

Trabalho de Formatura

Curso de Graduação em Engenharia Ambiental

**EFEITO DO ÁCIDO SULFÚRICO E ACÉTICO NO PRÉ-TRATAMENTO DE
BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA**

Letícia Teixeira de Castro

Prof. Dr. Michel Brienzo

Carolina Froes Forsan (co-orientadora)

Rio Claro (SP)

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Instituto de Geociências e Ciências Exatas
Câmpus de Rio Claro

LETÍCIA TEIXEIRA DE CASTRO

EFEITO DO ÁCIDO SULFÚRICO E ACÉTICO NO PRÉ- TRATAMENTO DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

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.

Rio Claro - SP
2019

LETÍCIA TEIXEIRA DE CASTRO

EFEITO DO ÁCIDO SULFÚRICO E ACÉTICO NO PRÉ- TRATAMENTO DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

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

Michel Brienzo (orientador)

Cárol Terrone

Paulo Marcelo Avila Neto

Rio Claro, 12 de novembro de 2019.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à Deus, que me sustenta a cada dia, me fornecendo forças para enfrentar obstáculos da vida, e que me abençoa com singularidades que mantêm acesa a vivacidade em mim.

Agradeço meu orientador e minha co-orientadora pela oportunidade, pelas orientações e técnicas ensinadas, por terem auxiliado em meu desenvolvimento, e terem tido paciência com a minha evolução nesse processo.

Gratidão a todos os meus amigos, prezo muito pela amizade de cada um, pois a seu modo todos foram responsáveis por experiências engrandecedoras, e por lembranças especiais que pretendo levar para o resto da vida.

Às minhas companheiras de faculdade e de república, minha expectativa referente a UNESP foi baixa perto do que vocês tornaram essa realidade para mim, vocês fizeram toda a diferença em minha rotina, foi um crescimento pessoal imensurável, nunca imaginei que conseguiria ter o privilégio de tal relação de irmandade sendo filha única. Obrigada por terem sido meu alicerce tanto nas alegrias como nas tristezas, eu amei ter podido contar com nossa sinergia nessa fase inesquecível.

Sou grata em geral à toda minha família que mesmo de longe sempre mantivemos um forte elo de fraternidade, e por terem sido a base da minha percepção perante a beleza da vida na simplicidade que ela é.

E por fim agradeço imensamente aos meu pais, por terem sido o suporte e incentivo de tudo que realizei e me tornei, que foram essenciais não somente na minha formação acadêmica como em ensinamentos sobre todos os âmbitos da vida. Me norteio em todos os momentos pelo exemplo que vocês são pra mim, e devo meu amor eterno à vocês por tudo que me proporcionaram.

RESUMO

A conversão da biomassa, onde há a desconstrução do material lignocelulósico em diversos produtos de valor econômico industrial, pode gerar combustíveis, solventes, produtos químicos, e produtos farmacêuticos. Para melhor aproveitar essa biomassa, moagem e pré-tratamentos podem ser usados para alterar a estrutura do material lignocelulósico, e remover lignina e hemicelulose, expondo a celulose e aumentando sua acessibilidade, o que resulta em uma melhor digestibilidade enzimática. Além do fornecimento de variados produtos, a biomassa é renovável, sendo assim, é uma solução para a diminuição dos danos ao meio ambiente oriundos da geração de resíduos. Neste contexto, este estudo teve como objetivo identificar o efeito da auto-hidrólise e da hidrólise com ácido sulfúrico e ácido acético no bagaço de cana-de-açúcar, e analisar sua influência na sacarificação enzimática. As amostras pré-tratadas foram caracterizadas quimicamente para determinação do teor de lignina e posteriormente utilizadas no processo de hidrólise enzimática com a enzima Celic CTec2 (Novozymes), que é eficiente na conversão de carboidratos de materiais lignocelulósicos em açúcar fermentável. Para quantificação do teor de glicose presente no hidrolisado obtido na hidrólise enzimática foi feita uma análise pelo método DNS. As frações estudadas perderam massa após passarem pelo tratamento ácido, de acordo com o aumento da concentração desses reagente e da solubilização da lignina, provocando aumento na acessibilidade à celulose, sendo assim, no material pré-tratado com ácido diluído houve uma melhor eficiência na ação das enzimas na hidrólise enzimática do que haveria no material *in natura*. A caracterização química apontou um teor de lignina de em média 21,93 % nas amostras auto-hidrolisadas, esse valor aumentou nas amostras pré-tratadas com ácido diluído, chegando a uma média de 23,85 % nas com ácido acético, e alcançando seus valores com ácido sulfúrico, por volta de 29,14 % em média. Os resultados da hidrólise enzimática demonstraram uma quantia média de 33,28 mg/g de glicose nas biomassas que passaram por auto-hidrólise. Os resultados obtidos das amostras que passaram por pré-tratamento com ácido acético e ácido sulfúrico diluído foram 38,62 mg/g e 39,36 mg/g em média, respectivamente. Os melhores valores obtidos com as amostras pré-tratadas por auto-hidrólise tiveram principal relação com o fator do tempo do procedimento. Nas amostras pré-tratadas com ácido diluído as condições de maior relevância aos melhores rendimentos foram a alta concentração de ácido e alta temperatura em que foram submetidas.

Palavras-chave: Pré-tratamento, ácido, hidrólise enzimática, caracterização química, cana-de-açúcar, biomassa.

ABSTRACT

The conversion of biomass deconstructs the lignocellulosic material in various products of industrial economic value, that can generate fuels, solvents, and chemicals and pharmaceuticals products. To better exploit this biomass, milling and pre-treatments can be used to alter the structure of the lignocellulosic material, and remove lignin and hemicellulose, exposing the cellulose and increasing its accessibility, resulting in a better enzymatic digestibility. Besides supply these severage products, the biomass is renewable, thus it is a solution to reduce environmental damage from waste generation. In this context, this study aimed to identify the effect of sulfuric and acetic acid on the chemical composition of lignocellulosic biomass, and to analyze its influence on enzymatic saccharification. The pretreated samples were chemically characterized to determine the lignin content and later were used in the enzymatic hydrolysis process with the Celic CTec2 (Novozymes) enzyme, which is efficient at converting carbohydrates from lignocellulosic materials into fermentable sugar. The quantity of glucose present in the hydrolyzate obtained in the enzymatic hydrolysis was analysed by the DNS method. The fractions studied lost mass after the acid treatment, according to the increase of the reagent concentration and the solubilization of lignin, provoking an increase in the cellulose accessibility, thus, in the pretreated material with acid there is a better efficiency in the action of enzymes in enzymatic hydrolysis than in materials *in natura*. The chemical characterization indicated an average lignin content of 21,93 % in the self-hydrolysed samples, this value increased in the samples pretreated with diluted acid, reaching an average of 23,85 % in the acetic acid samples, reaching best values with sulfuric acid, around 29,14 % on average. The results of enzymatic hydrolysis showed an average amount of 33,28 mg/g of glucose in biomasses self-hydrolysed. The results obtained from samples that were pretreated with acetic acid and diluted sulfuric acid were 38,62 mg/g and 39,36 mg/g on average, respectively. The best values obtained with the samples pre-treated by self-hydrolysis were related to the time factor of the procedure. In the samples pretreated with dilute acid the most relevant conditions to the best yields were the high acid concentration and the high temperature at which they were submitted.

Keywords: pretreatment, acid, enzymatic hydrolysis, chemical characterization, sugarcane, biomass.

