

Trabalho de Conclusão de Curso

Curso de Graduação em Engenharia Ambiental

EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO DILUÍDO NA FORMAÇÃO DE
PSEUDO- LIGNINA EM PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR E SACARIFICAÇÃO
ENZIMÁTICA

Júlia Ribeiro Martins

Orientador: Dr. Michel Brienzo

Coorientador: Alison Andrei Schmatz

Rio Claro - SP

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Instituto de Geociências e Ciências Exatas

Câmpus de Rio Claro

JÚLIA RIBEIRO MARTINS

EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO DILUÍDO NA
FORMAÇÃO DE PSEUDO-LIGNINA EM PALHA DE CANA-
DE-AÇÚCAR E SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Geociências e Ciências Exatas -
Câmpus de Rio Claro, da Universidade
Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, para
obtenção do grau de Engenheiro Ambiental.

Rio Claro - SP

2019

M386e Martins, Júlia Ribeiro
Efeito do Pré-Tratamento Ácido Diluído na Formação
de Pseudo-Lignina em Palha de Cana-de-Açúcar e
Sacarificação Enzimática / Júlia Ribeiro Martins. -- Rio
Claro, 2019
54 p. : il., tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (-) - Universidade
Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Geociências e
Ciências Exatas, Rio Claro
Orientador: Michel Brienzo
Coorientador: Alison Andrei Schmatz

1. Etanol celulósico. 2. Enzima. 3. Ácido sulfúrico. I.
Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do
Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Rio Claro. Dados fornecidos pelo
autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

JÚLIA RIBEIRO MARTINS

EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO DILUÍDO NA
FORMAÇÃO DE PSEUDO-LIGNINA NA PALHA DE CANA-DE-
AÇÚCAR E SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA

Trabalho de Formatura apresentado ao Instituto de
Geociências e Ciências Exatas - Câmpus de Rio Claro,
da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita
Filho, para obtenção do grau de Engenheiro Ambiental.

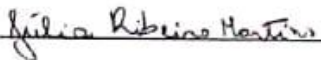
Comissão Examinadora

Dr Michel Brienzo (orientador)

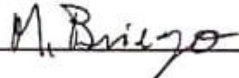
Dra. Dânia Elisa Christofolletti Mazzeo Morales

Dra. Cárol Terrone

Rio Claro, 28 de junho de 2019.



Assinatura da aluna



Assinatura do orientador

RESUMO

A cana-de-açúcar é uma gramínea amplamente cultivada, principalmente no Brasil, graças ao seu grande valor econômico como matéria-prima para produção de açúcar e etanol. A celulose existente em outras partes da biomassa da cana-de-açúcar, como a palha, apresenta também potencial para geração de produtos de destaque econômico. Para o seu aproveitamento, e sua conversão em bioetanol, é necessária a aplicação de pré-tratamentos em virtude de sua recalcitrância. No pré-tratamento ácido diluído (H_2SO_4) ocorre a formação de produtos de degradação de açúcares e lignina, que são inibidores na hidrólise enzimática e processo fermentativo, podendo ocorrer a condensação entre esses compostos e precipitação sobre a fibra de celulose, formando a pseudo-lignina. Assim, visando melhorar a efetividade dos pré-tratamentos e aumentar a produtividade de etanol de segunda geração, é possível controlar condições do pré-tratamento, como temperatura, tempo de reação e concentração de ácido, com o objetivo de minimizar a formação desses produtos de degradação. Neste estudo, utilizou-se a palha da cana-de-açúcar em pré-tratamentos com ácido sulfúrico diluído realizados em reatores de aço inoxidável com volume operacional de 50 mL. O material foi submetido a diferentes condições operacionais, como tempo de reação (10 a 60 min), temperatura (120 a 180°C) e concentração de ácido (2 a 20 %, m/m massa de ácido por massa de material). Os resultados obtidos indicam que condições muito extremas de pré-tratamento ácido (60 minutos de pré-tratamento, a 180°C e 20% de ácido) levaram à degradação da fração celulósica, com uma redução de 56,17% em relação à biomassa *in natura*, o que pode explicar a diminuição do rendimento de glicose após a hidrólise enzimática, já que tais condições apresentaram um dos menores rendimentos (1,49%). Além disso, houve aumento do teor de lignina em todas as amostras após o pré-tratamento ácido diluído, ao mesmo tempo em que ocorreu redução do teor de hemicelulose, em relação à biomassa *in natura*. As condições que levaram ao maior teor de lignina e de pseudo-lignina foram, também, as mais extremas, com 60 minutos de reação, a 180°C e 20% de ácido, apresentando 75,37% de lignina e 25,46% de pseudo-lignina. Por fim, foi possível concluir que todas as condições de pré-tratamento estudadas influenciaram o rendimento em glicose após a hidrólise enzimática, sendo que o tempo de reação e a associação entre a temperatura e a concentração de ácido foram os mais determinantes, podendo-se estimar, por meio dos gráficos obtidos, que, dentro do intervalo estudado, as melhores condições de pré-tratamento para maximizar a hidrólise enzimática são 60 minutos de reação, a 180°C e 2% de ácido sulfúrico.

Palavras-chave: recalcitrância, biomassa lignocelulósica, bioetanol, ácido diluído, hidrólise enzimática.

Abstract

Sugarcane is widely grown, mainly in Brazil, due to its great economic value, as a source of sugar and for ethanol production. Cellulose present in the straw of sugarcane presents potential for the generation of products of outstanding economic importance. The straw consists of the tip and leaves of the sugarcane plant, with high potential for the generation of high value-added products, since that about 30% of the total energy of the plant is contained in this material. The straw is becoming a new abundant residue, studied for its use, such as its conversion into bioethanol, a process in which the recalcitrance of the material needs an application of pre-treatment. In the diluted acid pre-treatment, sugar and lignin-degradation products are generated, which are inhibitors in the enzymatic hydrolysis and fermentation process. In order to improve the effectiveness of pre-treatments and increase the productivity of second-generation ethanol, pretreatment conditions should be controlled. The sugarcane straw was used in pre-treatments with diluted sulfuric acid carried out in stainless steel reactors with an operational volume of 50 mL. The material was subjected to different operating conditions, such as reaction time (10 to 60 minutes), temperature (120 to 180 °C) and acid concentration (2 to 20%, m/m acid mass per mass of material), to evaluate the released sugars and the formation of lignin and pseudo-lignin (lignin condensed with sugar degradation products). The results indicate that very extreme acid pretreatment conditions (60 minutes pretreatment at 180°C and 20% acid) resulted in the degradation of the cellulosic fraction, with a 56.17% reduction in relation to the *in natura* biomass, which explains the decrease in glucose yield after enzymatic hydrolysis, since these conditions had one of the lowest yields (1.49%). In addition, there was an increase on lignin content in all samples after diluted acid pretreatment, while a reduction in the hemicellulose content occurred in relation to the *in natura* biomass. The conditions that led to the higher content of lignin and pseudolignin were also the most extreme, with a 60 minutes reaction, at 180°C and 20% acid, presenting 75.37% lignin and 25.46% pseudo-lignin. Finally, it was possible to conclude that all the pretreatment conditions studied influenced glucose yield after enzymatic hydrolysis, and the reaction time and the association between temperature and acid concentration were the most determinant, estimating, through the graphs obtained, that, within the range studied, the best pre-treatment conditions to maximize the enzymatic hydrolysis are 60 minutes of reaction at 180°C and 2% of sulfuric acid.

Keywords: recalcitrance, lignocellulosic biomass, bioethanol, diluted acid, enzymatic hydrolysis.

Sumário

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	2
2.1.	Objetivos Específicos.....	2
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
3.1.	Materiais Lignocelulósicos	3
3.2.	Cana-de-Açúcar.....	5
3.3.	Palha de Cana-de-Açúcar	7
3.4.	Celulose.....	9
3.5.	Hemicelulose.....	11
3.6.	Lignina	12
3.7.	Produção de Bioetanol	13
3.7.1.	Pré-Tratamento.....	14
3.7.2.	Hidrólise.....	17
3.7.3.	Fermentação	20
4	METODOLOGIA	20
4.1.	Pré-Tratamento Ácido Diluído.....	21
4.2.	Caracterização Química	22
4.2.1.	Determinação de lignina solúvel	22
4.2.2.	Determinação da lignina insolúvel	23
4.2.3.	Determinação da porcentagem de açúcares.....	23
4.3.	Extração da Pseudo-Lignina.....	24
4.4.	Hidrólise Enzimática	24
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1.	Pré-Tratamento.....	25
4.2.	Caracterização Química	27
4.3.	Extração de Pseudo-Lignina.....	31
4.4.	Hidrólise Enzimática	34
4.5.	Amostra Livre de Extrativos	36
5.	CONCLUSÃO	37
	Referências Bibliográficas	39

1 INTRODUÇÃO

Durante o século XX, principalmente após a Revolução Industrial, o desenvolvimento econômico aumentou a dependência de combustíveis fósseis, como fontes de energia usadas nos meios de transporte e em atividades industriais. Segundo o Banco Nacional do Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES), petróleo, gás natural e seus derivados respondem por 55% do consumo mundial de energia, sendo, portanto, de extrema importância para o desenvolvimento econômico. No entanto, tal crescimento não pode ser considerado como sustentável, já que se trata de combustíveis com reservas finitas, cuja queima representa aproximadamente 82% das emissões de gases causadores do efeito estufa, como o dióxido de carbono, o metano e o óxido nitroso (SANTOS et al., 2012).

O planeta encontra-se em condições cada vez mais preocupantes de preservação do meio ambiente, e assim surge a necessidade de estudo de fontes sustentáveis de energia, como a produção de combustíveis a partir de matéria orgânica renovável (biomassa). O etanol tem se mostrado uma das melhores alternativas para a redução do uso de combustíveis derivados do petróleo e, nesse contexto, o Brasil se destaca mundialmente pelo pioneirismo na produção de etanol combustível a partir do caldo da cana-de-açúcar (OLIVEIRA, 2010). As cultivares modernas são híbridos originários do cruzamento entre as espécies *Saccharum officinarum* e *Saccharum spontaneum*, em sua maioria (CORDEIRO et al., 2006).

A cana-de-açúcar traz consigo uma nova problemática, relativa às amplas áreas de plantio necessárias para suprir as demandas energéticas atuais, prejudicando, assim, o cultivo de outras culturas também importantes para a sociedade, no contexto da agropecuária. O aproveitamento integral da cana-de-açúcar (palha e bagaço) pode aumentar significativamente a produção de etanol por hectare, sem necessidade de ampliação da área cultivada (SANTOS et al., 2012). Os resíduos da agroindústria, como a palha de trigo, palha de milho, entre outros materiais lignocelulósicos, estão sendo estudados para a obtenção de bioetanol a partir de carboidratos estruturais, de modo a complementar a produção do etanol combustível (OLIVEIRA, 2010).

Com a promulgação da Lei 11.241/02, regulamentada pelo Decreto 47.700/03, que dispõe sobre a eliminação gradual da queima da palha da cana-de-açúcar até 2021 no Estado de São Paulo – com tendência do mesmo ocorrer nos demais estados produtores –, o setor

sucroalcooleiro teve de lidar com um novo resíduo abundante: a palha, constituída das folhas e resíduos vegetais (pontas de colmo) da própria cana-de-açúcar (JUSBRASIL, 2002; OLIVEIRA, 2010).

Entretanto, é difícil converter toda a biomassa em etanol ou produtos de alto valor agregado em virtude da recalcitrância do material, sendo necessária a aplicação de pré-tratamentos (MELATI et al., 2018). Estudos realizados com pré-tratamentos em meio ácido diluído mostram um aumento da porcentagem de lignina no material pré-tratado, mas com melhora no rendimento em glicose na etapa de hidrólise enzimática (BRIENZO et al., 2017). Neste tipo de pré-tratamento, formam-se produtos indesejados, produtos da degradação de açúcares e lignina, os quais são inibidores do processo fermentativo (RASMUSSEN et al., 2014). Além disso, ocorre a condensação entre produtos de degradação de açúcares com os da lignina e precipitação sobre a fibra de celulose, formando a pseudo-lignina (HU et al., 2012).

Entender os fatores que levam à formação dessa estrutura, a qual é prejudicial à ação enzimática, é fundamental para melhorar a efetividade dos pré-tratamentos (HU; RAGAUSKAS, 2014). O conhecimento sobre a formação da pseudo-lignina no pré-tratamento ácido diluído, determinada por condições como temperatura, concentração de ácido e tempo de reação, é extremamente importante na perspectiva da produção de etanol de segunda geração, já que evitar a formação da pseudo-lignina pode melhorar a efetividade dos pré-tratamentos, otimizando a ação de enzimas.

2 OBJETIVOS

O presente projeto teve como objetivo geral analisar o efeito de pré-tratamento ácido diluído na formação de pseudo-lignina em palha de cana-de-açúcar, tendo em vista que a pseudo-lignina age como inibidor na hidrólise enzimática.

2.1. Objetivos Específicos

- a) Analisar a influência dos parâmetros de pré-tratamento ácido diluído, como temperatura, tempo e concentração de ácido, na formação da pseudo-lignina.
- b) Analisar a influência da presença de pseudo-lignina no rendimento em glicose da hidrólise enzimática.
- c) Levantar outros fatores determinantes no rendimento em glicose após a hidrólise enzimática, como composição química da biomassa, solubilização da celulose e da hemicelulose e a presença de extrativos.

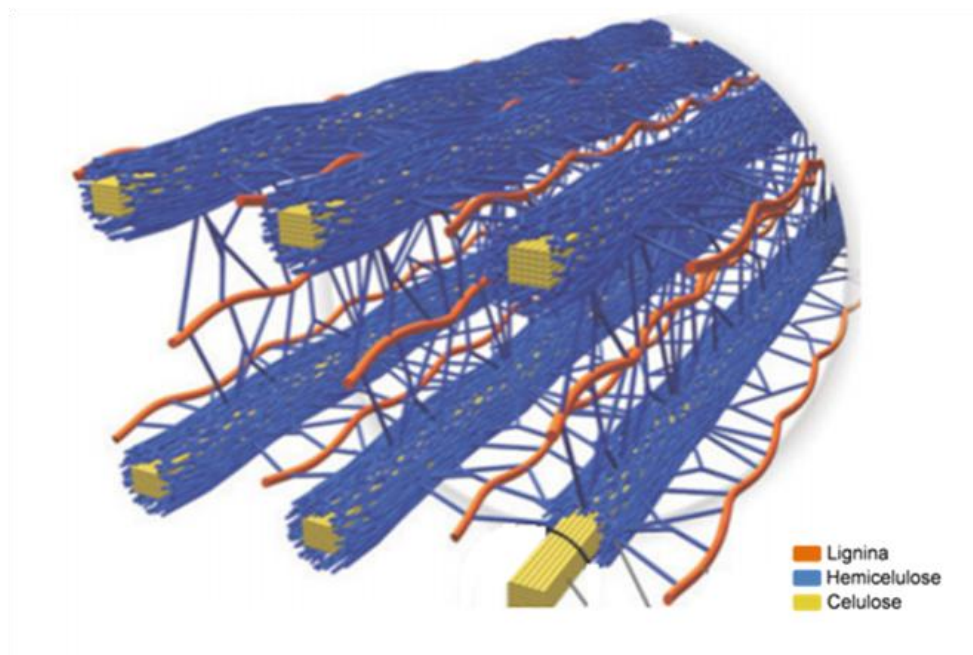
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Materiais Lignocelulósicos

Os materiais lignocelulósicos, como resíduos agrícolas (palha e bagaço de cana-de-açúcar, palha de trigo e resíduos de milho), resíduos florestais (restos de madeira), entre outros, constituem-se em matéria-prima para a produção de bioetanol, bem como de outros produtos utilizados em diversos segmentos industriais, graças ao seu caráter renovável, abundância e baixo custo (BINOD et al., 2010; YAMASHITA et al., 2008; DEMIRBAS, 2003).

