Int [Internet]. 2013;51(1):75–85. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2012.11.021>
70. Gupta M, Bangotra R, Sharma S, Vaid S, Kapoor N, Dutt HC, et al. Bioprocess development for production of xylooligosaccharides prebiotics from sugarcane bagasse with high bioactivity potential. *Ind Crops Prod* [Internet]. 2022;178(October 2021):114591. Available from:  
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.114591>
71. Santibáñez L, Henríquez C, Corro-Tejeda R, Bernal S, Armijo B, Salazar O. Xylooligosaccharides from lignocellulosic biomass: A comprehensive review. *Carbohydr Polym*. 2021;251(September 2020).
72. Martins LF, Kolling D, Camassola M, Dillon AJP, Ramos LP. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. *Bioresour Technol*. 2008;99(5):1417–24.
73. Agrawal R, Verma A, Singhanía RR, Varjani S, Di Dong C, Kumar Patel A. Current understanding of the inhibition factors and their mechanism of action for the lignocellulosic biomass hydrolysis. *Bioresour Technol* [Internet]. 2021;332(February):125042. Available from:  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125042>
74. Saini JK, Patel AK, Adsul M, Singhanía RR. Cellulase adsorption on lignin: A roadblock for economic hydrolysis of biomass. *Renew Energy* [Internet]. 2016;98:29–42. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2016.03.089>
75. Robak K, Balcerek M. Current state-of-the-art in ethanol production from

- lignocellulosic feedstocks. *Microbiol Res* [Internet]. 2020;240(February):126534. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126534>
76. de Souza AP, Leite DCC, Pattathil S, Hahn MG, Buckeridge MS. Composition and Structure of Sugarcane Cell Wall Polysaccharides: Implications for Second-Generation Bioethanol Production. *Bioenergy Res*. 2013;6(2):564–79.
77. Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C. Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples. Tech Rep NREL/TP-510-42623 [Internet]. 2008;(January). Available from: <http://www.nrel.gov/docs/gen/fy08/42623.pdf>
78. Oliveira FMV, Pinheiro IO, Souto-Maior AM, Martin C, Gonçalves AR, Rocha GJM. Industrial-scale steam explosion pretreatment of sugarcane straw for enzymatic hydrolysis of cellulose for production of second generation ethanol and value-added products. *Bioresour Technol* [Internet]. 2013;130:168–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.030>
79. Yoon LW, Ang TN, Ngoh GC, Chua ASM. Regression analysis on ionic liquid pretreatment of sugarcane bagasse and assessment of structural changes. *Biomass and Bioenergy* [Internet]. 2012;36:160–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.10.033>
80. Costa SM, Mazzola PG, Silva JCAR, Pahl R, Pessoa A, Costa SA. Use of sugar cane straw as a source of cellulose for textile fiber production. *Ind Crops Prod* [Internet]. 2013;42(1):189–94. Available from:

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.05.028>
81. Ávila PF, Forte MBS, Goldbeck R. Evaluation of the chemical composition of a mixture of sugarcane bagasse and straw after different pretreatments and their effects on commercial enzyme combinations for the production of fermentable sugars. *Biomass and Bioenergy* [Internet]. 2018;116(80):180–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.06.015>
  82. Batista G, Souza RBA, Pratto B, dos Santos-Rocha MSR, Cruz AJG. Effect of severity factor on the hydrothermal pretreatment of sugarcane straw. *Bioresour Technol* [Internet]. 2019;275(November 2018):321–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.073>
  83. Espírito Santo MC do, Cardoso EB, Guimaraes FEG, deAzevedo ER, Cunha GP da, Novotny EH, et al. Multifaceted characterization of sugarcane bagasse under different steam explosion severity conditions leading to distinct enzymatic hydrolysis yields. *Ind Crops Prod* [Internet]. 2019;139(July):111542. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111542>
  84. Rocha GJM, Gonçalves AR, Oliveira BR, Olivares EG, Rossell CEV. Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production. *Ind Crops Prod*. 2012;35(1):274–9.
  85. Ruiz HA, Rodríguez-Jasso RM, Fernandes BD, Vicente AA, Teixeira JA. Hydrothermal processing, as an alternative for upgrading agriculture residues and marine biomass according to the biorefinery concept: A review. *Renew Sustain Energy Rev*. 2017;21:35–51.