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	7
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
2.1 Material lignocelulósico.....	9
2.2 Celulose.....	11
2.3 Hemicelulose.....	13
2.4 Lignina.....	14
2.5 Pré-tratamento.....	16
2.6 Auto-hidrólise.....	17
2.7 Ácido diluído.....	18
2.8 Hidrólise enzimática.....	21
3. OBJETIVO.....	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.1 Auto-hidrólise do bagaço.....	25
4.2 Pré-tratamento com ácido diluído.....	26
4.3 Caracterização química da biomassa.....	27
4.4 Hidrólise enzimática das amostras.....	28
4.5 Método DNS.....	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	29
5.1 Caracterização química da biomassa.....	30
5.2 Hidrólise enzimática das amostras.....	33
5.3 Correlação entre teores de lignina e glicose.....	37
5.4 Análise da influência dos pré-tratamentos.....	38
5.5 Análise estatística.....	41
5.5.1 Auto-hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar	41
5.5.2 Hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar com ácido acético.....	42
5.5.3 Hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar com ácido sulfúrico.....	44
6. CONCLUSÃO.....	46
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

1. INTRODUÇÃO

A evolução do agronegócio provocou uma expansão do consumo de recursos e da geração de resíduos nas atividades agropecuárias e agroindustriais. A sobrecarga ambiental está intensificando problemas como a destruição da camada de ozônio, o aquecimento global, a diminuição da biodiversidade, dentre outros impactos locais, regionais, e mundiais. O sistema de desenvolvimento atual demanda uma revolução desse modelo deficiente devido a sua desarmonia a uma sociedade sustentável (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2000). Dessa forma, há um crescente interesse na valorização dos resíduos agroindustriais e em suas oportunidades de avanço para o negócio agropecuário (ROSA et al., 2011).

A biomassa é um recurso renovável obtido de matéria orgânica. Tem como vantagem o fato de possuir baixo custo para obtenção, ser renovável, reaproveitar resíduos, e gerar combustíveis menos poluentes do que os combustíveis fósseis (AGÊNCIA NACIONAL DE ENERGIA ELÉTRICA, 2008).

Através da conversão da biomassa em recursos renováveis como celulose, hemicelulose, lignina, pectina, taninos, amido, ácidos graxos, colágeno, quitosana, corantes naturais, entre outros, a biorrefinaria gera energia e produtos de valor agregado, minimizando assim os impactos ambientais, e maximizando a utilização desses recursos considerando o ciclo de vida dos produtos (FERNANDO et al., 2006).

A celulose é um polissacarídeo de glicose, com estrutura rígida e resistente a hidrólise, sendo assim um impasse para as aplicações do uso de biomassas (DING; HIMMEL, 2006). A hemicelulose é um polissacarídeo mais suscetível à hidrólise se comparado à celulose, pois apresenta menor grau de polimerização (FENGEL; WEGENER, 1989). A lignina é uma substância hidrofóbica, com estrutura mais complexa que os outros componentes, o que prejudica o processo de sacarificação, sendo assim sua remoção é necessária para facilitar a hidrólise da celulose (CHANG; HOLTZAPPLE, 2000). Estas macromoléculas apresentam interesse industrial, pois são matéria prima para diversos produtos.

Neste contexto, a finalidade deste estudo foi analisar a influência da auto-hidrólise e da hidrólise com ácido sulfúrico e acético no pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar, através de caracterizações químicas. As amostras foram submetidas a hidrólise enzimática com o objetivo de quebrar a cadeia de celulose em glicose, açúcar fermentável de interesse no processo de produção de etanol celulósico.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Material lignocelulósico

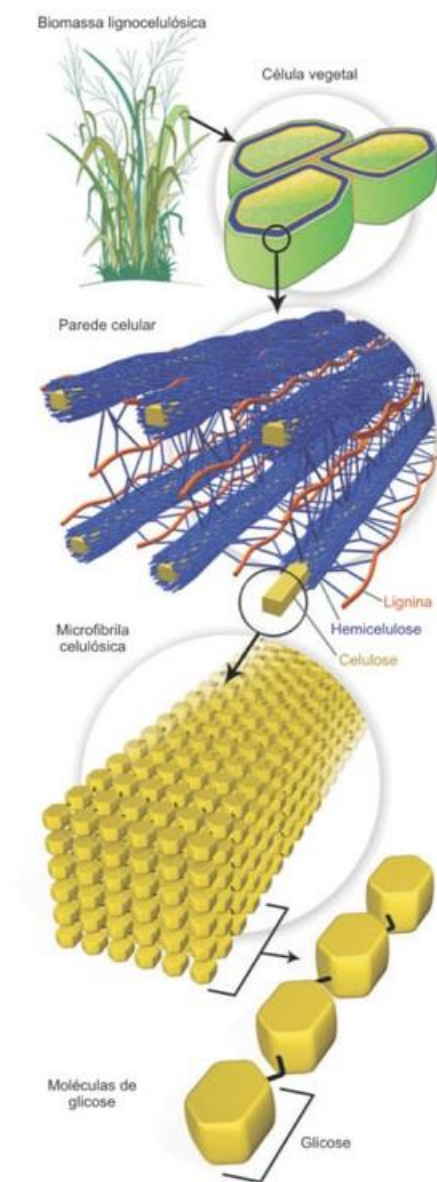
Os materiais lignocelulósicos são recursos renováveis que podem ser usados para obtenção de produtos e de energia. Sua transformação ocorre de forma mais sustentável do que com outras matérias-primas, podendo-se obter cimento, adesivos, lubrificantes, graxas, rações de animais, papéis, entre outros. A biomassa lignocelulósica é particularmente adequada devido à sua disponibilidade em larga escala, baixo custo, e produção ambientalmente benigna. Muitos ciclos de produção e utilização de energia pela biomassa celulósica têm emissões de gases de efeito estufa próxima de zero em seu ciclo de vida (BRODEUR et al., 2011).

No entanto a celulose, a hemicelulose, e a lignina, principais componentes da biomassa vegetal são arranjadas de forma que a estrutura seja altamente recalcitrante, o que dificulta processos fermentativos, e a conversão do material (CANILHA et al., 2011).

A recalcitrância ocorre devido a capacidade da estrutura química e morfológica da lignocelulose proteger seus carboidratos da ação de microrganismos ou de suas enzimas, portanto mesmo com um pré-tratamento, o material lignocelulósico requer 100 vezes mais enzimas para completar a sacarificação do que o amido, por exemplo (VINZANT et al., 2005).

O material lignocelulósico é altamente heterogêneo, o bagaço de cana-de-açúcar por exemplo é composto por aproximadamente 14 a 26 % de lignina, 35 a 54 % de celulose, e 16 a 35 % de hemicelulose (Figura 1). A celulose e a hemicelulose estão presentes como polissacarídeos, e precisam ser hidrolisados, por ácidos ou enzimas para se tornarem disponíveis à fermentação. Além disso, os polissacarídeos são bem organizados em associação com a lignina na parede da célula, com propriedades físico-químicas influenciando a recalcitrância do material (MELATI et al., 2017).

Figura 1 – Estrutura do material lignocelulósico.



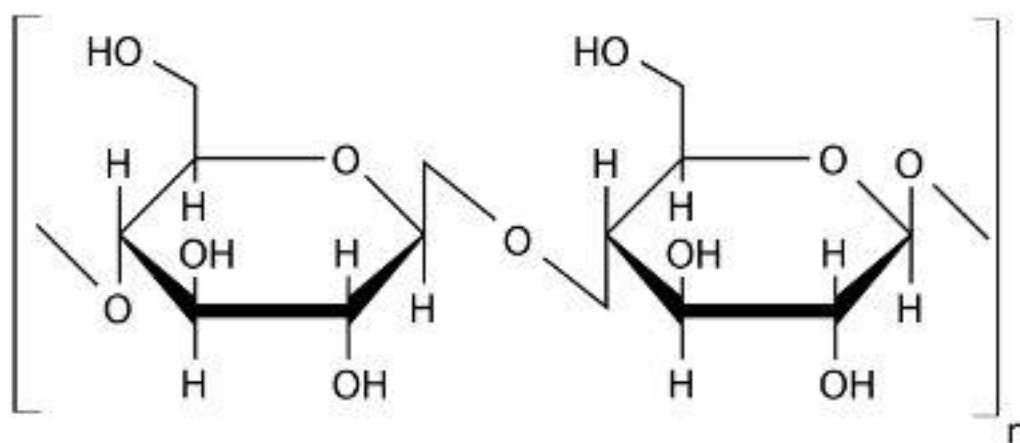
Fonte: KONDO, 1997.