Os materiais lignocelulósicos são constituídos de estruturas compactas e fibrosas, compostas em sua maioria pelos polissacarídeos celulose e hemicelulose, entremeados por outra macromolécula formada por alcoóis aromáticos, a lignina, aos quais se encontram unidos por ligações covalentes e ligações de hidrogênio, sendo que as proporções entre cada constituinte dependem da origem do material vegetal. A estrutura do material lignocelulósico pode ser vista na Figura 1.

Figura 1 – Estrutura do material lignocelulósico



Fonte: Santos et al., 2012

A composição química do bagaço da cana-de-açúcar é de 32% a 38% de celulose, seguido de 19% a 24% de hemicelulose e de 23% a 32% de lignina, além de uma pequena quantidade de cinzas e extrativos. Estima-se que para cada tonelada de cana-de-açúcar processada são gerados em média 140 kg de bagaço em base seca e 140 kg de palha, que ultimamente é subaproveitada (SANTOS et al., 2012). Atualmente, o bagaço é utilizado para queima em sistema de cogeração de energia (caldeiras), e a palha, subaproveitada, é deixada no campo.

A composição química da biomassa é determinante no que tange ao rendimento de cada biomassa em tal produção, já que a hidrólise e a fermentação para produção de bioetanol agem diretamente na fração de celulose e hemicelulose, enquanto a fração de lignina dificulta o acesso das enzimas (SILVA, 2010). A Tabela 1 mostra, em porcentagem, a composição química de biomassas lignocelulósicas com potencial para produção de etanol de segunda geração.

Tabela 1 – Composição química de biomassas lignocelulósicas.

Biomassa	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Referência
Palha de cana	38,1	29,2	26,2	Silva (2009)
Bagaço de cana	36,9-48,6	24,6-32,8	13,3-21,5	Brienzo et al. (2017)
Madeira dura	43-47	25-35	16-24	Santos et al. (2012)
Madeira mole	40-44	25-29	25-31	Santos et al. (2012)
Talo de milho	35	25	35	Santos et al. (2012)
Farelo de cevada	23	32,7	24,4	Silva (2010)
Palha de cevada	31-45	27-38	14-19	Santos et al. (2012)
Muda de grama	45	31,4	12	Sun; Cheng (2002)
Algodão	95	2	0,3	Santos et al. (2012)
Palha de trigo	30	50	15	Santos et al. (2012)
Papel	85-99	0	0-15	Sun; Cheng (2002)
Sisal	73,1	14,2	11	Santos et al. (2012)
Palha de arroz	43,5	22	17,2	Silva (2010)
Fibra de coco	36-43	0,15-0,25	41-45	Santos et al. (2012)

Dentre as biomassas lignocelulósicas apresentadas, a cana-de-açúcar ganha destaque para a produção de etanol de segunda geração, principalmente no Brasil, devido ao seu amplo cultivo no país (MELATI et al., 2018). Além disso, a eliminação gradual da queima da palha da cana-de-açúcar até 2021 no Estado de São Paulo, disposta pela Lei 11.241/02, representa incentivo ao aproveitamento desta biomassa.

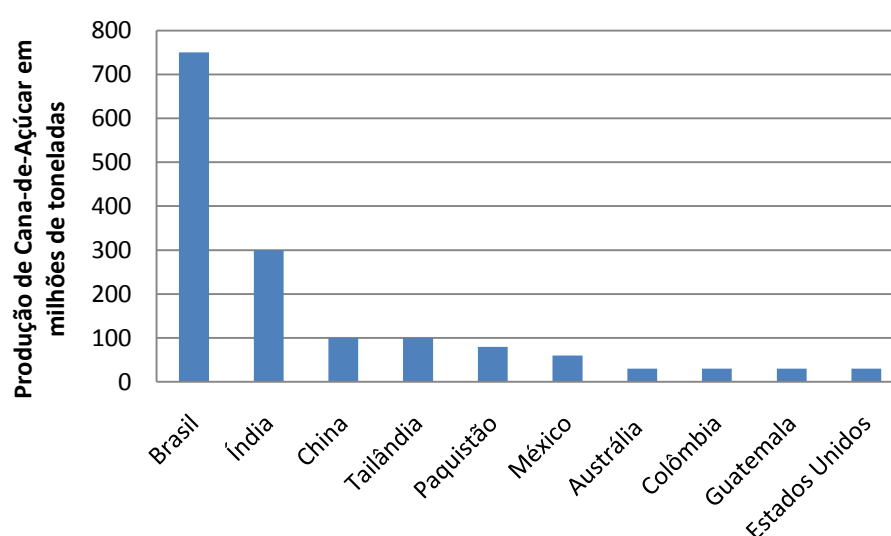
3.2. Cana-de-Açúcar

A cana-de-açúcar é uma gramínea, oriunda do sudeste asiático, mas produzida em grande escala mundial, alcançando mais de 80 países, principalmente graças ao aumento de consumo como fonte de açúcar, etanol e energia elétrica na alimentação de caldeiras (TEIXEIRA, 2006).

O Brasil atualmente é o maior produtor e consumidor de cana-de-açúcar no mundo (Figura 2), em virtude de sua adaptação ao clima tropical e ao seu potencial produtivo, gerando diversos recursos e empregos diretos, além de contribuir significativamente para a

economia, com relativo aumento em sua produção. De 2004 a 2014, a expansão da cana-de-açúcar foi de 322% na região Centro-Oeste. Os estados que mais expandiram sua área de plantio foram Mato Grosso do Sul, com crescimento de aproximadamente 500%, e Goiás, com 456% (CONAB, 2014). De acordo com o acompanhamento de safra realizado pela Associação dos Produtores de Bioenergia do Mato Grosso do Sul (2019), este estado teve um aumento de 5,39% na produção de cana na safra 2018/2019 se comparado à safra anterior, sendo que o aumento na produção de etanol foi de 25,89%.

Figura 2 – Os dez maiores produtores de cana-de-açúcar no mundo em toneladas em 2017



Fonte: FAO, 2017

A cana-de-açúcar possui porte ereto, com altura máxima em torno de 2–3 m. Apresenta raízes fasciculadas, o que permite melhor fixação ao solo, além de tronco não ramificado do tipo colmo cheio, o qual é rico em reserva de sacarose. Suas folhas são longas, dispostas alternadamente entre os nós do colmo, com nervuras paralelas e uma mediana principal, além de limbos finamente serrilhados (OLIVEIRA, 2010).

A cana-de-açúcar é composta pela epiderme, capa fina que recobre e protege o talo, atuando como impermeabilizante; pela casca, composta de fibras bastante lignificadas que protegem o talo dos efeitos mecânicos externos, dando sustentação à planta; e na parte interior

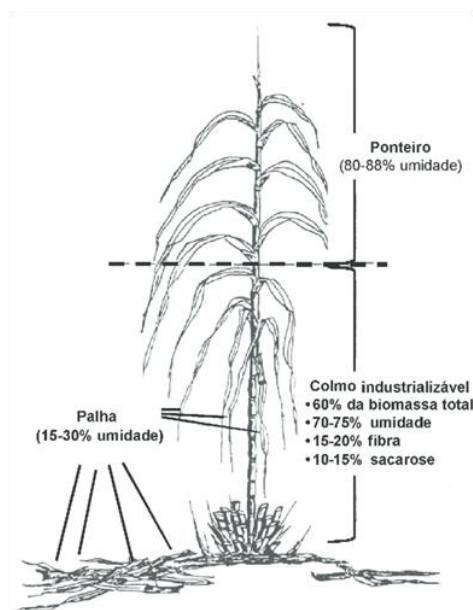
do talo se encontra o tecido parenquimatoso, cuja função é armazenar a sacarose (OLIVEIRA, 2010). Imersos dentro desse tecido aparecem feixes de fibras e vasos que juntos possuem a função de conduzir os nutrientes e produtos produzidos pela planta (ICIDCA, 1990).

A produção e acúmulo de sacarose tem sua eficiência diretamente ligada ao desempenho fotossintético da planta. A cana-de-açúcar apresenta metabolismo fotossintético C4, que é referido como o mais eficiente para a produção de biomassa, quando comparado à via de fotossíntese C3. Assim, comumente, designa-se a importância econômica da cana-de-açúcar ao seu colmo, por ser a região de armazenamento da sacarose, no entanto, é essencial ressaltar que a celulose presente na parede celular do bagaço resultante da extração do suco, bem como da palha, também apresentam potencial energético (SILVA et al., 2009).

3.3. Palha de Cana-de-Açúcar

A palha é constituída pelas folhas secas da planta da cana-de-açúcar, com grande potencial para geração de produtos com alto valor agregado, uma vez que cerca de 30% da energia total da planta está contida nesse material (ALMEIDA, 2008). A Figura 3 apresenta um desenho esquemático de uma planta de cana-de-açúcar.

Figura 3 – Desenho esquemático de uma planta de cana-de-açúcar, suas partes componentes (colmo, ponteiro e palha) e as respectivas composições em termos de umidade e biomassa.



Fonte: Matsuoka et al, 2015

O potencial energético da cana-de-açúcar é desmembrado em seus três principais contribuintes: para cada tonelada de cana, 1.700 milijoules (mJ) vêm do etanol produzido, enquanto 2.100 e 2.150 mJ são referentes ao bagaço e à palha, respectivamente (MOREIRA, 2000). O tecido vegetal da palha de cana apresenta os mesmos componentes químicos que o bagaço ou a madeira. Entretanto, as propriedades físico-mecânicas, geométricas, térmicas e energéticas são diferentes.

Foi muito comum a prática de queima de palha para removê-la do colmo, o que facilita a colheita e afugenta animais peçonhentos, que poderiam representar risco para os cortadores. Contudo, a queimada do canavial causa sérios problemas de ordem ambiental e de saúde pública devido à grande produção de fuligem e diversos compostos tóxicos, comprometendo a qualidade do ar nas regiões de plantio (OLIVEIRA, 2008). A sustentabilidade da agricultura também fica comprometida, pois o fogo altera as propriedades químicas, físicas e biológicas do solo, prejudica a reciclagem dos nutrientes e diminui o percentual de açúcares redutores totais (ART) contidos na cana-de-açúcar (FERREIRA, 2014).

Outra prática é a deposição da palha no próprio solo da área plantada. No entanto, a cobertura em excesso do solo com palha de cana-de-açúcar pode prejudicar as plantas em

desenvolvimento, afetar a umidade, luminosidade e temperatura do solo, além de favorecer a propagação de parasitas das sementes (CORREIA; DURIGAN, 2004).

A produtividade média de cana-de-açúcar no Brasil é de 85 toneladas por hectare. Tendo em vista que são geradas cerca de 12 toneladas de palha e 12 toneladas de bagaço em base seca por hectare de plantação, e considerando que toda a glicose será convertida em etanol, o aproveitamento integral da cana-de-açúcar (colmo, palha e bagaço) poderá aumentar significativamente a produção de etanol por hectare, passando dos atuais 7.000 L para aproximadamente 14.000 L, sem necessidade de expansão da área cultivada (SANTOS et al., 2012).

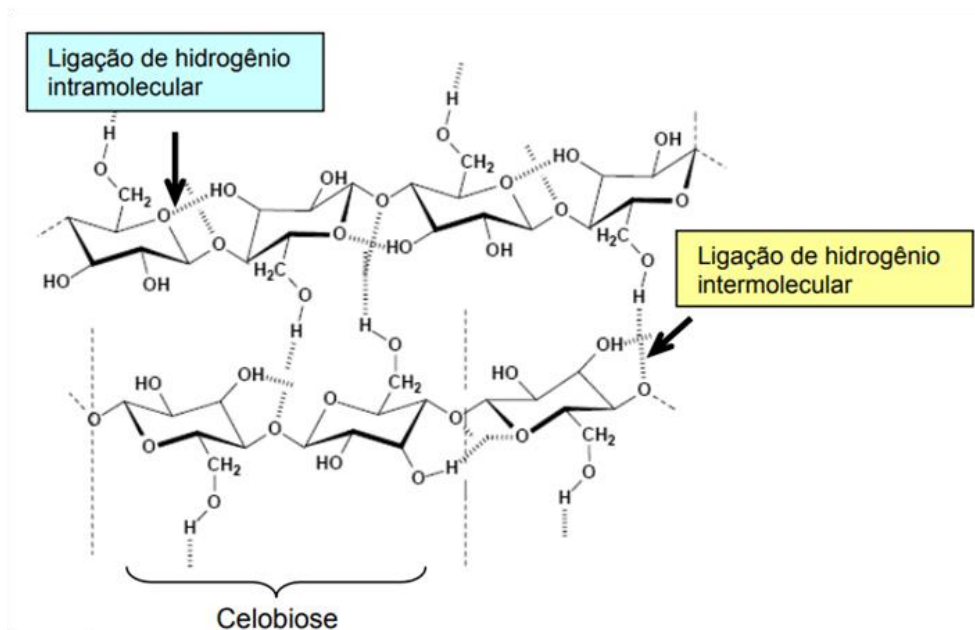
Para a produção de etanol de segunda geração, é importante analisar a composição química e as características físico-químicas das biomassas lignocelulósicas, no entanto, tais características dependem de fatores de origem, como clima da região, características do solo e fertilizantes agrícolas utilizados. Para a palha da cana-de-açúcar, pode-se estimar tal composição como geralmente sendo de 40-44% de celulose, 30-32% de hemicelulose e 22-25% de lignina (SANTOS et al., 2012)

3.4. Celulose

A celulose é o polissacarídeo mais abundante na natureza, sendo a base estrutural das células das plantas, e é a mais importante substância natural produzida pelos organismos vivos. A principal fonte dessa molécula é a fibra vegetal, onde a celulose atua como um elemento estrutural, proporcionando resistência física às plantas (JEDVERT, 2017).