86. Candido RG, Mori NR, Gonçalves AR. Sugarcane straw as feedstock for 2G ethanol: Evaluation of pretreatments and enzymatic hydrolysis. *Ind Crops Prod* [Internet]. 2019;142(June):111845. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111845>
87. Neto FSPP, Roldán IUM, Galán JPM, Monti R, de Oliveira SC, Masarin F. Model-based optimization of xylooligosaccharides production by hydrothermal pretreatment of Eucalyptus by-product. *Ind Crops Prod* [Internet]. 2020;154(June):112707. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112707>
88. Rocha GJM, Silva VFN, Martín C, Gonçalves AR, Nascimento VM, Souto-Maior AM. Effect of Xylan and Lignin Removal by Hydrothermal Pretreatment on Enzymatic Conversion of Sugarcane Bagasse Cellulose for Second Generation Ethanol Production. *Sugar Tech*. 2013;15(4):390–8.
89. Rasmussen H, Sørensen HR, Meyer AS. Formation of degradation compounds from lignocellulosic biomass in the biorefinery: Sugar reaction mechanisms. *Carbohydr Res* [Internet]. 2014;385:45–57. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2013.08.029>
90. Hongdan Z, Shaohua X, Shubin W. Enhancement of enzymatic saccharification of sugarcane bagasse by liquid hot water pretreatment. *Bioresour Technol* [Internet]. 2013;143:391–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.103>
91. Zhang X, Zhang W, Lei F, Yang S, Jiang J. Coproduction of xylooligosaccharides and fermentable sugars from sugarcane bagasse by

- seawater hydrothermal pretreatment. *Bioresour Technol* [Internet]. 2020;309(April):123385. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123385>
92. dos Santos Rocha MSR, Pratto B, de Sousa R, Almeida RMRG, Cruz AJG da. A kinetic model for hydrothermal pretreatment of sugarcane straw. *Bioresour Technol* [Internet]. 2017;228:176–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.087>
93. Brenelli LB, Figueiredo FL, Damasio A, Franco TT, Rabelo SC. An integrated approach to obtain xylo-oligosaccharides from sugarcane straw: from lab to pilot scale. *Bioresour Technol* [Internet]. 2020;123637. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123637>
94. Overend RP, Chornet E, Gascoigne JA. Fractionation of Lignocellulosics by Steam-Aqueous Pretreatments. *Philos Trans R Soc A Math Phys Eng Sci*. 1987;321(1561):523–36.
95. Calado V, Montgomery DC. Planejamento de experimentos usando o Statistica. 1st ed. Calado V, Montgomery DC, editors. Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais Ltda.; 2003. 260 p.
96. Carvalho DM de, Sevastyanova O, Penna LS, Silva BP da, Lindström ME, Colodette JL. Assessment of chemical transformations in eucalyptus, sugarcane bagasse and straw during hydrothermal, dilute acid, and alkaline pretreatments. *Ind Crops Prod* [Internet]. 2015;73:118–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.04.021>
97. Zhang W, You Y, Lei F, Li P, Jiang J. Acetyl-assisted autohydrolysis of sugarcane bagasse for the production of xylo-oligosaccharides without

- additional chemicals. *Bioresour Technol* [Internet]. 2018;265(June):387–93. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.06.039>
98. Candido RG, Mori NR, Gonçalves AR. Sugarcane straw as feedstock for 2G ethanol: Evaluation of pretreatments and enzymatic hydrolysis. *Ind Crops Prod* [Internet]. 2019;142(October):111845. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111845>
99. Vasić K, Knez Ž, Leitgeb M. Bioethanol production by enzymatic hydrolysis from different lignocellulosic sources. *Molecules*. 2021;26(3).
100. Zhang H, Han L, Dong H. An insight to pretreatment, enzyme adsorption and enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: Experimental and modeling studies. *Renew Sustain Energy Rev* [Internet]. 2021;140(12):110758. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.110758>
101. Alvira P, Tomás-Pejó E, Ballesteros M, Negro MJ. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresour Technol* [Internet]. 2010;101(13):4851–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.093>
102. Domínguez-Gómez CX, Nochebuena-Morando LE, Aguilar-Uscanga MG, López-Zamora L. Statistical optimization of dilute acid and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alkaline pretreatment using surface response methodology and tween 80 for the enhancement of the enzymatic hydrolysis of corncob. *Biomass Convers Biorefinery*. 2021;(1).
103. Paz-Cedeno FR, Henares LR, Solorzano-Chavez EG, Scontri M, Picheli