Através de pré-tratamentos, como os com ácido diluído, alcalinos, entre outros, os componentes da biomassa podem ser separados, liberando açúcares fermentáveis como xilose, arabinose e glicose, e tornando a celulose (presente no material pré-tratado) mais acessível à ação de enzimas celulolíticas. Este processamento da biomassa tem alto custo, portanto é extremamente importante estudos que busquem uma alternativa mais eficaz e barata (CANILHA et al., 2011).

2.2 Celulose

A celulose tem uma cadeia linear não ramificada, formada por unidades de D-glicose ligadas por ligações glicosídicas β (1 $\rightarrow$ 4) (Figura 2) (CALIARI et al., 2017). Nas paredes celulares das plantas são organizadas na forma de longas microfibrilas que resultam em extensas fibras (SOMERVILLE, 2006).

Figura 2 – Estrutura da celulose.

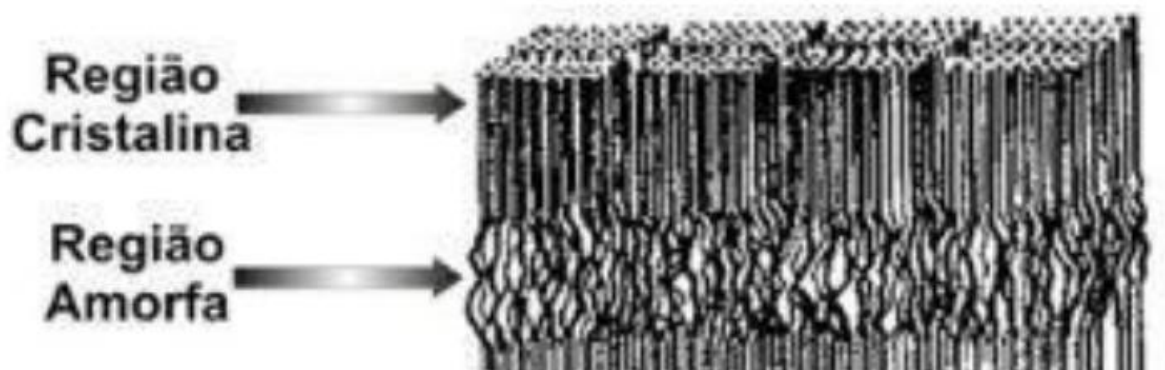


Fonte: NISHIYAMA et al., 2002.

A celulose está associada a outros componentes como a hemicelulose, pectina, proteínas e lignina na parede celular vegetal (DAVISON et al., 2013). As moléculas de hemicelulose estruturam as fibras da celulose, e a lignina preenche os espaços entre estes polissacarídeos (PAGE, 1976).

Uma das propriedades importantes da celulose é a cristalinidade, pois ela possui regiões amorfas e cristalinas que possuem diferentes características. As regiões cristalinas são formadas por microfibras unidas por ligações de hidrogênio ao longo do seu comprimento, de forma melhor organizada do que nas regiões amorfas (Figura 3) (CALIARI et al., 2017; LAUREANO-PEREZ et al., 2005). As regiões amorfas são formadas pela má formação da estrutura devido à alteração no processo de cristalização, sendo denominadas também como regiões em que a cristalização foi defeituosa (SILVA, D. J.; D'ALMEIDA, M. L. O., 2009). É composta por ligações β -1,4 entre as unidades de glicopiranoses (ADITIVOS & INGREDIENTES, 2018). As ligações de hidrogênio entre as cadeias de celulose aumentam a recalcitrância e a resistência à ação de enzimas, ou seja, diminui a digestibilidade da celulose (ZHU et al., 2008).

Figura 3 – Microfibras da celulose vegetal.



Fonte: ULLMANN, 2010.

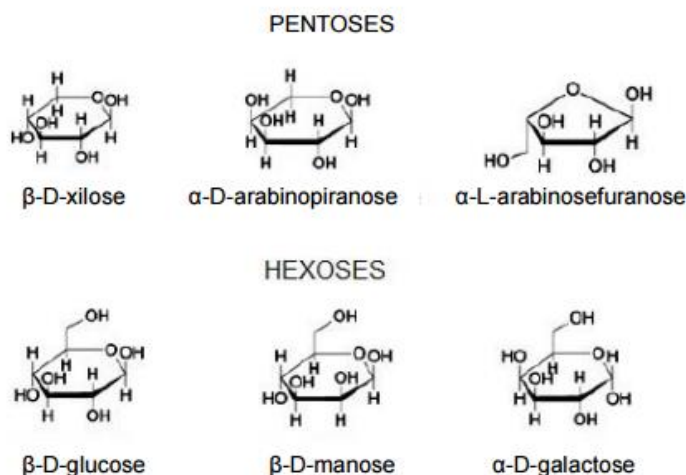
O grau de polimerização também pode dificultar a ação de enzimas, pois quanto maior a cadeia, menor a digestibilidade da enzima devido a estrutura maior e mais resistente (ZHU et al., 2008).

A celulose pode ser empregada na produção de biocombustíveis, na indústria alimentícia, na produção de fibras, cosméticos, madeira, filmes, papéis, adesivos, plásticos, tintas, revestimentos, entre outros (GUERRIERO et al., 2016).

2.3 Hemicelulose

A hemicelulose é uma classe de carboidratos com composição e estruturas diversas conforme o tipo de planta. São polissacarídeos de estrutura amorfa, com cadeia de grupos pendentes, podendo conter pentoses (β -D-xilose, α -L-arabinose), hexoses (β -D-manose, β -D-glicose, α -D-galactose) e ácidos urônicos (Figura 4), e representa até 35% da massa do material lignocelulósico (TRAJANO et al., 2013).

Figura 4 – Açúcares presentes como componentes das hemiceluloses.



Fonte: ARAÚJO et al., 2013.

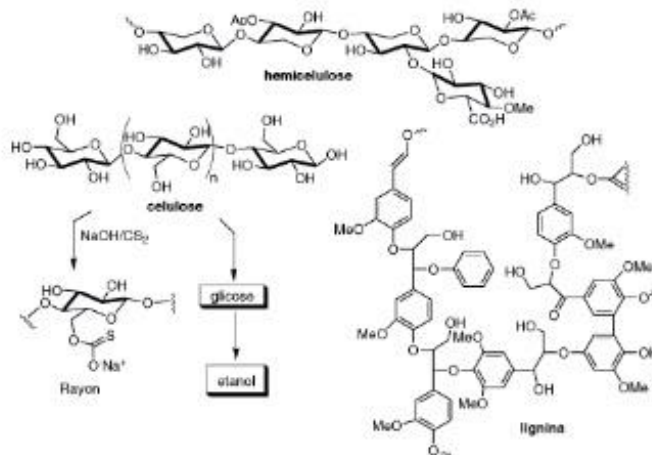
Devido à estas características, sua estrutura oferece menor resistência do que a celulose a processo de conversão, como pré-tratamentos químicos. As microfibrilas de celulose ficam inseridas na hemicelulose na parede celular, isso acontece pois as cadeias de hemicelulose interagem com as fibrilas de celulose formando ligações não-covalentes (DAVISON et al., 2013). As ramificações e modificações estruturais da hemicelulose não permitem a formação de microfibrilas (COSGROVE, 2005).

As hemiceluloses são utilizadas na produção de enzimas, de produtos de fermentação como solventes, ração para animais, revestimentos, adesivos, remédios, aditivos plásticos, impressões têxteis, e nano partículas (GUERRIERO et al., 2016).