A celulose é um polissacarídeo constituído por unidades de anidroglicopirranose, organizadas em dímeros de celobiose e dispostas linearmente, resultando em um polissacarídeo de alto peso molecular. Entre as cadeias poliméricas, há ligações de hidrogênio e interações de Van der Waals, que formam regiões cristalinas, com maior organização, em sua maioria bastante ordenadas. Porém, outras zonas amorfas, menos organizadas, ocorrem alternadamente e podem absorver água, tornando a celulose macia e flexível (GOLDSTEIN, 1981; FENGEL; WEGENER, 1989; FERREIRA et al., 2009). A Figura 4 ilustra a estrutura de uma cadeia de celulose.

Figura 4 – Representação da macromolécula de celulose e interações entre cadeias.

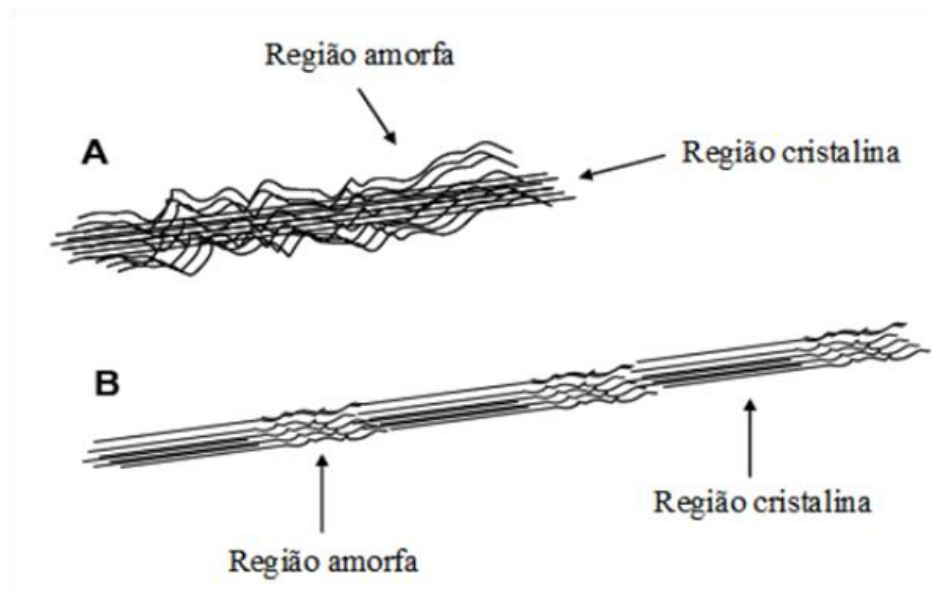


Fonte: Moraes, 2005

As regiões cristalinas e amorfas da celulose ocorrem em diferentes proporções de acordo com a origem do material, e tal característica tem influência no ataque enzimático no processo de hidrólise. O material amorfo é definido como aquele que é disforme ou não apresenta uma forma definida (O'SULLIVAN, 1997). A maioria das regiões amorfas corresponde às cadeias situadas na superfície da microfibrila, enquanto os componentes cristalinos ocupam o seu núcleo (LARSSON et al., 1997), como pode ser visto na Figura 5.

As regiões amorfas e cristalinas não possuem fronteiras bem definidas, mas parece haver transição de um arranjo ordenado das cadeias de celulose para um estado desordenado ou amorfo (RIBEIRO, 2014). Assim como o índice de cristalinidade, o grau de polimerização também é uma propriedade importante para a classificação da celulose. O grau de polimerização informa a frequência relativa de ligações glicosídicas internas e terminais, disponíveis para atuação de celulasas, e pode ser definido com base no número médio de monômeros e na massa molecular média do polissacarídeo, assim como inferido a partir de sua viscosidade (SILVA, 2010).

Figura 5 – Diferentes visões do modo de distribuição da celulose cristalina e amorfa na microfibrila. A: Celulose cristalina está no centro da microfibrila e é envolta pelo substrato amorfo. B: As regiões cristalinas e amorfas são repetidas ao longo da dimensão horizontal.



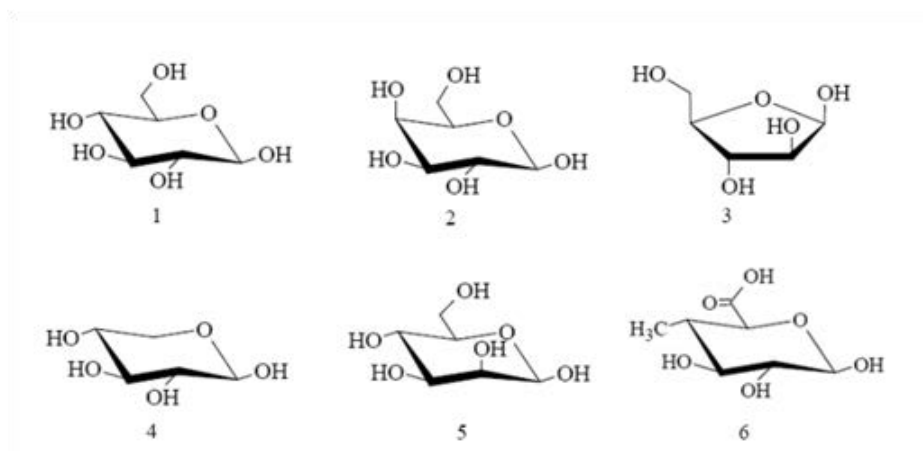
Fonte: Rabelo, 2010

Assim, o índice de cristalinidade e o grau de polimerização, associados ao envoltório de lignina, conferem à macromolécula de celulose grande resistência à hidrólise, representando um grande desafio para a utilização dos materiais lignocelulósicos em aplicações biotecnológicas, como a produção de etanol de segunda geração (ARANTES; SADDLER, 2010).

3.5. Hemicelulose

A hemicelulose é um heteropolissacarídeo, constituído principalmente por pentoses (D-xilose e L-arabinose) e hexoses (D-glicose, D-galactose e D-manose) e, diferentemente da celulose, consiste em cadeias mais curtas de açúcares (GIBSON, 2013), como pode ser visto na Figura 6.

Figura 6 – Açúcares constituintes das hemiceluloses – (1) D-glucose, (2) D-galactose, (3) L-arabinose, (4) D-xilose, (5) D-manose, (6) 4-O-metil-D-glucurônico.



Fonte: Pitarelo, 2007

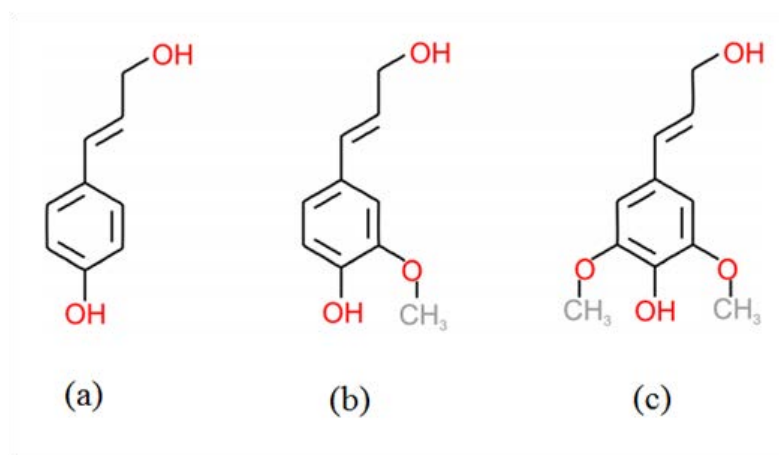
As hemiceluloses não são, portanto, um composto químico definido, mas sim uma classe de compostos macromoleculares (MARABEZZI, 2009). Sua estrutura apresenta ramificações que interagem facilmente com a celulose, dando estabilidade e flexibilidade ao agregado (SANTOS, 2012), compondo a fibra lignocelulósica, na qual também é possível encontrar a lignina.

3.6. Lignina

A lignina é um dos principais componentes dos tecidos de gimnospermas e angiospermas, sendo importante no transporte de água, nutrientes, metabólitos, além de conferir resistência mecânica e proteger contra o ataque de micro-organismos (FENGEL; WEGENER, 1989).

A estrutura da lignina tem grande massa molecular, apresenta forma tridimensional e é formada por unidades de p-propilfenol, com substituintes metoxila no anel aromático, unidas por ligações do tipo éter e que estabelecem ligações cruzadas entre si. A biossíntese de lignina pode ser considerada como resultado da polimerização de três tipos principais de unidades de fenilpropano, os monolignóis álcool cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico, que são responsáveis por sua forma dura (Figura 7) (THOMPSON; TYNER, 2014).

Figura 7 – Precursores primários da lignina: a) álcool trans-p-cumarílico; b) álcool trans-sinalítico; e c) álcool trans-coniferílico.



Fonte: Zakzeski et al., 2010.

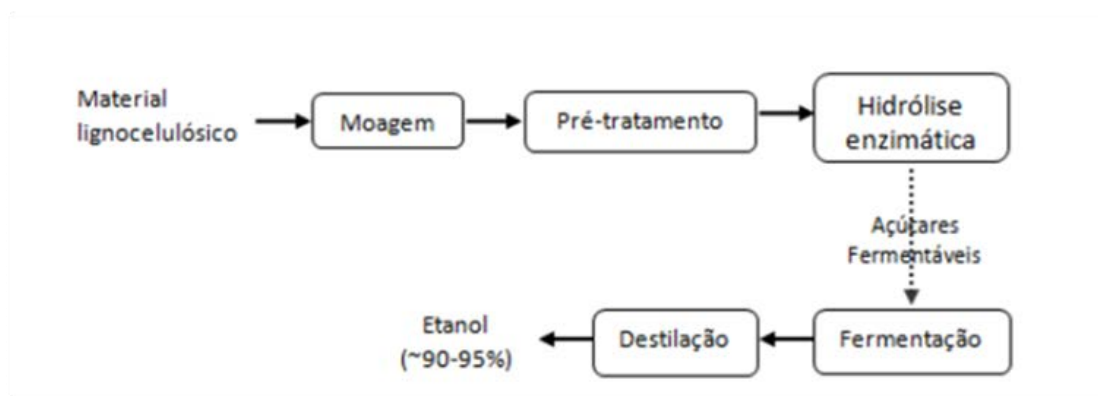
A lignina está geralmente associada à celulose e às hemiceluloses por meio de ligações éter e carbono-carbono. Além disso, o pleno entendimento de suas estruturas e comportamento é fundamental para o sucesso da produção de bioetanol, já que a remoção/alteração da lignina é essencial para a realização da hidrólise enzimática na produção de biocombustíveis a partir de materiais lignocelulósicos. Tal remoção gera a oportunidade de utilizar a lignina em aplicações específicas, como produção de quelantes, de adesivos para madeira, vanilina e ácido gálico (BRIENZO, 2008).

3.7. Produção de Bioetanol

Toda matéria-prima que contenha polissacarídeos é potencialmente utilizável na produção de etanol, embora nem todas sejam economicamente viáveis. Em alguns casos, a matéria-prima utilizada para a produção de etanol é responsável, de modo geral, por até 70% do custo global do processo, sendo de primordial importância a busca de matérias-primas de baixo custo e processos que permitam o maior aproveitamento dessas fontes (MAISTRO; BARROS, 2002). Assim, a grande vantagem da produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos é o baixo custo da matéria-prima.

O processo básico para a produção de etanol a partir de um resíduo lignocelulósico tem início na trituração da biomassa, seguido de um pré-tratamento, hidrólise enzimática para obtenção de açúcares fermentáveis, fermentação microbiana e destilação do álcool obtido (FERREIRA, 2014). A Figura 8 representa as etapas do processo.

Figura 8 – Produção de bioetanol a partir da biomassa vegetal.



Fonte: Oliveira, 2010

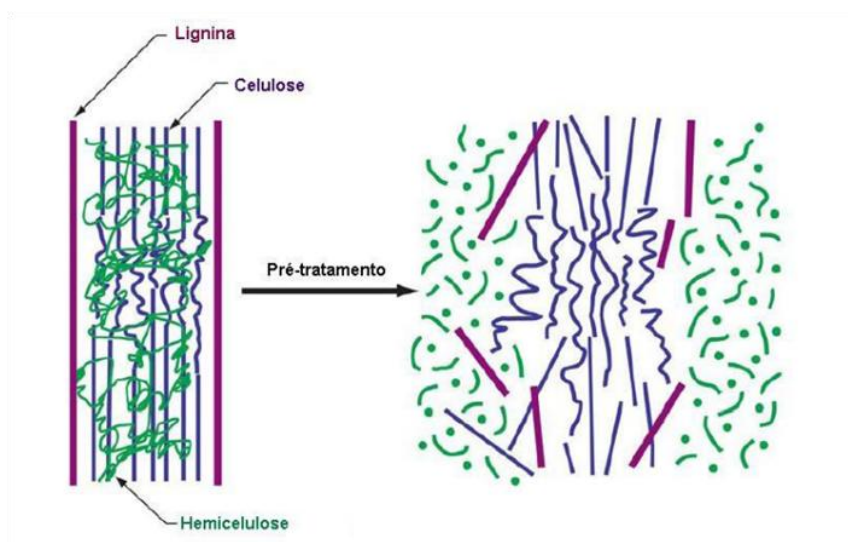
3.7.1. Pré-Tratamento

O pré-tratamento de uma biomassa lignocelulósica consiste em uma das etapas operacionais mais relevantes em termos de custo direto, e influencia indiretamente os custos das etapas anteriores e subsequentes do processo de produção de etanol de segunda geração (RABELO, 2010).

O efeito do pré-tratamento pode ser descrito como o rompimento da matriz da parede celular, incluindo ligações entre os carboidratos e a lignina, assim como a despolimerização e solubilização de hemicelulose, facilitando o acesso de enzimas celulases (SOARES et al., 2009), já que diminui a recalcitrância da biomassa vegetal *in natura* (BRIENZO et al., 2015, 2017; MELATI et al., 2018). Tendo em vista que a presença de hemicelulose e lignina dificulta o acesso das enzimas à celulose, tal tratamento visa expô-la à conversão por tais componentes (OLIVEIRA, 2010). Além disso, o pré-tratamento também tem por objetivo reduzir o grau de cristalinidade da celulose, aumentar a área superficial da biomassa e evitar ou minimizar a formação de compostos inibidores do processo tanto na etapa de hidrólise

quanto na etapa de fermentação (RABELO, 2010). A Figura 9 apresenta uma ilustração do efeito do pré-tratamento na fibra vegetal.