- FP, Miranda Roldán IU, et al. Evaluation of the effects of different chemical pretreatments in sugarcane bagasse on the response of enzymatic hydrolysis in batch systems subject to high mass loads. *Renew Energy*. 2021;165:1–13.
104. Du J, Cao Y, Liu G, Zhao J, Li X, Qu Y. Identifying and overcoming the effect of mass transfer limitation on decreased yield in enzymatic hydrolysis of lignocellulose at high solid concentrations. *Bioresour Technol* [Internet]. 2017;229:88–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.011>
105. Ghose TK. MEASUREMENT OF CELLULASE ACTIVITIES. *Pure Appl Chem*. 1987;59(2):257–68.
106. Lee JM, Jameel H, Venditti RA. A comparison of the autohydrolysis and ammonia fiber explosion (AFEX) pretreatments on the subsequent enzymatic hydrolysis of coastal Bermuda grass. *Bioresour Technol* [Internet]. 2010;101(14):5449–58. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.055>
107. Solorzano-chavez EG, Paz-cedeno FR, Ezequiel L, Oliveira D, Cress V, Monti R, et al. Biomass and Bioenergy Evaluation of the *Kappaphycus alvarezii* growth under different environmental conditions and efficiency of the enzymatic hydrolysis of the residue generated in the carrageenan processing. *Biomass and Bioenergy* [Internet]. 2019;127(May):105254. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.105254>
108. Paz-cedeno FR, Solórzano-chávez EG, Oliveira LE De, Gelli VC, Monti R, Oliveira SC De, et al. Sequential Enzymatic and Mild-Acid Hydrolysis of By-

- Product of Carrageenan Process from *Kappaphycus alvarezii*. 2019;419–32.
109. Oliveira S, Paz-Cedeno FR, Masarin F. Mathematical modeling of glucose accumulation during enzymatic hydrolysis of carrageenan waste. In: Editora Atena, editor. *Avanços Científicos e Tecnológicos Em Bioprocessos*. 2018. p. 97–103.
110. Oliveira S, Paz-Cedeno FR, Masarin F. Kinect Modeling of monomeric sugars formation during the enzymatic hydrolysis of the the residue generated in the carrageenan production from algal biomass. In Aracaju: SINAFERM; 2017.
111. Sluiter JB, Ruiz RO, Scarlata CJ, Sluiter AD, Templeton DW. Compositional analysis of lignocellulosic feedstocks. 1. Review and description of methods. *J Agric Food Chem*. 2010;58(16):9043–53.
112. Modenbach AA, Nokes SE. Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings e A review. *Biomass and Bioenergy* [Internet]. 2013;56:526–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.05.031>
113. Sant’Ana da Silva A, Fernandes de Souza M, Ballesteros I, Manzanares P, Ballesteros M, P. S. Bon E. High-solids content enzymatic hydrolysis of hydrothermally pretreated sugarcane bagasse using a laboratory-made enzyme blend and commercial preparations. *Process Biochem* [Internet]. 2016;51(10):1561–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2016.07.018>
114. Gao Y, Xu J, Zhang Y, Yu Q, Yuan Z, Liu Y. Effects of different pretreatment methods on chemical composition of sugarcane bagasse and enzymatic

- hydrolysis. *Bioresour Technol* [Internet]. 2013;144:396–400. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.036>
115. Batalha LAR, Han Q, Jameel H, Chang H min, Colodette JL, Borges Gomes FJ. Production of fermentable sugars from sugarcane bagasse by enzymatic hydrolysis after autohydrolysis and mechanical refining. *Bioresour Technol* [Internet]. 2015;180:97–105. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.060>
116. dos Santos-Rocha MSR, Pratto B, Corrêa LJ, Badino AC, Almeida RMRG, Cruz AJG. Assessment of different biomass feeding strategies for improving the enzymatic hydrolysis of sugarcane straw. *Ind Crops Prod* [Internet]. 2018;125(September):293–302. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.09.005>