2.4 Lignina

A lignina é uma macromolécula polifenólica interligada à hemicelulose que envolve parcialmente os polissacarídeos e as microfibrilas da celulose na parede celular das plantas. É formada por compostos fenólicos como p-hidroxifenil, guaiacil, e siringil (Figura 5) (ARGYROPOULOS et al., 1998). Proporciona suporte mecânico e elástico para a planta, facilita o transporte de água e nutrientes, e dificulta a entrada de patógenos microbianos (DAVISON et al., 2013).

Figura 5 – Estruturas parciais dos componentes lignocelulósicos e derivados.



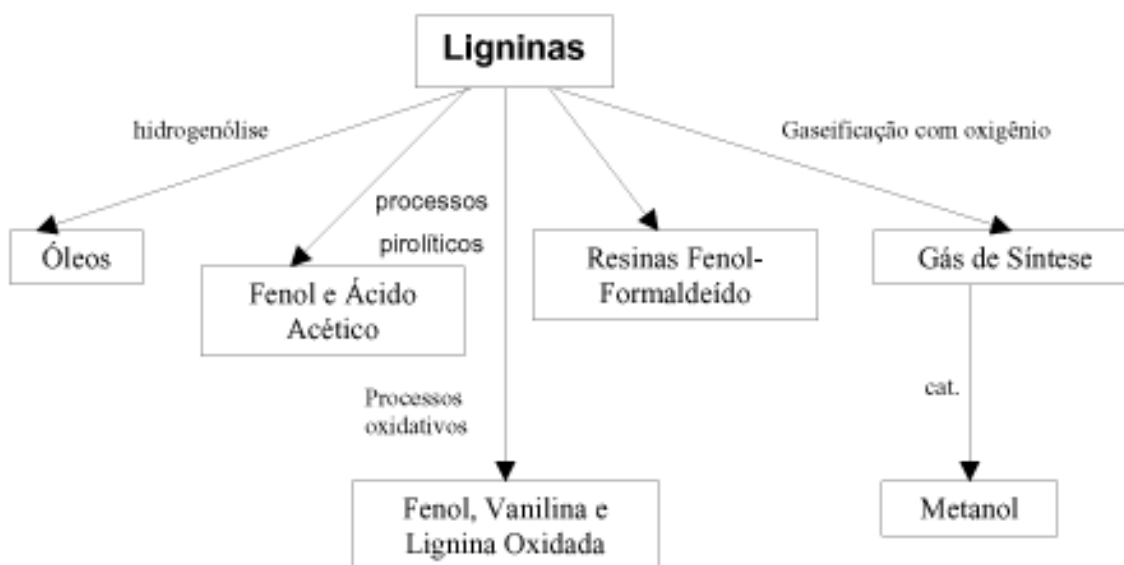
Fonte: FERREIRA et al., 2009.

O material lignocelulósico é composto por uma quantidade de lignina variável, e nota-se que ela é mais abundante em plantas lenhosas, garantindo maior resistência (SAAKE et al., 2007; PALONEN, 2004). Essa resistência é o principal fator que interfere na acessibilidade à celulose, pois ela atua como um obstáculo físico e químico que barra a ação das enzimas celulolíticas (LU et al., 2002).

Os estudos buscam a remoção ou modificação da lignina para que ela permita acesso a celulose, através de pré-tratamentos e lavagem do material ou pela adição de elementos para reações, essas abordagens são utilizadas como forma de tentar solucionar o problema da recalcitrância (WANG et al., 2013).

Apesar de não ser desejável em processos de conversão da celulose, a lignina pode ser utilizada na produção de aditivos de cimento, antioxidantes, nano tubos de carbono, resinas, aditivos de combustíveis, lubrificantes, emulsificantes, floculantes, dispersantes, tintas, corantes, e graxas (Figura 6) (GUERRIERO et al., 2016).

Figura 6 – Componentes produzidos da lignina para uso e aplicação.



Fonte: GONÇALVES, 2000.

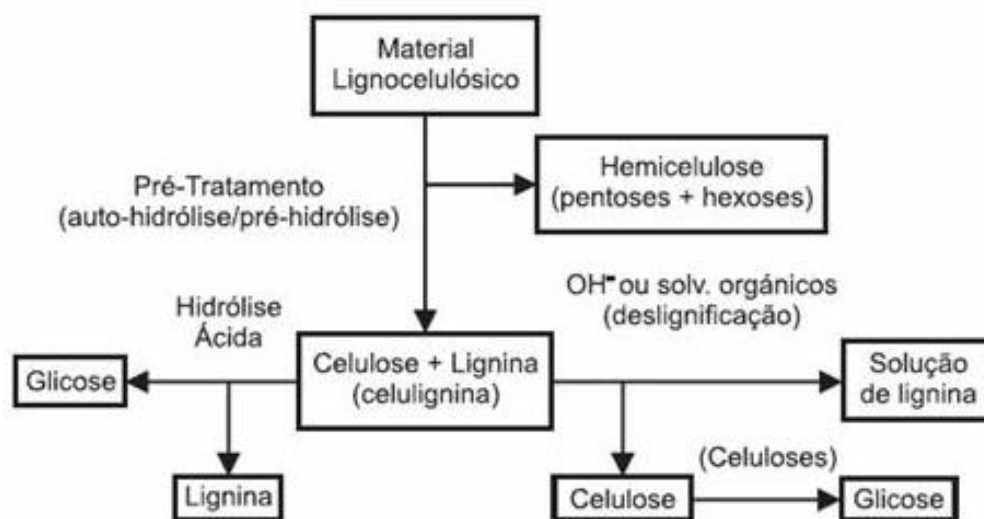
2.5 Pré-tratamento

Uma variedade de tipos de moagens podem ser utilizadas como um passo anterior ao pré-tratamento. A moagem também pode ser aplicada como um método de pré-tratamento, pois o material lignocelulósico é moído com a finalidade de reduzir o tamanho das partículas e aumentar a superfície de contato, podendo aumentar o rendimento da hidrólise enzimática (TAHERZADEH et al., 2008). Entretanto, métodos que provocam tal efeito consomem muita energia, e são considerados inviáveis e escala industrial devido ao custo. A redução na organização das fibras de celulose é desejável (DA SILVA et al., 2013), pois diminuiria a recalcitrância do material lignocelulósico.

Os moinhos mais utilizados são o de bolas, que usa esferas de diferentes tamanhos e materiais gerando cortes e impactos na biomassa para produzir material em pó (LIN et al., 2010) e o de discos, que esmaga a biomassa entre cortes e usa chapas serradas, com pontas ou sulcos, para desestruturar a biomassa (HIDENO et al., 2009).

Os pré-tratamentos no geral têm como função desestruturar o material e remover/modificar componentes da biomassa. Existem vários tipos de pré-tratamentos, como os ácidos, alcalinos, ozonólise, biológicos, explosões a vapor. Entretanto, este estudo foca na auto-hidrólise, e na hidrólise com ácidos diluídos. Os custos e complexidade desses métodos variam e devem ser levados em consideração, pois é comum que sejam necessários em larga escala. Pré-tratamentos que removem a hemicelulose, e removem ou modificam a estrutura da lignina, são importantes para expor a celulose, aumentando a sua acessibilidade (Figura 7) (BRIENZO et al., 2017, 2015).

Figura 7 – Separação dos principais componentes da biomassa.



Fonte: PEREIRA et al., 2008.

A eficiência do pré-tratamento é avaliada baseada no desempenho da hidrólise. Em geral, um bom pré-tratamento proporciona altos rendimentos e taxas de hidrólise, não gera inibidores da fermentação, tem baixo custo, não apresenta perda de carboidratos ou degradação da biomassa, possibilita a recuperação da lignina e consome pouca energia (BALAT et al., 2008; SILVA et al. 2013).

Apesar de alguns pré-tratamentos fornecerem altos rendimentos de hidrólise, outros apresentam uma série de desvantagens, devido a produção de inibidores da fermentação, geração de efluentes, ou alto gasto energético (MORO et al., 2015).