Figura 9 – Efeito do pré-tratamento na estrutura lignocelulósica.



Fonte: Mosier et al., 2005.

Há diversos tipos de pré-tratamento de biomassas lignocelulósicas que, com relação à sua natureza, podem ser classificados como físico, por meio da trituração do material; químico, realizando a deslignificação/modificação por intermédio de ácidos ou bases; biológicos, efetuando a deslignificação pela ação de fungos; ou ainda uma combinação das três anteriores. A escolha das condições de pré-tratamento dependerá de uma avaliação global do processo, disponibilidade de recursos, rendimento e manutenção da integridade dos insumos de interesse e características da biomassa (GALBE; ZACCHI, 2002).

O pré-tratamento por explosão a vapor consiste na descompressão súbita de um sistema pressurizado contendo vapor d'água saturada à elevada pressão e a biomassa vegetal (OLIVEIRA, 2010). Assim, o vapor penetra no material e condensa, formando água líquida dentro das fibras que rompe a estrutura do material (SAAD, 2010). Isso promove a hidrólise dos polissacarídeos, principalmente a hemicelulose, assim como a degradação parcial da lignina (CHEN et al., 2008).

O processo com ácido diluído é utilizado para obter um hidrolisado contendo açúcares fermentáveis, principalmente pentoses (OLIVEIRA, 2010). No Brasil, os reagentes ácidos

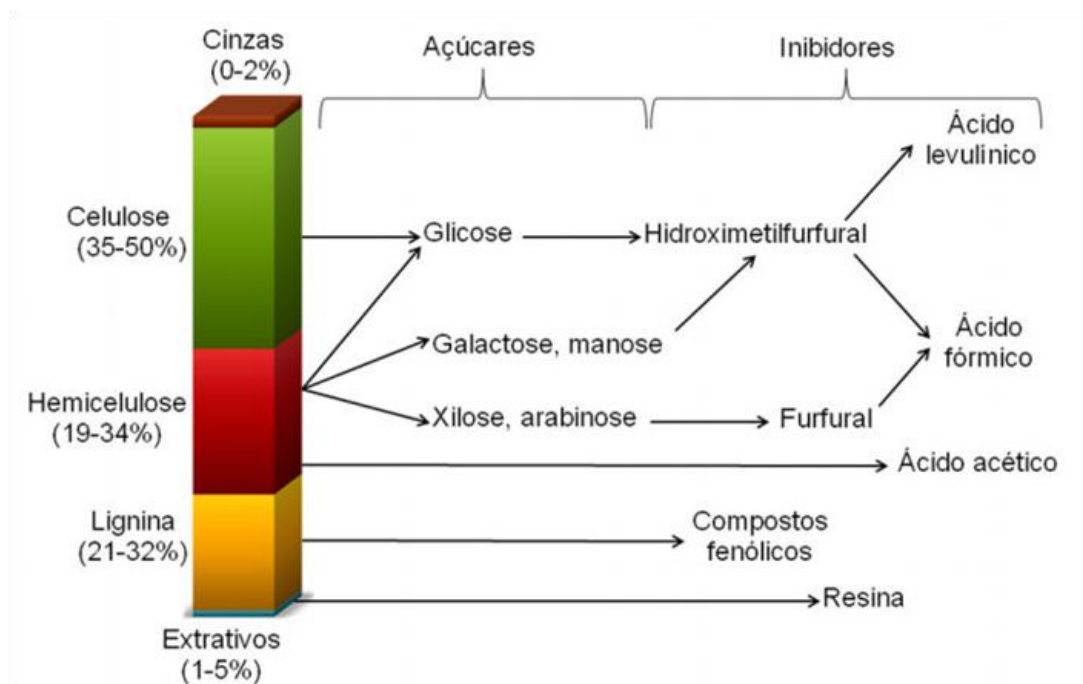
mais utilizados são o sulfúrico (H_2SO_4), clorídrico (HCl) e nítrico (HNO_3), podendo ser concentrados ou diluídos (FERREIRA, 2014), e opta-se por usar ácidos diluídos com o objetivo de evitar problemas como a corrosão dos equipamentos e a alta demanda de energia necessária para a recuperação do ácido. Em tal processo ocorre menor formação de inibidores da fermentação (GALBE; ZACCHI, 2002).

O pré-tratamento alcalino, como a polpação soda, sulfito e organosolv, geralmente é empregado em materiais lignocelulósicos *in natura*, pois estes apresentam uma estrutura morfológica rígida e recalcitrante, necessitando, assim, de condições de reação mais severas (OLIVEIRA, 2010; SANCHEZ; CARDONA, 2008). Sua ação se baseia na clivagem da estrutura da lignina pela saponificação dos grupos ésteres, tornando a fração celulósica mais reativa (GÓMEZ, 1985; MACHADO, 2000).

As condições de pré-tratamento precisam ser minuciosamente estudadas, uma vez que, se o pré-tratamento for muito drástico, pode ocorrer a degradação da fração celulósica, assim como a formação de inibidores da fermentação, como furfural e hidroximetilfurfural; já se for muito brando, não aumenta significativamente a acessibilidade da enzima (SENDELIUS, 2005).

A formação de furfural e hidroximetilfurfural é decorrente da reação de desidratação da xilose e da glicose, respectivamente. Caso ocorra tal formação, é possível realizar um tratamento para remover tais inibidores, aplicando-se, por exemplo, métodos de overlime, eletrodiálise e carvão ativo (OLIVEIRA, 2010). A Figura 10 mostra a procedência de cada um dos inibidores oriundos de diferentes constituintes da biomassa.

Figura 10 – Formação de componentes inibidores durante o pré-tratamento.



Fonte: Rabelo, 2010.

3.7.2. Hidrólise

A hidrólise dos polissacarídeos da biomassa em açúcares fermentáveis pode ser realizada com ácido concentrado, com ácido diluído, ou hidrólise enzimática. Embora a hidrólise ácida seja eficiente e relativamente barata, gera resíduos poluentes e produtos que inibem a posterior fermentação (RABELO, 2007).

A hidrólise com ácido concentrado proporciona a quebra da hemicelulose e da celulose presentes na biomassa. Tal técnica requer equipamentos altamente resistentes à corrosão, já que utiliza soluções aquosas de ácidos minerais fortes, tais como ácido sulfúrico, clorídrico ou fosfórico, em baixas temperaturas. A recuperação do ácido usado no processo é essencial, tanto do ponto de vista econômico quanto pela possibilidade de problemas ambientais (SZENGYEL, 2000).

No processo com ácido diluído, parte da hemicelulose e da celulose são hidrolisadas separadamente, sendo que a hemicelulose hidrolisada pode ser removida, otimizando as condições de degradação. No entanto, em virtude das altas temperaturas aplicadas no

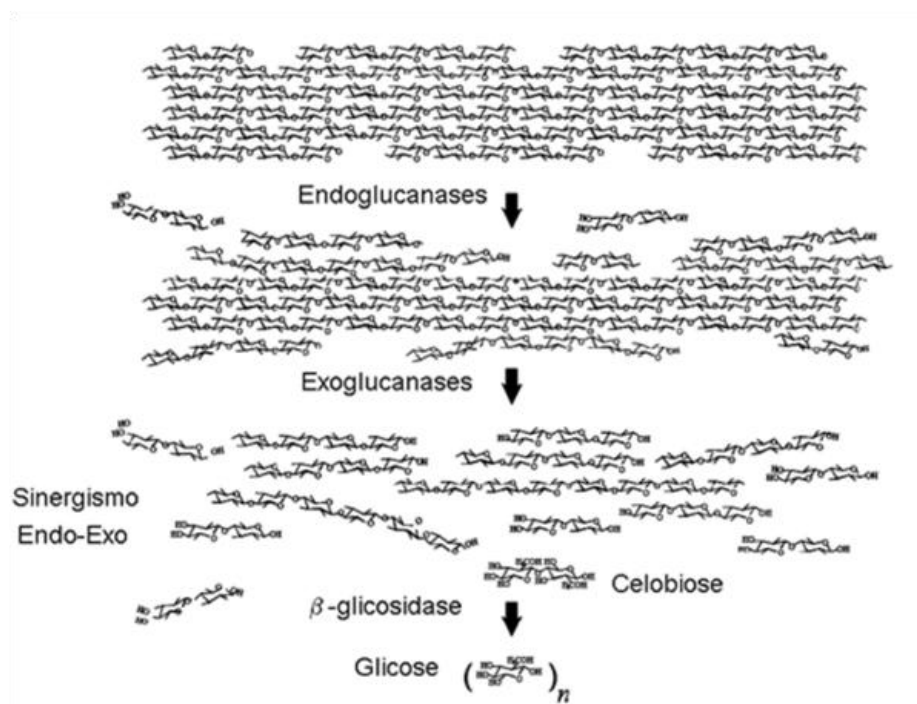
processo, uma quantidade considerável de açúcares pode ser degradada, levando a uma inibição da fermentação (LARSSON et al., 1997).

Já a hidrólise enzimática se mostra economicamente inviável, no entanto oferece a perspectiva de redução de custos no longo prazo, uma vez que é possível se atingirem rendimentos próximos dos estequiométricos e em condições menos críticas de temperatura, pressão e agressividade química, além de o processo ser menos poluente (SZCZODRAK; FIEDUREK, 1996; WYMAN, 1999; RILEY, 2002; LEATHERS, 2003). Ainda assim, é importante ressaltar que as enzimas celulolíticas apresentam baixa atividade específica, da ordem de 10 a 100 vezes menores que a atividade das amilases empregadas na obtenção do etanol a partir de biomassa amilácea (HOWARD et al., 2003).

A hidrólise enzimática é catalisada por enzimas altamente específicas denominadas celulase, que, assim como as demais enzimas, é feita, principalmente, por fungos filamentosos e bactérias cultivados em fermentadores (SALOMÃO, 2017). O papel de tais enzimas é clivar as ligações internas da região amorfa da celulose, promovendo cortes, expondo as extremidades redutoras e não redutoras livres e liberando moléculas de glicose (VILELA, 2013).

As celulasas consistem em um complexo formado por três grupos de enzimas que, agindo conjuntamente, promovem a hidrólise da celulose. Alguns exemplos de enzimas utilizadas são as exo-1,4- β -glucanases, as endo-1,4- β -glucanases e as β -glicosidases, que atuam em diferentes sítios da cadeia celulósica de forma sinérgica: as exoglucanases clivam ligações nas extremidades da cadeia glicosídica, liberando celobiose; as endoglucanases clivam regiões amorfas internas da cadeia celulósica, liberando oligossacarídeos de diversos tamanhos; e as β -glicosidases têm a capacidade de quebrar a celobiose, gerando glicose, como mostra a Figura 11 (DEWAL et al., 2011).

Figura 11 – Modo de ação das celulasas e um sistema enzimático cooperativo de degradação da celulose.



Fonte: Pitarelo, 2007

As ligações de hidrogênio presentes na celulose são responsáveis pela manutenção das regiões cristalinas e tornam a molécula altamente resistente à hidrólise (ZHANG, 2008). Nessa etapa, a remoção da lignina e a quebra da hemicelulose no pré-tratamento são essenciais para permitir o acesso das enzimas. Como a hidrólise enzimática apresenta condições mais suaves durante o processo, menor quantidade de subprodutos é liberada, resultando em um alto rendimento de açúcares fermentáveis (RABELO, 2010). Porém, para atingir uma alta conversão da celulose, é necessário superar alguns desafios para sua viabilidade, como a necessidade de altas concentrações da enzima, o que acaba por aumentar o custo de produção, a necessidade de enzimas de alta eficiência e adaptação e a preparação da matéria-prima (OCTAVIANO, 2011).

É preciso analisar diversas características da biomassa para efetuar a hidrólise enzimática, como quantidade de lignina, presença de grupos acetil, cristalinidade da celulose, grau de polimerização, volume da área superficial/poros da fibra celulose e tamanho da partícula (SEWALT et al., 1997; BRIENZO et al., 2015; MELATI et al., 2018). Assim, é possível determinar a eficácia do processo de hidrólise enzimática por meio de seu rendimento

glicosídico ou da composição química e das características físicas da biomassa após o pré-tratamento. No entanto, tendo em vista que o objetivo da hidrólise é a conversão da celulose em glicose, o primeiro método é mais frequentemente utilizado (RABELO, 2010).

3.7.3. Fermentação

A fermentação inicia-se com a oxidação da glicose em duas moléculas de ácido pirúvico, que são convertidas em duas moléculas de acetaldeído e duas moléculas de CO₂. As moléculas de acetaldeído são então reduzidas por duas moléculas de NADH para formar duas moléculas de etanol, o produto final da fermentação (TORTORA et al., 2005).

A levedura mais apropriada para a realização de tal processo é a *Sacharomyces cerevisiae*, que possui ampla utilização em fermentação industrial e já passou por um processo de seleção natural que resultou nos melhores desempenhos em conversão de glicose em etanol (RABELO, 2010).

Para se atingir um alto rendimento na produção de etanol, é essencial que as pentoses presentes na biomassa também sejam fermentadas, o que implica a utilização de linhagens microbianas capazes de fermentar, além da glicose, demais açúcares presentes na biomassa lignocelulósica, tais como D-xilose, L-arabinose, D-celobiose, galactose e manose (HAHN-HÄGERDAL et al., 2007; BETTINGA et al., 2009).

4 METODOLOGIA

A palha da cana-de-açúcar foi utilizada como matéria-prima lignocelulósica para o desenvolvimento desse projeto. Inicialmente, o material foi seco em estufa a 50°C e triturado em moinho de facas selecionado por peneira de 20 mesh. Uma fração do material foi lavado em soxhlet com etanol e água por períodos de 8 horas contínuas visando à remoção de extrativos da biomassa. Os pré-tratamentos com ácido diluído foram realizados com a biomassa *in natura* e livre de extrativos.

4.1. Pré-Tratamento Ácido Diluído

Foi realizado o pré-tratamento ácido diluído (H_2SO_4), em reator de aço inoxidável com volume de 50 mL, variando-se as condições operacionais como tempo de reação (10, 35 e 60 minutos), temperatura (120, 160 e 180°C) e concentração de ácido (2, 11 e 20%, massa de ácido/massa de material). Após todas as análises, foi realizado um décimo ensaio, utilizando-se a palha moída livre de extrativos, com as condições de pré-tratamento que apresentaram maior efetividade na formação de pseudo-lignina, segundo o software Statistica, com o objetivo de analisar a possibilidade de influência da presença de extrativos em tal formação. Os ensaios e condições de pré-tratamento estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Condições do pré-tratamento ácido diluído em planejamento experimental 2^3 aplicadas à palha de cana-de-açúcar.