2.6 Auto-hidrólise

Os únicos reagentes no processo de auto-hidrólise são a biomassa e água, e os equipamentos específicos necessários operam em altas temperaturas e em diferentes períodos de tempo (BATALHA et al., 2015).

O procedimento de auto-hidrólise do material lignocelulósico é considerado como um resultado dos grupos acetil liberados da hemicelulose. A ionização da água age como catalisador em altas concentrações e temperaturas, fornecendo um meio eficaz para a hidrólise ácida, e perturbando a estrutura física lignocelulósica devido à alta pressão, o que resulta na redução da cristalinidade e da polimerização (LEI et al., 2013).

Neste pré-tratamento a hemicelulose pode ser parcialmente removida, o que leva ao aumento na acessibilidade à celulose, melhorando assim a digestibilidade enzimática.

O uso de água e altas temperaturas ao invés da utilização de produtos químicos é uma alternativa mais ecologicamente correta (LEI et al., 2013).

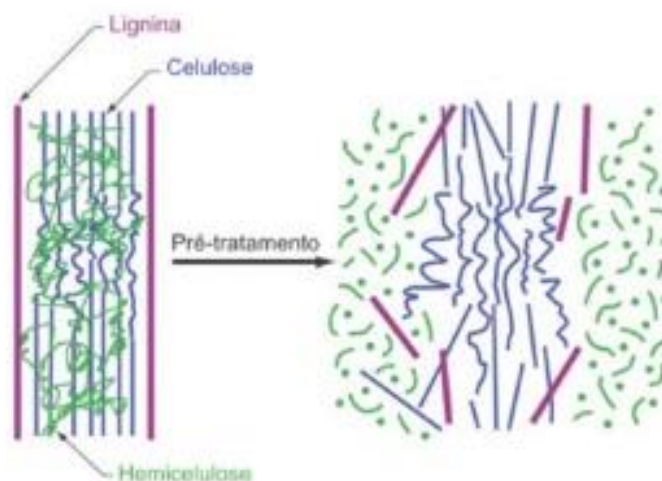
2.7 Ácido diluído

O pré-tratamento ácido da biomassa lignocelulósica modifica a estrutura do material para posteriormente ser submetido a hidrólise enzimática. A eficiência desse processo depende da concentração do ácido, da razão sólido/líquido e da temperatura (BEHERA et al., 2014). Os ácidos mais utilizados são o ácido sulfúrico, clorídrico, nítrico, fluorídrico, etanoico ou fosfórico (ASGHER et al., 2013; AGUILAR et al., 2002), que quando concentrados são extremamente tóxicos e perigosos, e necessitam de um manuseio especial durante e após o processo. Sendo assim, surgiu a alternativa de estudos com ácidos diluídos em altas temperaturas (LISSENS et al., 2004; ZHENG et al., 1996; XIAO et al., 2011; HAO et al., 2012; CARERE et al., 2008; TABIL et al., 2011; MOSIER et al., 2005; DADI et al., 2006).

Os ácidos diluídos podem ser usados como catalisadores de uma hidrólise limitada chamada pré-hidrólise, que consiste na hidrólise da hemicelulose, principalmente da xilana, devido as ligações das hemiceluloses serem mais fracas. Isso ocorre através do rompimento da região amorfa, restando assim frações de celulose e lignina, pois apesar de perturbar a estrutura, o polissacarídeo não é solubilizado, mantendo-as inalteradas (AGUILAR et al., 2002; BEHERA et al., 2014; ANWARA et al., 2014). Esse processo libera prótons que quebram as ligações éter heterocíclicas entre os monômeros de açúcar nas cadeias poliméricas formadas pelas hemiceluloses e pela celulose, resultando em vários compostos, principalmente açúcares como xilose, glicose, arabinose, ácido acético, e outros como oligômeros, e produtos de degradação (furfural) (AGUILAR et al., 2002).

O pré-tratamento com ácido diluído então remove a parte amorfa da biomassa (principalmente arabinoxilana) restando o material pré-tratado enriquecido com celulose. O procedimento causa várias modificações na estrutura e na composição dos materiais pré-tratados através da remoção das hemiceluloses e alteração da estrutura da lignina (Figura 8) (BRIENZO et al., 2017).

Figura 8 – Alterações estruturais causadas pelo pré-tratamento.



Fonte: MOSIER et al., 2005.

A celulose é resistente ao pré-tratamento ácido, entretanto, dependendo da severidade do processo (concentração de ácido, temperatura, e tempo de reação) pode gerar perdas de 2 a 20 % de celulose (TRAJANO et al., 2013). Essa perda de celulose ocorre principalmente na sua fração amorfa. Devido à natureza cristalina da celulose, é necessário alta concentração de ácido, altas temperaturas, e longos tempos de reação para afetar significativamente o material. Porém, condições que favorecem a hidrólise ácida da celulose, atingindo a fração cristalina, degradam a glicose gerada em hidroximetilfurfural, ácido fórmico e levulínico (FITZPATRICK, 2002).

Nestas condições, a hemicelulose pode ser completamente removida sem causar grandes danos na celulose, pois as ligações na hemicelulose são mais fracas do que na celulose (AGUILAR et al., 2002).

A lignina constitui uma estrutura aromática com mais carbono e menos oxigênio quando comparada à celulose, além de também ser mais hidrofóbica (GUSTAFSSON et al., 2003; ZHANG et al., 2007). A matriz de lignina pode impor várias barreiras estruturais à celulase e impedir a ligação eficaz das suas enzimas, levando a uma baixa digestibilidade da celulose. Sendo assim, a modificação na estrutura da lignina e sua realocação são fatores fundamentais para diminuir a recalcitrância do material. Outros fatores além da distribuição da lignina contribuem para a recalcitrância, como o tipo de célula, e a composição química (BRIENZO et al., 2017).

Através do pré-tratamento ácido tem sido estabelecido que a modificação da lignina é um fator mais relevante para acessibilidade da celulose do que a transformação do grau de polimerização e cristalinidade, promovendo uma melhor exposição da celulose para a hidrólise enzimática (BRIENZO et al., 2017).

A remoção da lignina não é eficiente em pré-tratamentos com ácido diluído, independentemente da biomassa utilizada e do agente acidificante a remoção da lignina é sempre baixa. Essa remoção de xilana e/ou lignina é necessária para a sacarificação eficaz da celulose, e para diminuir a ligação carboidrato-lignina que aumenta a adsorção de enzimas (KUMAR et al., 2009).

A remoção de lignina pode não ser tão baixa se considerar que alguns produtos de degradação de açúcares podem reagir/condensar e formar compostos que são quantificados como lignina (TRAJANO et al., 2013). Ainda assim, adicionar ácido sulfúrico em um reator de batelada pode aumentar a remoção de lignina para até 50% (LIU et al., 2004). A remoção de lignina é acompanhada pela geração de monômeros aromáticos na fração líquida, com os tipos de fenóis variando de acordo com a biomassa pré-tratada, e com as condições do pré-tratamento (DU et al., 2010).

Os pré-tratamentos com ácido diluído tem sido considerados efetivos e economicamente viáveis, pois ao contrário do ácido concentrado gera menos compostos inibidores, como furfural e hemifurfural, além disso, conseguem uma maior remoção da lignina, possibilitando que a celulose seja digerida pelas enzimas (SHIMIZU, 2018).

2.8 Hidrólise enzimática

A opção pela hidrólise enzimática ultimamente tem sido mais adotada do que a hidrólise com ácidos concentrados ou diluídos (ZHU et al., 2009), isso porque a hidrólise ácida apresenta alguns problemas como a corrosão causada pelo ácido concentrado, necessidade de equipamentos altamente resistentes, necessidade de correção do pH para a etapa de fermentação, e produção de inibidores da fermentação (TAHERZADEH et al., 2007a; SOARES et al., 2011). Além disso, a hidrólise enzimática pode ser conduzida em condições amenas, apresenta menores custos com equipamentos, e geralmente possui maiores conversões da celulose do que a hidrólise ácida (BALAT et al., 2008; SOARES et al., 2011).