Amostra	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Ácido (%)
1	10	120	2
2	10	120	20
3	10	180	2
4	10	180	20
5	60	120	2
6	60	120	20
7	60	180	2
8	60	180	20
9*	35	150	11

*: Ponto central, realizado em triplicata

Foram feitas duplicatas de cada amostra, e triplicata no ponto central, ensaio 9.

Após o pré-tratamento, foi realizada a filtração do material, sendo que a fração líquida foi utilizada para determinar as porcentagens de glicose, xilose e ácido acético, por meio da análise em CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), utilizando coluna Bio-Rad Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm) mantida a 65°C, detector de índice de refração WATERS 2414, fase móvel de H_2SO_4 0,005 M, fluxo de 0,6 mL/min, volume de amostra injetada de 20 μL . Já a fração sólida foi pesada para determinação da recuperação de massa, e utilizada para as análises posteriores.

4.2. Caracterização Química

Foram pesados 300 mg de material em triplicata por cada amostra, previamente seco em estufa a 50°C. Tal massa foi inserida em frascos resistentes à pressão (Figura 12) e então foram adicionados 3 mL de ácido sulfúrico 72% (m/m). Os frascos foram colocados em banho-maria a 30°C por 1 hora, com maceração constante a cada 10 minutos (ABNT NBR 16550, 2016).

Após decorrido o tempo necessário, 84 mL de água de alta pureza foram adicionados ao tubo que, então, foi autoclavado por 1 hora a 121°C. A fração sólida foi separada da líquida por meio de filtração em cadinho com placa sinterizada de porosidade de 16 µm a 20 µm, previamente seco em estufa a 105°C e tarado (ABNT NBR 16550, 2016).

4.2.1. Determinação de lignina solúvel

A fração líquida resultante do processo anterior, obtida por meio da filtração em cadinho, denominada hidrolisada, foi empregada na determinação de carboidratos, ácidos orgânicos, produtos de degradação dos carboidratos (quando for o caso) e lignina solúvel com efeitos dos pré-tratamentos, através do espectofotômetro. Para tal, a fração líquida foi diluída seis vezes e então foi analisada em espectofotômetro de UV-Vis, em 215 nm e 280 nm.

A concentração de lignina solúvel foi calculada, conforme a equação a seguir:

$$C_{LS} = \left[\frac{(4,53 \times A_{215}) - A_{280}}{300} \right] \times fd_{LS}$$

Onde

C_{LS} é a concentração de lignina solúvel no hidrolisado, expressa em gramas por litro (g/L);

A_{215} é o valor de absorbância da amostra a 215 nm;

A_{280} é o valor de absorbância da amostra a 280 nm;

fd_{LS} é o fator de diluição da alíquota do hidrolisado.

Para, então, calcular o teor de lignina solúvel conforme a equação a seguir:

$$LS = \left(\frac{C_{LS} \times V}{MBle_s} \right) \times \left[1 - \left(\frac{Et}{100} \right) \right] \times 100$$

Onde:

LS é o teor de lignina solúvel no bagaço de cana-de-açúcar, em base seca, expresso em porcentagem massa por massa (% m/m);

C_{LS} é a concentração de lignina solúvel na alíquota de hidrolisado diluída, expressa em gramas por litro (g/L);

V é o volume de hidrolisado, expresso em litros (L) e igual a 0,08673 L;

MBle_s é a massa do bagaço, em base seca, livre de extrativos em 5.6.3.3, expressa em gramas (g);

Et é o teor de extrativos totais, expresso em porcentagem massa por massa (% m/m).

4.2.2. Determinação da lignina insolúvel

A fração sólida resultante do processo anterior foi utilizada na determinação de lignina insolúvel. O cadinho com o resíduo insolúvel foi colocado em estufa a $105 \pm 3^\circ\text{C}$, por 24 h e, então, foi transferido para o dessecador pelo tempo necessário para atingir a temperatura ambiente e pesado em balança analítica, até massa constante. Em seguida, foi subtraída desse resultado a massa inicial do cadinho, determinando-se a massa de lignina insolúvel (ABNT NBR 16550, 2016).

4.2.3. Determinação da porcentagem de açúcares

A fração líquida obtida na caracterização química foi utilizada para determinar as porcentagens de celulose e hemicelulose, por meio da análise em CLAE, utilizando coluna Bio-Rad Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm) mantida a 65°C , detector de índice de refração

WATERS 2414, fase móvel de H₂SO₄ 0,005 M, fluxo de 0,6 mL/min, volume de amostra injetada de 20 µL.

4.3. Extração da Pseudo-Lignina

Cerca de 1 g de material pré-tratado, em triplicata, foi transferido para sacos de papel de filtro. A extração foi realizada em Soxhlet por 8 h com uma mistura de *p*-dioxano e água em proporção 9:1. Após secos em estufa a 60°C, os materiais foram pesados.

Assim, a massa de pseudo-lignina foi calculada por meio da diferença entre a massa inicial e a massa após a sua extração, permitindo, então, o cálculo da porcentagem de pseudo-lignina nas amostras.

4.4. Hidrólise Enzimática

As amostras pré-tratadas foram submetidas à hidrólise enzimática para avaliar o rendimento em glicose liberada. Foram feitas triplicatas, para as quais se pesou 0,1 g de amostra, em tubos falcon de 50 mL, e submetidas à hidrólise enzimática utilizando a enzima Cellic Ctec 2, que apresenta uma alta concentração de enzimas glicosídes, em 5 mL de tampão de acetato de sódio 50 mmol/L, pH 4,8. A atividade enzimática utilizada foi 15 FPU/g, em reação a 50°C e agitação constante a 150 RPM em incubadora shaker, por 24 h.

Após a reação, as amostras foram fervidas em banho-maria a 105°C, para desnaturação das enzimas, depois centrifugadas a 3500 RPM por 16 min a 4°C e filtradas em filtro de seringa 0,22 µm. As concentrações de glicose, xilose e arabinose foram determinadas por CLAE, utilizando coluna Bio-Rad Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm) mantida a 65°C, detector de índice de refração WATERS 2414, fase móvel de H₂SO₄ 0,005 M, fluxo de 4 mL/min, volume de amostra injetada de 20 µL.

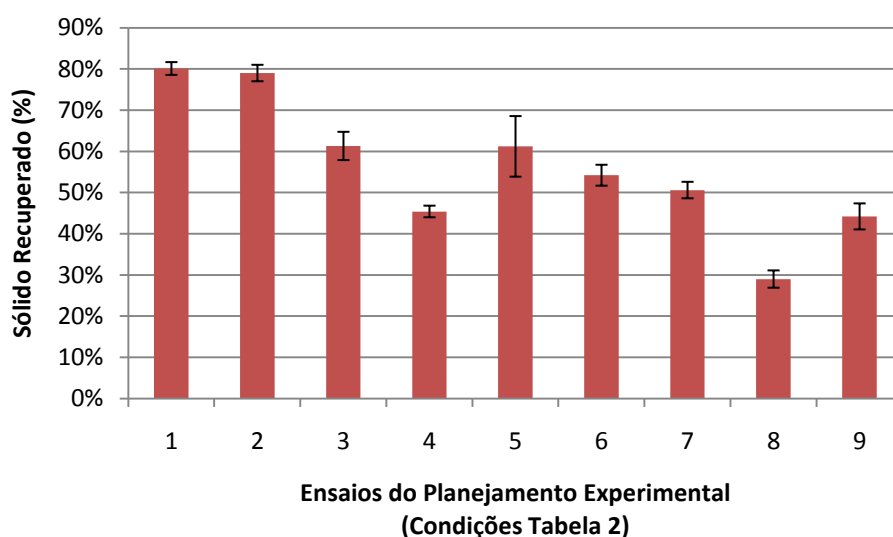
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Pré-Tratamento

A Figura 12 contém informações sobre o sólido recuperado após o pré-tratamento de acordo com suas condições. O sólido recuperado expressa a solubilização de componentes do material após o pré-tratamento, estando diretamente ligado ao aumento da área superficial da biomassa, e foi influenciado pela severidade do pré-tratamento. A recuperação de massa pode ser utilizada como uma avaliação inicial da recalcitrância do material, sendo mais recalcitrante o material que apresentar menor variação na recuperação de massa (BENJAMIN et al., 2013).

Os ensaios que apresentaram maior solubilização de componentes do material, ou seja, com menor porcentagem de recuperação de massa, foram as amostras do ensaio 8, com 29% de sólido recuperado, e ensaio 9, com 44,9% de sólido recuperado.

Figura 12 – Condições de pré-tratamento ácido diluído associadas à recuperação de material após o pré-tratamento.



Já na Tabela 3 é possível observar as porcentagens de glicose, de xilose e de ácido acético presentes na fração líquida após o pré-tratamento, obtidas por meio da análise em CLAE. O teor de glicose, de xilose e de ácido acético expressa a solubilização da celulose e

da hemicelulose, já que são provenientes desses polissacarídeos em função do processo de pré-tratamento.

Tabela 3 – Teores de glicose, xilose e ácido acético na fração líquida após o pré-tratamento ácido-diluído (g/100 g).

Ensaio	Glicose (%)	Xilose (%)	Ácido Acético (%)
1	0,05	0,07	0,07
2	0,03	0,07	0,20
3	0,31	4,00	0,97
4	2,52	4,39	0,95
5	0,18	2,56	0,81
6	0,95	6,68	1,87
7	0,59	2,60	0,51
8	1,27	0,49	0,07
9	0,95	2,24	0,60

O ácido acético está presente no hidrolisado hemicelulósico de materiais lignocelulósicos como consequência da hidrólise dos grupos acetil da hemicelulose, e sua presença é observada à medida que há liberação de xilose (GUO et al., 2008). O ácido acético possui efeito inibitório na produção de bioetanol, pois pode penetrar na membrana da célula, onde se dissocia, liberando um próton e um ânion, que rompem o potencial transmembrana da célula, inibindo a fermentação.

Já em relação ao teor de xilose obtido, este açúcar apresenta-se como o de maior teor resultante da solubilização de polissacarídeos no processo, o que pode ocasionar a formação de inibidores das etapas biológicas subsequentes, como o furfural. Por isso, foi realizada a análise da influência das variáveis do pré-tratamento na porcentagem de xilose obtida, por meio do software Statistica, que demonstrou que nenhum dos parâmetros, sozinho, teve influência direta no teor de xilose. Como é possível ver na Figura 13, a maior influência esteve relacionada à associação entre o tempo e a temperatura do pré-tratamento. Assim, foi possível obter o gráfico de superfície de resposta (Figura 14), que analisa o comportamento do teor de xilose no pré-tratamento de acordo com a temperatura e o tempo de reação.

Figura 13 – Influência das condições de pré-tratamento ácido diluído no teor de xilose.

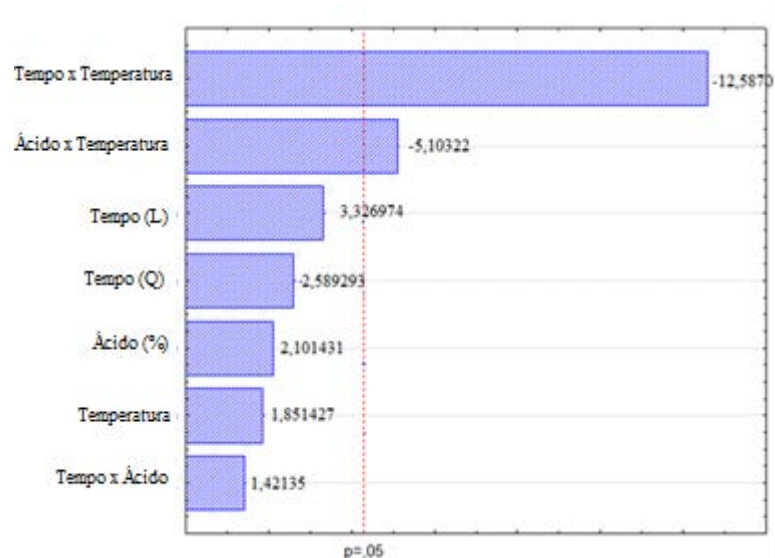
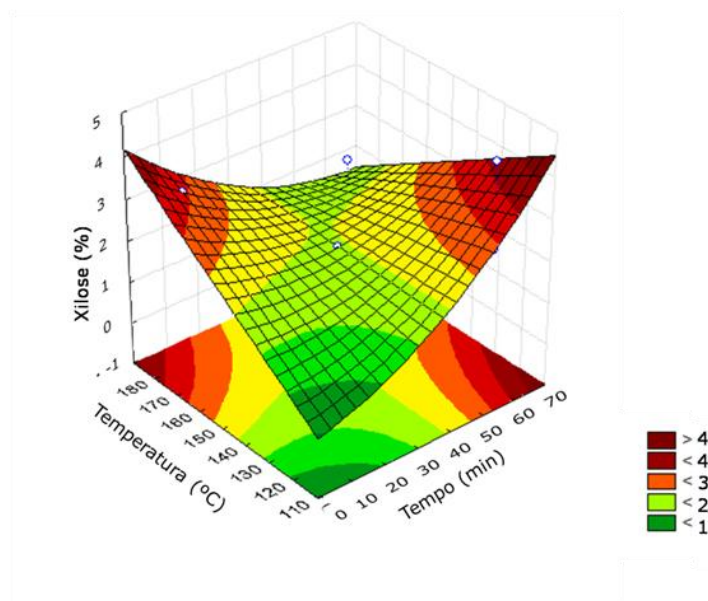


Figura 14 – Gráfico de superfície do comportamento do teor de xilose de acordo com a temperatura e o tempo de reação.



4.2. Caracterização Química

As amostras pré-tratadas foram caracterizadas quanto à sua composição química, quantificando a presença de lignina (soma de lignina solúvel e insolúvel), celulose, xilana e

arabinana após o pré-tratamento. Os resultados da caracterização química estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Composição química do material após o pré-tratamento

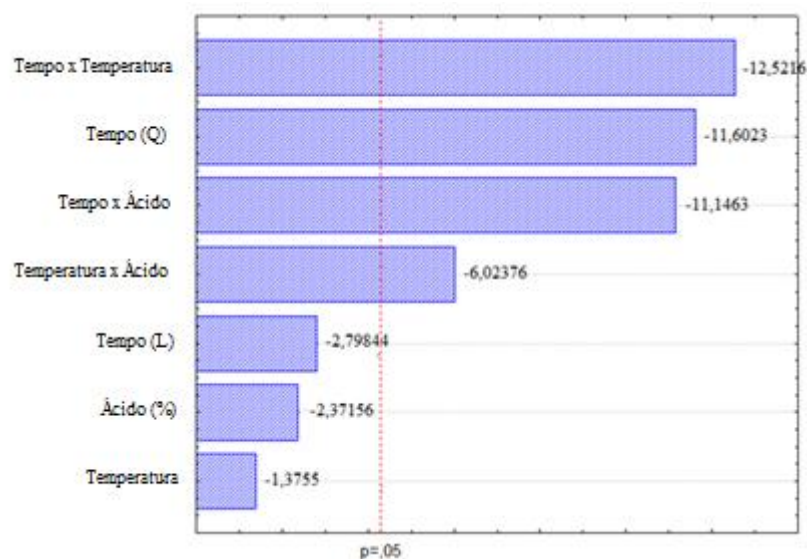
Amostra	Celulose (%)	Hemicelulose		Lignina (%)
		Xilose (%)	Arabinose (%)	
1	35,47	21,16	3,27	29,55
2	39,15	21,26	2,32	31,32
3	41,71	16,18	1,53	32,38
4	56,51	1,94	0,00	43,47
5	45,62	16,05	1,43	29,24
6	49,59	7,58	1,12	33,24
7	49,22	2,68	0,00	35,28
8	16,65	0,00	0,00	75,52
9	53,71	1,81	0,00	40,96

Para amostras de palha de cana-de-açúcar *in natura*, a composição química encontrada foi de 38,1% de celulose, 29,2% de hemicelulose e 26,2% de lignina (SILVA, 2009). Assim, é possível observar que o pré-tratamento ácido diluído teve grande influência na composição desses três constituintes.

Em apenas três das nove amostras as porcentagens de celulose ficaram abaixo das esperadas para o material *in natura*, sendo estas as amostras 1, com 35,5% de celulose, e 8, com 16,7% de celulose. Tendo em vista que a amostra 8 foi aquela com as condições mais severas de pré-tratamento, a baixa concentração de celulose pode expressar uma degradação da fração celulósica pelo ácido sulfúrico.

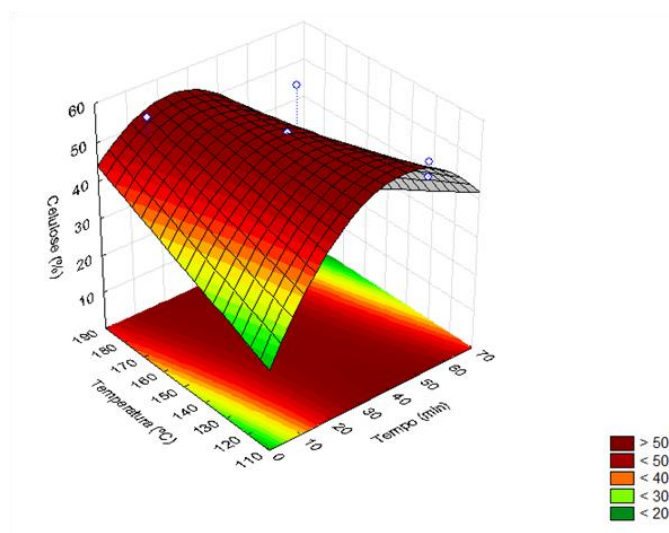
Em relação à celulose, os maiores teores apresentados foram das amostras 4, com 56,5%, e 9, com 53,7%, ressaltando-se que a celulose presente nesta etapa é o polissacarídeo a ser convertido em glicose na hidrólise enzimática, próxima etapa no processo de produção de bioetanol. Por isso, foi realizada uma análise da influência dos parâmetros de pré-tratamento na presença da celulose, por meio do software Statistica. Segundo o gráfico de Pareto (Figura 15), a associação entre tempo e temperatura foi o fator mais determinante na presença de celulose, seguido do tempo de reação.

Figura 15: Influência das condições de pré-tratamento ácido diluído no teor de celulose.



As variáveis tempo e temperatura foram utilizadas no gráfico de superfície de resposta para análise do teor de celulose em função das condições de pré-tratamento (Figura 16).

Figura 16 – Gráfico de superfície de resposta do teor de celulose em função das variáveis temperatura e tempo de reação.

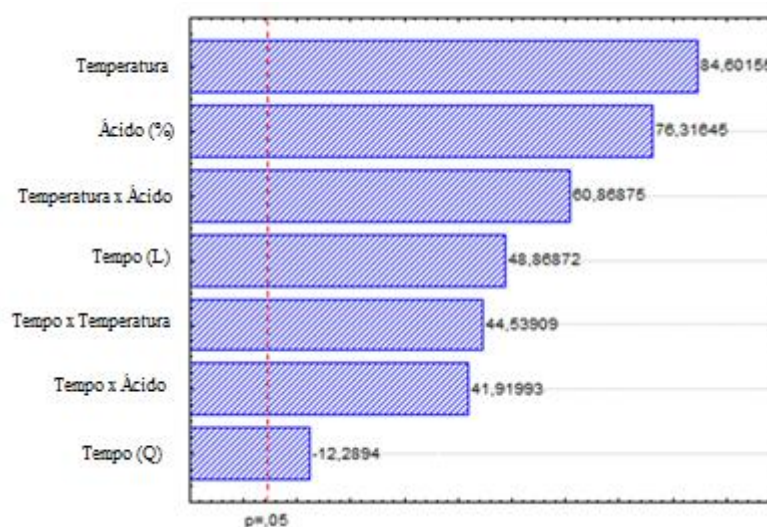


Já em relação à hemicelulose, todas as amostras tiveram seus teores reduzidos pelo pré-tratamento, indicando a ocorrência de despolimerização e solubilização de seus componentes, o que demonstra eficiência na remoção da hemicelulose, como reportado na literatura.

No que concerne à presença de lignina, os pré-tratamentos 1 e 5 foram os que apresentaram menor teor desta macromolécula, ressaltando-se que ambos passaram por pré-tratamentos a 180°C e com 20% de ácido sulfúrico. Já as amostras 8 e 9 foram as que apresentaram maior teor, sendo que a amostra 8 passou pelas condições mais extremas em relação à temperatura (180°C), concentração de ácido (20%) e tempo de reação (60 min). O alto teor de lignina em tal amostra pode ser associado, também, à colubilização/degradação da fração celulósica.

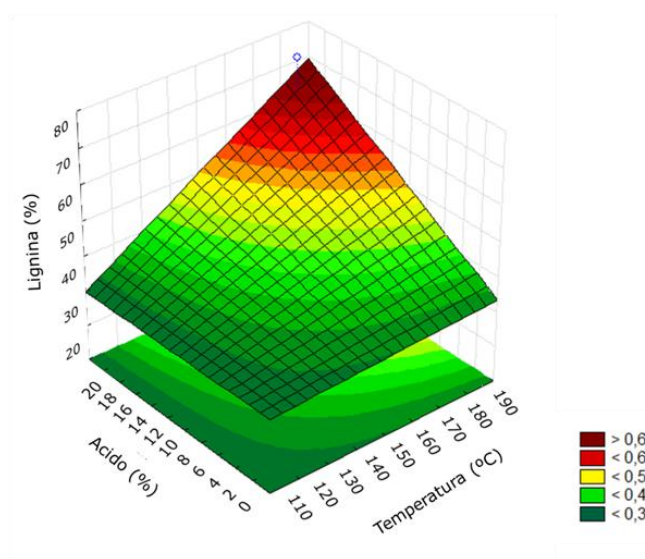
O gráfico de Pareto obtido no software (Figura 17) mostra que todos os parâmetros influenciaram o teor de lignina após o pré-tratamento, sendo que a temperatura e a concentração de ácido foram as mais significativas.

Figura 17 – Influência dos parâmetros do pré-tratamento ácido-diluído no teor de lignina.



Assim, foi possível obter o gráfico de superfície de resposta (Figura 18) que analisa o comportamento do teor de lignina de acordo com tais parâmetros.

Figura 18: Gráfico de superfície de resposta do teor de lignina de acordo com a variação da temperatura e da concentração de ácido.



4.3. Extração de Pseudo-Lignina

A extração da pseudo-lignina permitiu determinar a formação deste composto durante o pré-tratamento, formação esta que ocorre por meio da desidratação de polissacarídeos catalizada pelo ácido, seguida de fragmentação, rearranjo e policondensação ou polimerização com fragmentos de lignina (HU et al., 2012). A Tabela 5 apresenta os teores de pseudo-lignina em cada amostra.

Tabela 5 – Teor de pseudo-lignina formada durante o pré-tratamento ácido diluído em um planejamento experimental 2^3 .

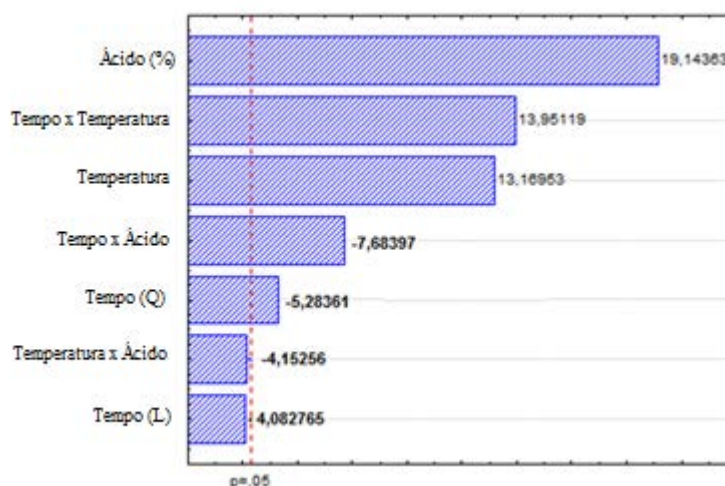
Amostra	Pseudo-lignina (%)
1	8,48
2	23,52
3	13,63
4	17,81
5	11,64
6	13,29
7	18,90
8	25,46
9	18,41

As amostras com maiores teores de formação de pseudo-lignina foram a amostra 2, com 23,52%, e a amostra 8, com 25,46%. A amostra 8, cujo pré-tratamento apresentou as condições mais severas, foi, portanto, a de maior formação de pseudo-lignina. É importante ressaltar que a pseudo-lignina pode ser formada a partir de produtos de degradação de carboidratos (furfural e hidroximetilfurfural), sem contribuição da lignina, durante o pré-tratamento ácido, especialmente sob condições altamente severas de pré-tratamento (SANNIGRAHI et al., 2011).

Nota-se que os pré-tratamentos 1 e 5 foram os que apresentaram menor teor de pseudo-lignina, podendo-se ressaltar que a amostra 1 passou pelas condições mais amenas em relação à temperatura (120°C), concentração de ácido (2%) e tempo de reação (10 min).

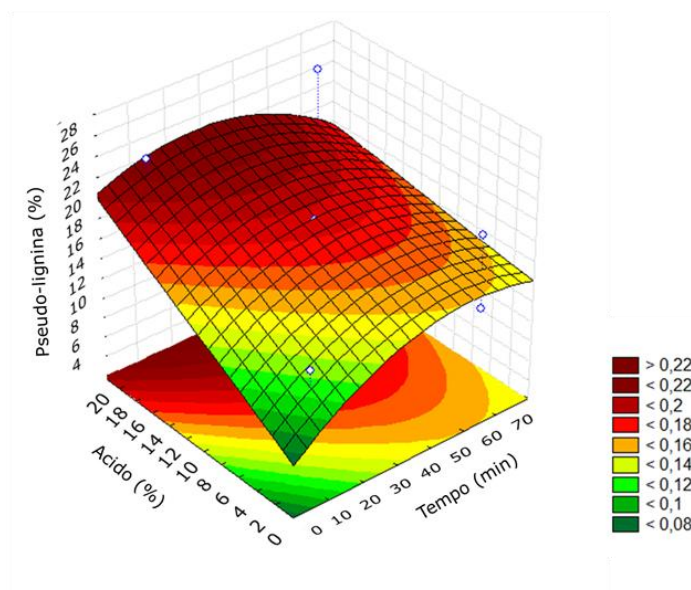
De acordo com o gráfico de Pareto (Figura 19), nem todos os parâmetros tiveram influência na formação da pseudo-lignina, sendo que os de maior significância foram a porcentagem de ácido e a associação entre temperatura e tempo.

Figura 19 – Influência dos parâmetros do pré-tratamento ácido diluído no teor de pseudo-lignina.



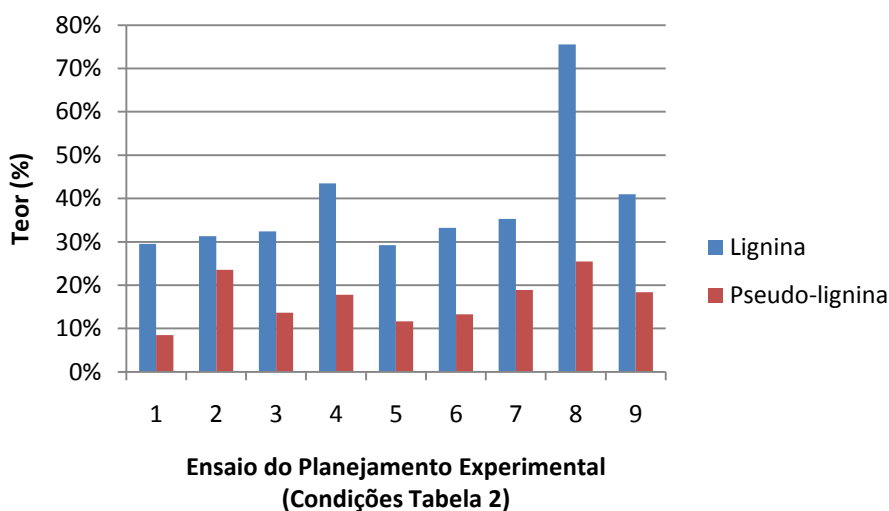
Assim, foi possível obter o gráfico de superfície de resposta (Figura 20) que analisa o comportamento da presença de pseudo-lignina de acordo com a concentração de ácido e o tempo de pré-tratamento.

Figura 20 – Gráfico de superfície do comportamento do teor de pseudo-lignina de acordo com a variação do tempo e da concentração de ácido.



Observou-se uma relação entre o teor de lignina e de pseudo-lignina após o pré-tratamento ácido diluído (Figura 21), indicando que a formação de pseudo-lignina não causou redução no teor de lignina, já que os ensaios com maiores teores de lignina, apresentaram, também, os maiores teores de pseudo-lignina. Assim, pode-se concluir que a pseudo-lignina foi formada a partir de produtos de degradação de carboidratos (furfural e hidroximetilfurfural), sem contribuição da lignina, durante o pré-tratamento ácido.

Figura 21 – Relação entre os teores de lignina e pseudo-lignina em cada ensaio após o pré-tratamento ácido diluído.