Enzimas são moléculas orgânicas de origem principalmente proteica e agem nas reações químicas das células como catalisadoras, ou seja, aceleram a velocidade dos processos sem alterá-los. Algumas precisam da adição de outra molécula à sua cadeia polipeptídica para se ligarem a outro grupo, que chamamos de cofator, ou a um grupo de moléculas orgânicas que chamamos de coenzimas, em alguns casos elas podem se ligar aos dois grupos. Cada tipo de enzima serve para uma determinada reação, e para seu funcionamento eficaz, sua estrutura deve ser conservada (ALBERTS et al., 2006; NELSON et al., 2011).

As enzimas possuem uma região específica de ligação chamada de sítio ativo, essa região se encaixa por ligações covalentes transitórias nas reações, depois se solta e continua em perfeita forma para novas atividades. Elas agem na variação de entropia da reação, aumentando sua eficiência, e como toda proteína funcionam em temperatura e pH específicos, caso contrário, elas podem se desnaturar em condições de altas temperaturas, ou quando há variações extremas de pH, podendo perder assim sua função (ALBERTS et al., 2006; NELSON et al., 2011).

A Cellic CTec2 é uma enzima que provou ser eficaz em uma ampla variedade de materiais lignocelulósicos pré-tratados para a conversão dos carboidratos desses materiais em simples açúcares antes da fermentação (NOVOZYMES A/S, 2010).

A hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos é um processo lento, pois a hidrólise da celulose é prejudicada devido a presença de lignina, de hemicelulose, da área de superfície, e da cristalinidade da celulose. Sendo assim, algumas formas de pré-tratamento são necessárias para aumentar a acessibilidade da hidrólise enzimática à celulose, que permite que quase toda a celulose presente no material original seja retida, permitindo assim melhores rendimentos na hidrólise enzimática (BALAT et al., 2008).

A hidrólise da celulose ocorre conforme as seguintes etapas: transferência das enzimas de um meio aquoso para a superfície das partículas de celulose; adsorção das enzimas e formação do complexo enzima-substrato; hidrólise da celulose; transferência de oligômeros, glicose, e celobiose da superfície das partículas celulósicas para o meio aquoso; e hidrólise de oligômeros, e celobiose em glicose no meio aquoso (WALKER et al., 1991). Este processo está sob a influência de diversos fatores discutidos anteriormente, como a presença de lignina e hemicelulose no substrato (BRIENZO et al., 2015).

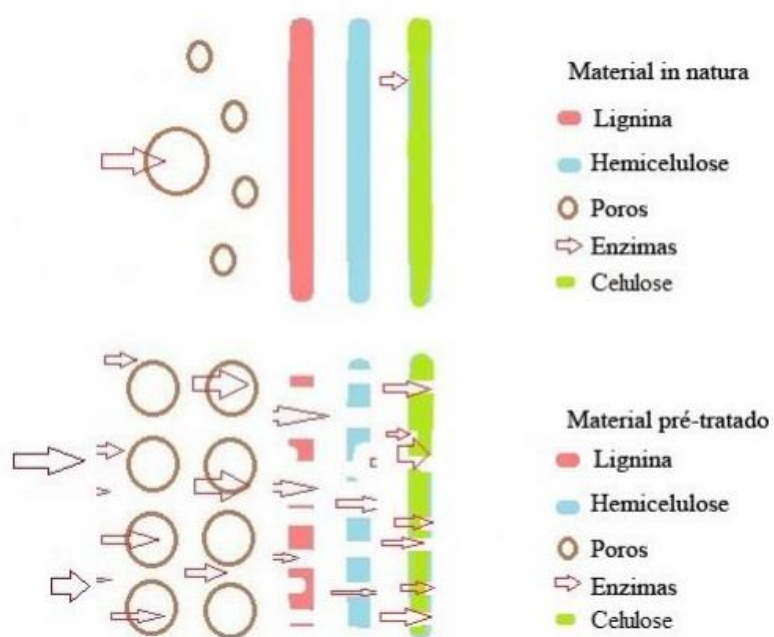
A deslignificação de materiais lignocelulósicos proporciona maior conversão enzimática da celulose, principalmente quando se reduz a quantidade de lignina a níveis abaixo de 50 % (MOONEY et al., 1998), além de aumentar a eficiência da hidrólise, e a quantidade de enzimas que podem ser recuperadas após o processo (LU et al., 2002). De fato, amostras com maior conteúdo de lignina provocam maior adsorção improdutiva de enzimas, isso ocorre pois a celulase adsorve a lignina, ocupando os poros antes acessíveis, e redepositando-a em superfícies de celulose (OOSHIMA et al., 1990).

Podemos concluir então, que os principais fatores relacionados à biomassa que afetam a hidrólise enzimática, são a cristalinidade, porosidade, o grau de polimerização, o tamanho da área superficial, entre outros (RABELO et al., 2010).

A biomassa quando hidrolisada na sua forma natural apresenta rendimentos muito baixos, menores que 20%. Isso ocorre porque a biomassa possui uma estrutura celular rígida, complexa e recalcitrante à decomposição devido às características estruturais dos tecidos vegetais e às interações de natureza físico-químicas estabelecidas entre a celulose, a hemicelulose e a lignina. Assim, o pré-tratamento visa alterar a estrutura da biomassa permitindo que a celulose se torne mais acessível à etapa de hidrólise enzimática (MOOD et al., 2013).

Para evitar os problemas da ação da enzima na hidrólise, entre outros, necessita-se de um pré-tratamento para remover ou modificar a lignina e remover a hemicelulose, reduzir a cristalinidade da celulose, e aumentar a porosidade do material (Figura 9) (KELLER et al., 2003).

Figura 9 – Efeito do pré-tratamento na hidrólise enzimática.



Fonte: SHIMIZU, 2018.

A etapa de hidrólise tem a função de converter a celulose e a hemicelulose presentes na estrutura da biomassa em açúcares, principalmente glicose e xilose, que serão posteriormente fermentados pelos microrganismos (RABELO et al., 2011).

3. OBJETIVO

O presente estudo teve como objetivo determinar o efeito do ácido sulfúrico e acético na composição química da biomassa lignocelulósica, e sua influência na sacarificação enzimática.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Auto-hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar

A auto-hidrólise foi realizada para modificar o material, e favorecer a etapa de hidrólise enzimática através de um melhor acesso à celulose. O procedimento foi realizado com 5 g de bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, moído em moinho de facas e selecionado em peneira de 20 mesh. Foi utilizado reator de aço-inox com capacidade para 50 mL, para aquecimento do material entre 87,57 e 172,43 °C, em banho de óleo termostatizado. Os resíduos sólidos e os hidrolisados foram obtidos ao final das reações, em tempos de 6,72 a 63,28 min, e foram separados por filtração à vácuo. A fração sólida foi lavada e seca em estufa à 45 °C e caracterizada quimicamente de acordo com o item 4.3.

A Tabela 1 mostra os 11 ensaios de auto-hidrólise, realizados com tempos e temperaturas determinados a partir de um planejamento experimental, que inclui alguns extremos para comparação que foram referenciados de acordo com outras literaturas.

Tabela 1 – Ensaios da auto-hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar.

Ensaios	Tempo (min)	Temperatura (°C)
1	15	100
2	15	160
3	55	100
4	55	160
5	35	87,57
6	35	172,43
7	6,72	130
8	63,28	130
9	35	130
10	35	130
11	35	130

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 Pré-tratamento com ácido diluído

Cerca de 5 g de bagaço de cana-de-açúcar foi adicionado ao reator contendo 50 mL de solução de ácido acético, ou ácido sulfúrico, em diferentes concentrações. O reator foi hermeticamente fechado e pressurizado.

O tempo de reação iniciou a partir da temperatura desejada, que variou de 100 a 160 °C. Após o término da reação (15 a 55 minutos), o aquecimento foi interrompido e o sistema resfriado com o auxílio de um banho de gelo até temperatura ambiente. Após o resfriamento, a válvula foi aberta para diminuir a pressão interna. O hidrolisado e o sólido foram filtrados à vácuo, utilizando papel-filtro. A fração sólida foi seca em estufa à 45 °C e caracterizada quimicamente de acordo com o item 4.3.

Tabela 2 – Ensaios do pré-tratamento com ácido diluído (acético ou sulfúrico) do bagaço de cana-de-açúcar.

Ensaios	Tempo (min)	Temperatura (°C)	H ₂ SO ₄ ou CH ₃ COOH (% m/v)
1	15	100	1
2	15	160	1
3	55	100	1
4	55	160	1
5	15	100	3
6	15	160	3
7	55	100	3
8	55	160	3
9	35	79,55	2
10	35	180,45	2
11	1,36	130	2
12	35	130	2
13	35	130	0,32
14	35	130	3,68
15	35	130	2
16	35	130	2
17	35	130	2

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3 Caracterização química da biomassa

Todos os ensaios de caracterização química e hidrólise enzimática foram realizados em duplicata. Foram adicionados 3 mL de ácido sulfúrico 72 % (m/m) em 300 mg de amostra. A reação ocorreu em banho-maria a 45° C por 7 minutos. Após a realização da diluição do ácido para 4% (m/m), a solução foi autoclavada a 1 atm por 30 minutos. Após o resfriamento a solução hidrolisada foi filtrada em cadinho de placa porosa previamente tarado.

A quantidade de lignina solúvel presente na parte líquida filtrada foi quantificada através de espectrofotometria a 215 nm e 280 nm, utilizando absorvidade molar da lignina de 105 L/g.cm, e a quantidade de lignina insolúvel que ficou retida no cadinho no filtro, foi possível determinar por gravimetria.

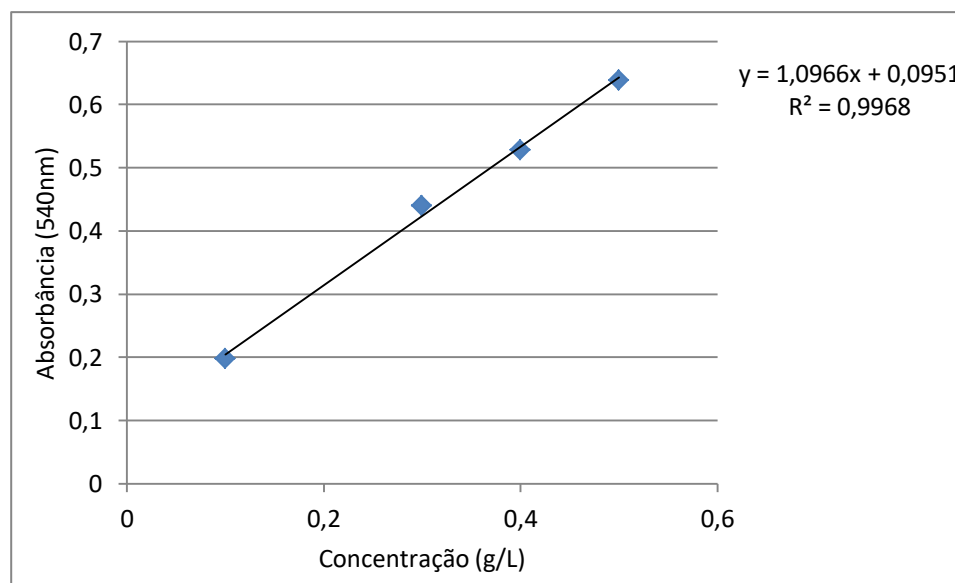
4.4 Hidrólise enzimática da celulose

As amostras *in natura* e pré-tratadas foram submetidas a hidrólise enzimática para avaliar o rendimento de liberação de glicose. O procedimento foi realizado com 0,1 g de amostra, que foram submetidas a hidrólise enzimática para comparar a digestibilidade utilizando coquetél comercial (Cellic Ctec 2 - Novozymes), em meio tampão de acetato de sódio 50 mmol/L, pH 4,8. Foi utilizada atividade enzimática de 15 FPU/g de substrato em reação a 50 °C e agitação de 160 rpm.

A fração líquida foi filtrada em filtros de seringa de 0,22 µm e analisada por DNS para quantificação de glicose liberada. Os valores obtidos foram utilizados para calcular a digestibilidade enzimática do material (anidroglicose liberada em relação ao conteúdo de glucana/celulose) a partir do teor de celulose presente na biomassa.

4.5 Método DNS

Para realização da solução padrão foi pesado em balança analítica 0,1 g de glicose, em seguida essa quantidade foi dissolvida em aproximadamente 20 mL de água destilada e transferida para um balão volumétrico de 100 mL, completando o volume com água destilada e homogeneizando. Foram feitas 4 diluições da solução padrão de 1,0 g/L de glicose com água destilada em balões volumétricos de 5 mL, em concentrações de 0,1 g/L, 0,3 g/L, 0,4 g/L e 0,5 g/L de glicose para determinação da curva padrão de açúcar redutor. A equação da curva padrão foi plotada em uma planilha do programa Microsoft Excel com a concentração de glicose no eixo X e a absorbância no eixo Y (Gráfico 1).

Figura 10 – Curva padrão de açúcar redutor.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Foram colocados 50 μL de amostra com 450 μL de água destilada e 750 μL de DNS em cada tubo de ensaio, depois foram aquecidos à 100°C em banho maria, e em seguida foram resfriados à temperatura ambiente. As absorbâncias das soluções foram lidas à 540 nm após zerar o aparelho com o branco, que continha apenas água destilada e o reagente DNS. A partir da equação da reta foram realizados os cálculos da concentração de açúcares redutores presentes em cada amostra, considerando as diluições das amostras para a leitura.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados apresentados a seguir são referentes a recuperação de massa e a massa solubilizada das amostras após tratamento, a remoção de lignina, e ao rendimento de conversão de celulose na hidrólise enzimática, para avaliar a diferença dos pré-tratamentos nos materiais lignocelulósicos através dos valores obtidos sob as diferentes condições.

5.1 Caracterização química da biomassa

O pré-tratamento provoca solubilização dos componentes lignocelulósicos (AGUILAR et al., 2002), sendo assim a diferença de massa após o tratamento pode ser relacionada com a estrutura do material e sua recalcitrância, ou seja, quanto maior a variação de massa menos recalcitrante será o material (BENJAMIN et al., 2013).

A hidrólise ácida pode causar perdas de massas que não são proporcionais ao teor de lignina em todos os ensaios, isso ocorre pois em alguns casos há a hidrólise parcial dos polissacarídeos, especialmente das xilanas, que apresentam grande susceptibilidade à despolimerização em meio ácido (SILVA et al., 1998).

Os materiais auto-hidrolisados atingiram em média uma perda de 1,20 g, demonstrando maior perda de massa nos ensaios de maior duração (55 e 63,28 minutos) (Tabela 3). As biomassas pré-tratadas com ácido diluído obtiveram uma perda maior de massa em relação as auto-hidrolisadas, aproximadamente 1,38 g com ácido acético (Tabela 4), e 2,57 g com ácido sulfúrico (Tabela 5). Esse aumento de perda de massa ocorreu principalmente em temperaturas mais extremas, devido a reação do ácido com o material ser mais intensa nestas condições, conseguindo assim atingir frações mais recalcitrantes da estrutura lignocelulósica. Nos casos com ácido sulfúrico, que é um ácido mais forte do que o acético, em que houve alta perda de massa em algumas condições destoantes, há probabilidade da estrutura do material da amostra ser menos recalcitrante do que a estrutura dos demais materiais, e assim ter ionizado mais com este reagente, não tendo o mesmo comportamento do que com o ácido acético que é orgânico.