4.4. Hidrólise Enzimática

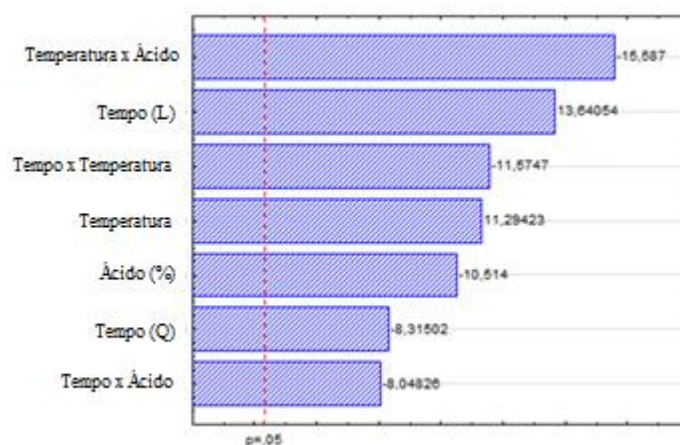
Os resultados da análise em CLAE, após a realização da hidrólise enzimática, mostram a quantidade de glicose gerada pela hidrólise da celulose a partir da ação das enzimas em tal etapa. Tais resultados podem ser observados na Tabela 6.

Tabela 6 – Concentração de glicose gerada após a hidrólise enzimática, determinada por CLAE.

Amostra	Concentração (g/L)	Concentração (%)
1	2,593	12,9
2	2,745	13,7
3	7,307	36,5
4	6,267	31,3
5	6,372	31,8
6	8,047	40,2
7	11,339	56,7
8	2,979	14,9
9	7,13	35,7

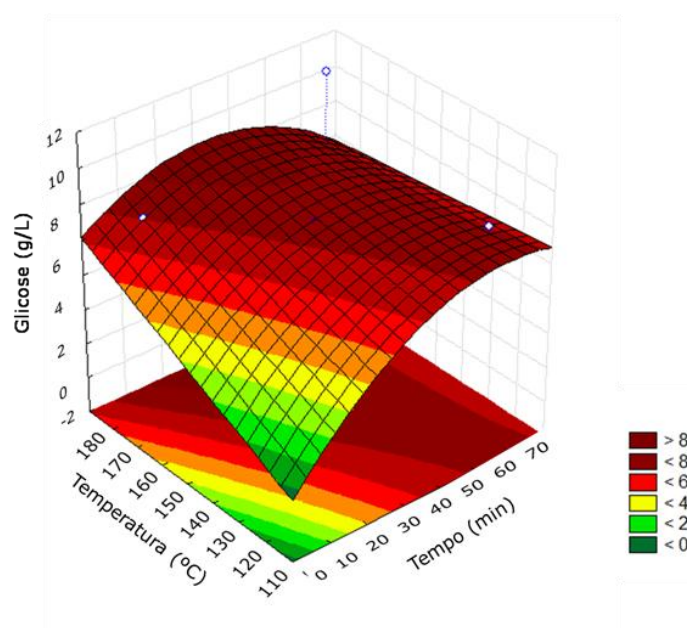
Segundo o gráfico de Pareto (Figura 22), todos os parâmetros apresentaram significância no teor de glicose, sendo que o tempo e a associação entre concentração de ácido e temperatura da reação foram os mais determinantes.

Figura 22 – Influência dos parâmetros do pré-tratamento no rendimento de glicose após a hidrólise enzimática.



Assim, foi possível obter o gráfico de superfície de resposta (Figura 23) que analisa o comportamento da geração de glicose de acordo com a temperatura e o tempo de reação pré-tratamento. Deste modo, observam-se as condições de pré-tratamento que modificam a biomassa, provavelmente reduzindo sua recalcitrância, aumentando o rendimento em glicose na hidrólise enzimática.

Figura 23 – Gráfico de superfície de resposta do rendimento de glicose na hidrólise enzimática com a variação do tempo e da temperatura no pré-tratamento ácido diluído.



As duas amostras com menor rendimento de glicose foram as amostras 1 (10 minutos de pré-tratamento, a 120°C e com 2% de ácido sulfúrico) e 2 (10 minutos de pré-tratamento, a 120°C e com 20% de ácido sulfúrico), sendo que ambas estão entre os parâmetros mais brandos de pré-tratamento, além de terem apresentado dois dos três menores teores de celulose. Tais amostras também apresentaram os maiores teores de xilose e arabinose, podendo-se concluir que tais componentes funcionaram como inibidores/dificultadores da hidrólise enzimática.

Já a amostra 8 apresentou um dos menores rendimentos de glicose, com 1,49%. Deve-se levar em conta que essa amostra também exibiu a maior porcentagem de lignina, com 75,5%, e a menor porcentagem de celulose, com 16,6%. Amostras com maior conteúdo de lignina provocam maior adsorção improdutiva de enzimas; quando não retirada, a lignina pode passar por redeposição em superfícies de celulose e ocupar poros antes acessíveis (WONG et al., 1988)

4.5. Amostra Livre de Extrativos

Após todas as análises, foi realizado o pré-tratamento com a amostra livre de extrativos, utilizando-se os parâmetros que, segundo o software Statistica, apresentaram maior formação de pseudo-lignina. Portanto, a amostra livre de extrativos passou por um pré-tratamento de 60 min, com 20% de ácido sulfúrico a 180 °C, seguido da caracterização química, da extração da pseudo-lignina e da hidrólise enzimática com a biomassa resultante. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7 – Resultados das análises realizadas com a amostra livre de extrativos.

Etapa	Fator	Resultado
Pré-Tratamento	Sólido Recuperado	36,40%
Caracterização Química	Celulose	36,50%
Caracterização Química	Hemicelulose	0%
Caracterização Química	Lignina Total	56,40%
Extração da Pseudo-Lignina	Pseudo-Lignina	19,81%
Hidrólise Enzimática	Rendimento em Glicose	31,80%

A amostra livre de extrativos apresentou uma baixa recuperação de massa após o pré-tratamento, indicando uma alta solubilização de seus componentes, aumento da sua área superficial e diminuição de sua recalcitrância. Em relação às amostras com extrativos, tal ensaio apresentou a segunda menor recuperação de massa.

Os teores de celulose e de hemicelulose da amostra livre de extrativos apresentaram uma redução quando comparados com a biomassa da palha da cana-de-açúcar *in natura* sem a realização de um pré-tratamento, além de estarem entre os menores teores dentre os ensaios do presente projeto. Já o teor de lignina apresentou um aumento em relação à biomassa *in natura*, estando entre os maiores do projeto.

Em relação à formação da pseudo-lignina, a amostra livre de extrativos apresentou uma das maiores formações do estudo, resultado já esperado, tendo em vista que foram utilizados parâmetros de pré-tratamento com tal objetivo. Segundo os gráficos de superfície, para os parâmetros utilizados, seria esperada uma formação de pseudo-lignina entre 22% e 24%, portanto, os resultados encontrados estão na faixa do valor previsto.

5. CONCLUSÃO

O aumento da severidade dos pré-tratamentos resultou em menor porcentagem de massa recuperada das amostras, indicando a remoção de componentes da biomassa. Tal perda de massa pode ser relacionada à baixa porcentagem de hemicelulose e/ou celulose, o que indica sua solubilização/degradação.

Em relação ao teor de celulose presente após o pré-tratamento, foi possível observar aumento em relação à amostra *in natura* em quase todas as amostras. O baixo teor de celulose obtido pela amostra 8 (16,7%) pode ser associado à sua solubilização/degradação em virtude das condições extremas de pré-tratamento. Já os altos teores de celulose nas amostras 4 (56,5%) e 9 (53,7%) podem ser relacionados aos baixos teores de hemicelulose. O teor de lignina de todas as amostras apresentou um aumento, em porcentagem, após o pré-tratamento em todas as amostras, quando comparado ao teor das amostras *in natura*.

Observou-se relação direta entre a formação de pseudo-lignina e as condições de pré-tratamento, podendo-se perceber que, em amostras com o mesmo tempo de reação e

temperatura, aquela com maior porcentagem de ácido (20%) apresentou maior formação de pseudo-lignina.

Para o rendimento em glicose após a hidrólise enzimática, foi possível concluir que as amostras com variáveis mais brandas de pré-tratamento e menores teores de celulose apresentaram os menores rendimentos. Por outro lado, as amostras com os maiores rendimentos de glicose foram aquelas submetidas a severidade intermediária em suas condições de pré-tratamento. As amostras com maiores formações de pseudo-lignina (ensaios 2 e 8) estiveram entre as que apresentaram menor rendimento em glicose após a hidrólise enzimática, indicando que há, de fato, um fator de inibição por parte da pseudo-lignina.

Os resultados obtidos no presente projeto têm potencial para serem utilizados como base em futuras pesquisas na produção de bioetanol através da palha de cana-de-açúcar, já que foi possível encontrar parâmetros e condições de pré-tratamento ácido diluído que podem diminuir a formação de pseudo-lignina e, conseqüentemente, aumentar o rendimento em glicose após a hidrólise enzimática.

Referências Bibliográficas

- ALMEIDA, M. B. B. **Bio-óleo a partir da pirólise rápida, térmica ou catalítica, da palha da cana-de-açúcar e seu co-processamento com gás-óleo em craqueamento catalítico**. 2008. 149f. Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.
- ARANTES, V., SADDLER, J. N. Acces to cellulose limits the efficiency of enzymathic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n. 4. Disponível em www.biotechnologyforbiofuels.com/content/3/1/4. Acesso em fevereiro de 2019.
- ASSOCIAÇÃO DOS PRODUTORES DE BIOENERGIA DO MATO GROSSO DO SUL (BIOSUL). **Acompanhamento da Safra 2018/2019**. Disponível em: http://www.biosulms.com.br/_arquivos/resultado/4156157535c1d5078e19a02.57278994.pdf. Acesso em: 9 ago. 2016.
- BALOGH, D. T. **Efeito de solvente na obtenção de ligninas pelo processo organosolv**. 1989. 110p. Dissertação de Mestrado – Instituto de Física e Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1989.
- BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL (BRASIL). CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS. **Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável**. 1 ed. Rio de Janeiro: Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social, 314 p, 2008.
- BENJAMIN, Y., CHENG, H., GÖRGENS, J. F. (2013). Evaluation of bagasse from different varieties of sugarcane by dilute acid pretreatment and enzymatic hydrolysis. **Industrial Crops and Products**, 51, 7–18.doi:10.1016/j.indcrop.2013.08.067
- BETTIGA, M., HAHN-HÄGERDAL, B., & GORWA-GRAUSLUND, M. F. (2008). Comparing the xylose reductase/xylitol dehydrogenase and xylose isomerase pathways in arabinose and xylose fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Biotechnology for Biofuels**, 1(1), 16.doi:10.1186/1754-6834-1-16.
- BINOD, P., SINDHU, R., SINGHANIA, R. R., VIKRAM, S., DEVI, L., NAGALAKSHMI, S., PANDEY, A. (2010). Bioethanol production from rice straw: An overview. **Bioresource Technology**, 101(13), 4767–4774.doi:10.1016/j.biortech.2009.10.079.

BRIENZO M, ABUD Y, FERREIRA S, CORRALES RCNR, FERREIRA-LEITÃO VS, DE SOUZA W, SANT'ANNA C. Characterization of anatomy, lignin distribution, and response to pretreatments of sugarcane culm node and internode. *Industrial Crops and Products*, 2016.

BRIENZO, M., ABUD, Y., FERREIRA, S., CORRALES, R. C. N. ., FERREIRA-LEITÃO, V. S., SOUZA, W. de, e SANT'ANNA, C. (2016). Characterization of anatomy, lignin distribution, and response to pretreatments of sugarcane culm node and internode. **Industrial Crops and Products**, 84, 305–313.doi:10.1016/j.indcrop.2016.01.039

BRIENZO, M., FERREIRA, S., VICENTIM, M. P., DE SOUZA, W., & SANT'ANNA, C. (2014). Comparison Study on the Biomass Recalcitrance of Different Tissue Fractions of Sugarcane Culm. **BioEnergy Research**, 7(4), 1454–1465. doi:10.1007/s12155-014-9487-8.

BRIENZO, M., FIKIZOLO, S., BENJAMIN, Y., TYHODA, L., & GÖRGENS, J. (2017). Influence of pretreatment severity on structural changes, lignin content and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse samples. **Renewable Energy**, 104, 271–280.doi:10.1016/j.renene.2016.12.037.

CARVALHO, W., CANILHA, L., FERRAZ, A., & MILAGRES, A. M. F. (2009). Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Química Nova**, 32(8), 2191–2195.doi:10.1590/s0100-40422009000800033.

CHEN, H., HAN, Y., & XU, J. (2008). Simultaneous saccharification and fermentation of steam exploded wheat straw pretreated with alkaline peroxide. **Process Biochemistry**, 43(12), 1462–1466.doi:10.1016/j.procbio.2008.07.003.

CORDEIRO, G. M., ELIOTT, F., MCINTYRE, C. L., CASU, R. E., & HENRY, R. J. (2006). Characterisation of single nucleotide polymorphisms in sugarcane ESTs. **Theoretical and Applied Genetics**, 113(2), 331–343.doi:10.1007/s00122-006-0300-8.

DEMİRBAŞ, A. (2003). Fuel Conversional Aspects of Palm Oil and Sunflower Oil. **Energy Sources**, 25(5), 457–466.doi:10.1080/00908310390142451.

DESWAL, D., KHASA, Y. P., & KUHAD, R. C. (2011). Optimization of cellulase production by a brown rot fungus *Fomitopsis* sp. RCK2010 under solid state fermentation. **Bioresource Technology**, 102(10), 6065–6072.doi:10.1016/j.biortech.2011.03.032.

FENGEL, D.; WEGENER (1984). G. **Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions**, Berlin and New York. Holz Als Roh- Und Werkstoff, 42(8), 314–314.doi:10.1007/bf02608943

FERREIRA, F. N. A., FERREIRA, W. M., MOTA, K. C. D. N., SILVA NETA, C. S., LARA, L. B., & SANTOS, E. A. D. (2015). avaliação nutricional do bagaço de cana-de-açúcar enriquecido com vinhaça em dietas para coelhos em crescimento. **Revista Caatinga**, 28(4), 217–226. doi:10.1590/1983-21252015v28n424rc.

FERREIRA, V. F., ROCHA, D. R. da, & SILVA, F. de C. DA. (2009). Potencialidades e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares. **Química Nova**, 32(3), 623–638. doi:10.1590/s0100-40422009000300007.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **Countries by commodity: 2017**. Disponível em: http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity Acesso em: 12 fev. 2019.

FUKUDA, H.; KONDOB, A.; TAMALAMPUDIA, S. Bioenergy: sustainable fuels from biomass by yeast and fungal whole-cell. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p.2–12, 2009.

GALBE, M., & ZACCHI, G. (2002). A review of the production of ethanol from softwood. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 59(6), 618–628.doi:10.1007/s00253-002-1058-9.

GIBSON, L. J. (2012). The hierarchical structure and mechanics of plant materials. **Journal of The Royal Society Interface**, 9(76), 2749–2766.doi:10.1098/rsif.2012.0341.

GÓMEZ, R . J. H. C. **Sacarificação de hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar e sua fermentação por *Pachysolen tannophilus***. 1985. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola. UNICAMP, 1985.

GOVENDER, M., BUSH, T., SPARK, A., BOSE, S. K., & FRANCIS, R. C. (2009). An accurate and non-labor intensive method for the determination of syringyl to guaiacyl ratio in lignin. **Bioresource Technology**, 100(23), 5834–5839.doi:10.1016/j.biortech.2009.06.009.

GUO, G., CHEN, W., CHEN, W., MEN, L., & HWANG, W. (2008). Characterization of dilute acid pretreatment of silvergrass for ethanol production. **Bioresource Technology**, 99(14), 6046–6053.doi:10.1016/j.biortech.2007.12.047.

HAHN-HAGERDAL, B.; KARHUMA, K.; FONSECA, C.; SPENCER-MARTINS, I; GORWA-GRAUSLUND. M. Toward Industrial Pentose-Fermenting Yeast Strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 64, issue 5, pp. 937-953, 2007.

HO, N. W. Y., CHEN, Z., BRAINARD, A. P., et tal. **Successful design and development of genetically engineeres Saccharomyces yeasts for effective co fermentation of glucose and xylose from cellulosic biomass to fuel ethanol.** In: Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. Vol 65, pp. 163 – 192. Berlin: Springer – Verlag, 1999.

HOWARD, R. L., ABOTSI, E., JANSEN, VAN R. E. L., & HOWARD, S. (2003). Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. **African Journal of Biotechnology**, 2(12), 602–619.doi:10.5897/ajb2003.000-1115 .

HU, F., JUNG, S., & RAGAUSKAS, A. (2012). Impact of Pseudolignin versus Dilute Acid-Pretreated Lignin on Enzymatic Hydrolysis of Cellulose. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, 1(1), 62–65. doi:10.1021/sc300032j.

HU, F., JUNG, S., & RAGAUSKAS, A. (2012). Pseudo-lignin formation and its impact on enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, 117, 7–12.doi:10.1016/j.biortech.2012.04.037.

HU, F.; RAGAUSKAS, A. **Suppression of Pseudo-Lignin Formation Under Diluted Acid Pretreatment Conditions.** Rsc Adv. 4:4317, 2014.

INSTITUTO CUBANO DE INVESTIGACIONES DE LOS DERIVADOS DE LA CANÑA DE AZUCAR (ICIDCA). **Manual de los derivados de la canã de azucar.** México: CEPLACEA, 447p, 1990.

JEDVERT, K., & HEINZE, T. (2017). Cellulose modification and shaping – a review. **Journal of Polymer Engineering**, 37(9).doi:10.1515/polyeng-2016-0272.

JÖNSSON, L. J., ALRIKSSON, B., & NILVEBRANT, N.-O. (2013). Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. **Biotechnology for Biofuels**, 6(1), 16.doi:10.1186/1754-6834-6-16.

JUSBRASIL - **Lei 11241/02 | Lei nº 11.241**, de 19 de setembro de 2002. Disponível em: <<https://www.jusbrasil.com.br/topicos/10797062/lei-n-11241-de-19-de-setembro-de-2002-de-sao-paulo/legislacao>>. Acesso em 13/02/2019.

LARSSON, P. T., WICKHOLM, K., & IVERSEN, T. (1997). A CP/MAS¹³C NMR investigation of molecular ordering in celluloses. **Carbohydrate Research**, 302(1-2), 19–25. doi:10.1016/s0008-6215(97)00130-4.

LEATHERS, T. (2003). Bioconversions of maize residues to value-added coproducts using yeast-like fungi. **FEMS Yeast Research**, 3(2), 133–140. doi:10.1016/s1567-1356(03)00003-5.

LEE, J. (1997). Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology**, 56(1), 1–24. doi:10.1016/s0168-1656(97)00073-4.

LE MOS, J.L.S. **Estudo da produção de xilanases por *Aspergillus awamori* em bagaço de cana**. Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químico e Bioquímicos. Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2001.

LEWIN, M.; GOLDSTEIN, J. S. **Wood structure and composition**. 1991. 512 S., 164 Abb., 32 Tab., Marcel Dekker Inc., Nova York, 1991.

LORENCINI, P. **Otimização do Pré-tratamento Ácido de Bagaço de Cana para a sua Utilização como Substrato na Produção Biológica de Hidrogênio**. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Programa de Pós-Graduação em Química, 2013.

MACHADO, G. O. **Preparação e caracterização de CMC e CMC Grafitizada**. 2000. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos, 2000.

MAISTRO, M. C., & BARROS, G. S. de C. (2003). Relações comerciais e de preços no mercado nacional de combustíveis. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, 41(4), 829–858. doi:10.1590/s0103-20032003000400006.

MARABEZEI, Karen. **Estudo sistemático das reações envolvidas na determinação dos teores de lignina e holocelulose em amostras de bagaço e palha de cana-de-açúcar**. 2009. Dissertação (Mestrado em Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009. doi:10.11606/D.75.2009.tde-07102009-100309. Acesso em: 2019-02-11.

MATSUOKA, S.; BRESSIANI, J.; MACCHERONI, W.; FOUTO, I. **Sugarcane: Agricultural Production, Bioenergy and Ethanol**. pp. 383-405 Published by Elsevier Inc, 2015.

MELATI, R. B., SHIMIZU, F. L., OLIVEIRA, G., PAGNOCCA, F. C., de SOUZA, W., SANT'ANNA, C., & BRIENZO, M. (2018). Key Factors Affecting the Recalcitrance and Conversion Process of Biomass. **BioEnergy Research**. doi:10.1007/s12155-018-9941-0.

MORAIS, S.A.L.; NASCIMENTO, E.A.; MELO, D.C. **Chemical analysis of Pinus oocarpa wood PARTE I – quantification of macromolecular components and volatile extractives**. Revista Árvore, v. 29, n. 3, p. 461-470, 2005.

MOREIRA, J. R. (2000). Sugarcane for energy – recent results and progress in Brazil. **Energy for Sustainable Development**, 4(3), 43–54. doi:10.1016/s0973-0826(08)60252-5.

MOSIER, N. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, 96(6), 673–686. doi:10.1016/j.biortech.2004.06.025.

O'SULLIVAN, A. C. (1997). **Cellulose**, 4(3), 173–207. doi:10.1023/a:1018431705579.

OCTAVIANO, C. **Hidrólise enzimática para produção do etanol volta ao palco**. JornalCana, São Paulo, junho 2011.

OLIVARES, E. G.; CORTEZ, L. A. B.; ROCA, G. A. A.; BROSSARD, L. E.; **Resumos do 7o Congresso Internacional Sobre Geração Distribuída e Energia no Meio Rural – Semiárido, Energia e Desenvolvimento Sustentável – Agrener, Anais, Brasil, 2008**.

OLIVEIRA, F. M. V. **Avaliação de Diferentes Pré-Tratamentos e Deslignificação Alcalina na Sacarificação da Celulose de Palha de Cana**. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de Lorena, 2010.

OLIVEIRA, Luís Ricardo Martins. **Estudo de alternativas de pré-tratamento e hidrólise do bagaço e palha de cana-de-açúcar para obtenção de etanol a partir de celulose**. 2012. Tese (Doutorado em Conversão de Biomassa) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2012.

PARAJÓ, J. C., DOMÍNGUEZ, H., & DOMÍNGUEZ, J. (1998). Biotechnological production of xylitol. Part 3: Operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. **Bioresource Technology**, 66(1), 25–40. doi:10.1016/s0960-8524(98)00037-6.

PITARELO, A. P. **Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha de cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática**. Dissertação de mestrado - UFPR, Curitiba-PR (2007) p. 142

RABELO, S. C.; **Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração.** Tese de Doutorado – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química 2010. 447 p, 2010.

RABELO, S.R.; **Avaliação de desempenho do pre-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar.** 2007. 180p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, SP, 2007.

RASMUSSEN, H., SØRENSEN, H. R., & MEYER, A. S. (2014). Formation of degradation compounds from lignocellulosic biomass in the biorefinery: sugar reaction mechanisms. **Carbohydrate Research**, 385, 45–57.doi:10.1016/j.carres.2013.08.029.

RIBEIRO, E. A. M. Caracterização de membranas assimétricas de acetato de celulose produzidas a partir do aproveitamento do resíduo da palha de milho para uso em ultrafiltração. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 37, n. 3, p. 385-391, 2014.

RILEY, C., Bioethanol: A Renewable Transportation Fuel from Biomass, **AIChE Spring Conference**, 2002.

SAAD, M. B. W. **Avaliação técnica e econômica preliminar da produção de etanol via hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar.** 2010. 138p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2010.

SALOMAO, G. S. B. **Análise da produção de celulases por fungos utilizando bagaço de cana como substrato.** Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Espírito Santo, Instituto de Energia, São Mateus, ES, 2017.

SÁNCHEZ, Ó. J., & CARDONA, C. A. (2008). Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, 99(13), 5270–5295.doi:10.1016/j.biortech.2007.11.013.

SANNIGRAHI, P., KIM, D.H., JUNG, S., RAGAUSKAS, A., 2011. c. **Energy & Environmental Science** 4, 1306-1310.

SANT'ANNA, C., et al., **The Influence of the Heterogeneity, Physicochemical and Structural Properties on the Recalcitrance and Conversion of Sugarcane Bagasse.** In: **Sugarcane:**

Production, Consumption and Agricultural Management Systems. 1 ed.: Nova Science Publishers, p. 1-33, 2014.

SANTOS, D. S. **Produção de Etanol de Segunda Geração por *Zymomonas mobilis* Naturalmente Ocorrente e Recombinante, Empregando Biomassa Lignocelulósica.** Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa de PósGraduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2012.

SANTOS, F. A., QUEIRÓZ, J. H. DE, COLODETTE, J. L., FERNANDES, S. A., GUIMARÃES, V. M., & REZENDE, S. T. (2012). Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, 35(5), 1004–1010.doi:10.1590/s0100-40422012000500025.

SANTOS, P.S.B.; SOARES, A.K.; FUENTES, S.; LABIDI, J.; GATTO, D.A.; **Caracterização da lignina obtida da madeira de diferentes espécies por meio do processo organosolv.** Revista Ciência da Madeira - RCM. 6. 237-243. 10.12953/2177-6830/rcm.v6n3p237-243

SARKAR, N., GHOSH, S. K., BANNERJEE, S., & AIKAT, K. (2012). Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**, 37(1), 19–27.doi:10.1016/j.renene.2011.06.045.

SENDELIUS, J. **Steam Pretreatment Optimisation for Sugarcane Bagasse in Bioethanol Production.** 2005. Master of Science – Department of Chemical Engineering, Lund University. Sweden, 2005.

SEWALT, V. J. H., GLASSER, W. G., & BEAUCHEMIN, K. A. (1997). Lignin Impact on Fiber Degradation. 3. Reversal of Inhibition of Enzymatic Hydrolysis by Chemical Modification of Lignin and by Additives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 45(5), 1823–1828.doi:10.1021/jf9608074.

SILVA, A.M. **Caracterização da parede celular de *Saccharum officinarum* L. (cana-de-açúcar) e *Brachiaria decumbens* Stapf (braquiaria).** 105 p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, SP, 2005.

SILVA, N.L.C. **Produção de Bioetanol de Segunda Geração a Partir de Biomassa Residual da Indústria de Celulose.** 123 p. Tese (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, RJ, 2010.

SOARES, J., LOREGIAN, H. B., BRASILI, A. N., NUNES, D. L., GUERRA, J. B. Potencial da torta de crumbe para a produção de etanol, **Química Nova**, vol. 35, issue 5. pp. 1004-1010 2009.

SUN, Y., & CHENG, J. (2003). Hydrolysis of Lignocellulosic Materials for Ethanol Production: A Review. **ChemInform**, 34(1), no–no.doi:10.1002/chin.200301272.

SZCZODRAK, J., LLCZUK, Z., ROGALSKI, J., & LEONOWICZ, A. (1986). Intensification of oak sawdust enzymatic hydrolysis by chemical or hydrothermal pretreatment. **Biotechnology and Bioengineering**, 28(4), 504–510.doi:10.1002/bit.260280406.

SZENGYEL, Z. **Ethanol form wood cellulose enzyme production**. Sweden: Dept. of Chemical Engineering, Lund University. Doctor dissertation, 2000.

TEIXEIRA, L.H.M.. **Mapeamento funcional em cana-de-açúcar utilizando ESTs como marcadores moleculares**. 96p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, SP, 2006.

THOMPSON, J. L., & TYNER, W. E. (2014). Corn stover for bioenergy production: Cost estimates and farmer supply response. **Biomass and Bioenergy**, 62, 166–173.doi:10.1016/j.biombioe.2013.12.020.

VILELA, A .D. S. **Análise da produção de celulasas e beta glicosidae produzidas por *Streptomyces* sp.** Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, Goiânia, GO, 2013.

WONG, K. K., DEVERELL, K. F., MACKIE, K. L., CLARK, T. A., & DONALDSON, L. A. The relationship between fiber-porosity and cellulose 72 digestibility in steam-exploded *Pinus radiata*. **Biotechnology and bioengineering**, 31(5), 447-456, 1988.

WYMAN, C. E. (1999). BIOMASSETHANOL: Technical Progress, Opportunities, and Commercial Challenges. **Annual Review of Energy and the Environment**, 24(1), 189–226.doi:10.1146/annurev.energy.24.1.189.

YAMASHITA, M., MIZUSAWA, N., HOJO, M., & YABU, T. (2008). Extensive apoptosis and abnormal morphogenesis in pro-caspase-3 transgenic zebrafish during development. **Journal of Experimental Biology**, 211(12), 1874–1881.doi:10.1242/jeb.012690.

YANG, M.; XING, J.; LIU, Y.; LIU, Y.; MU, T.; ZHOU, J. **Formation and Characterization of Pseudo-Lignin Michorspheres during High-pressure Water Pretreatment**, *BioResources* 10(4), 2015.

ZAKZESKI, J., BRUIJNINCX, P. C. A., JONGERIUS, A. L., & WECKHUUSEN, B. M. (2010). The Catalytic Valorization of Lignin for the Production of Renewable Chemicals. **Chemical Reviews**, 110(6), 3552–3599.doi:10.1021/cr900354u.

ZHANG, Y.-H. P. (2008). Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 35(5), 367–375.doi:10.1007/s10295-007-0293-6.