Os bagaços da cana-de-açúcar in natura e pré-tratados foram caracterizados quanto a sua composição química, determinando o teor de lignina (soma da lignina solúvel e insolúvel).

As biomassas que passaram por auto-hidrólise apresentaram em média 21,93 % de lignina, sendo 14,58 % a menor quantia obtida e 27,65 % a maior (Tabela 3). Os melhores resultados tiveram maior relação com um maior período de tempo do que com a temperatura em que foram condicionados.

As biomassas que passaram pelo pré-tratamento com ácido acético diluído tiveram uma média de 23,85 % de lignina, sendo 15,21 % o menor valor obtido e 29,29 % o maior (Tabela 4). A concentração de lignina nas biomassas pré-tratadas com ácido sulfúrico foi em média 29,14 %, sendo a menor porcentagem obtida 19,91 %, e a maior 45,39 % (Tabela 5). As menores quantias encontradas nas amostras que passaram por pré-tratamento com ácido diluído tiveram relação principalmente com os ensaios com menor concentração de ácido e/ou menor temperatura submetida. Ambos os ácidos tiveram um maior teor de lignina nos ensaios com concentração de 2 % m/v, em uma temperatura de 130 °C por 35 minutos. Conforme dito no item 5.1, em algumas amostras podemos considerar que o ácido sulfúrico que é mais forte reagiu ionizando com mais intensidade materiais menos recalcitrantes, o que explica a diferença de alguns valores deste com os do ácido acético.

Tabela 3 – Recuperação de massa, massa solubilizada, e concentração de lignina no bagaço de cana-de-açúcar auto-hidrolisado.

Ensaio	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Recuperação de massa (g)	Massa solubilizada (%)	Lignina (%)
1	15	100	4,02	19,60	24,51 ± 1,98
2	15	160	3,74	25,20	22,48 ± 7,48
3	55	100	3,09	38,20	27,65 ± 3,10
4	55	160	2,85	43,00	26,81 ± 1,66
5	35	87,57	3,91	21,80	24,06 ± 1,27
6	35	172,43	3,59	28,20	16,28 ± 12,16
7	6,72	130	4,35	13,00	18,33 ± 9,94
8	63,28	130	3,38	32,40	24,29 ± 8,02
9	35	130	4,25	15,00	14,58 ± 10,57
10	35	130	4,03	12,00	23,95 ± 2,18
11	35	130	4,55	9,00	18,28 ± 3,34

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 4 – Recuperação de massa, massa solubilizada, e concentração de lignina no bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido acético.

Ensaio	Ácido (%, m/v)	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Recuperação de massa (g)	Massa solubilizada (%)	Lignina (%)
1	1	15	100	3,27	34,60	15,47 ± 7,90
2	1	15	160	3,45	31,00	23,11 ± 1,85
3	1	55	100	3,98	20,40	25,55 ± 1,79
4	1	55	160	2,67	46,60	25,50 ± 0,36
5	3	15	100	3,93	21,40	22,86 ± 1,60
6	3	15	160	3,82	23,60	25,36 ± 1,83
7	3	55	100	3,89	22,20	26,12 ± 1,16
8	3	55	160	2,84	43,20	26,72 ± 1,30
9	2	35	79,55	4,04	19,20	15,21 ± 6,47
10	2	35	180,45	2,76	44,80	25,64 ± 7,22
11	2	1,36	130	3,91	21,80	16,59 ± 2,03
12	2	35	130	3,81	23,80	21,68 ± 6,96
13	0,32	35	130	3,90	22,00	29,06 ± 3,79
14	3,68	35	130	3,62	27,60	25,62 ± 1,52
15	2	35	130	4,06	18,80	29,29 ± 2,25
16	2	35	130	4,10	18,00	22,06 ± 7,82
17	2	35	130	3,50	18,40	28,57 ± 0,91

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 5 – Recuperação de massa, massa solubilizada, e concentração de lignina no bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido sulfúrico.

Ensaio	Concentração (% m/v)	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Recuperação de massa (g)	Massa solubilizada (%)	Lignina (%)
1	1	15	100	3,84	23,20	21,04 ± 2,47
2	1	15	160	2,67	46,60	30,79 ± 4,67
3	1	55	100	2,55	49,00	24,13 ± 0,12
4	1	55	160	0,74	85,20	27,26 ± 0,06
5	3	15	100	2,95	41,00	29,00 ± 2,75
6	3	15	160	1,89	62,20	28,22 ± 5,85
7	3	55	100	2,44	51,20	29,91 ± 1,03
8	3	55	160	1,97	60,60	34,88 ± 5,78
9	2	35	79,55	4,04	19,20	27,72 ± 0,58
10	2	35	180,45	2,61	47,80	31,51 ± 8,92
11	2	1,36	130	3,40	32,00	19,91 ± 2,83
12	2	35	130	2,26	54,80	28,55 ± 2,47
13	0,32	35	130	2,15	57,00	35,14 ± 5,76
14	3,68	35	130	1,44	71,20	24,67 ± 2,73
15	2	35	130	1,93	55,00	45,39 ± 2,73
16	2	35	130	2,33	53,40	24,02 ± 1,41
17	2	35	130	2,16	56,80	33,17 ± 1,86

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2 Hidrólise enzimática das amostras

Foi realizada hidrólise enzimática nas amostras para avaliar o efeito da quantia de lignina do material na digestibilidade da celulose.

As biomassas que foram submetidas a auto-hidrólise resultaram em média em 33,38 mg/g de celulose convertida em glicose, sendo a menor quantia 20,75 mg/g e a maior 38,22 mg/g (Tabela 6). Após pré-tratamento com ácido acético a média aumentou para 38,62 mg/g, tendo como menor valor 15,79 mg/g e como maior 57,56 mg/g (Tabela 7). As amostras pré-tratadas com ácido sulfúrico tiveram os melhores resultados com uma média de 39,36 mg/g de glicose, sendo o menor valor obtido 17,21 mg/g e o maior 59,02 mg/g (Tabela 8).

Houve relação nos rendimentos de glicose com os de lignina que foram submetidos as mesmas condições de reação. Onde houve maior teor de lignina, o acesso a celulose foi menor, e assim na maioria desses casos houve um pior desempenho na sacarificação enzimática. Os valores mais baixos também decorreram das reações com menor temperatura e/ou menor concentração de ácido, entretanto como os demais resultados, os da conversão pra glicose com ácido sulfúrico também foram mais oscilantes, assim como observado no item 5.1 e 5.2.

Tabela 6 – Concentração de glicose no bagaço de cana-de-açúcar auto-hidrolisado.

Pré-tratamento	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Glicose (mg/g)
Auto-hidrólise	15	100	36,75 ± 0,55
	15	160	33,62 ± 0,83
	55	100	33,82 ± 2,07
	55	160	38,22 ± 1,51
	35	87,57	34,23 ± 1,83
	35	172,43	20,75 ± 3,37
	6,72	130	28,53 ± 1,24
	63,28	130	37,08 ± 1,65
	35	130	33,98 ± 5,69
	35	130	35,57 ± 1,10
	35	130	33,50 ± 0,12

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 7 – Concentração de glicose no bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido acético.

Pré-tratamento	Concentração (% m/v)	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Glicose (mg/g)
Ácido acético	1	15	100	34,80 ± 3,20
	1	15	160	22,75 ± 1,89
	1	55	100	27,43 ± 3,05
	1	55	160	58,74 ± 1,30
	3	15	100	31,34 ± 0,72
	3	15	160	41,15 ± 0,66
	3	55	100	53,24 ± 1,50
	3	55	160	57,56 ± 0,18
	2	35	79,55	15,79 ± 0,46
	2	35	180,45	45,26 ± 0,27
	2	1,36	130	38,71 ± 3,33
	2	35	130	40,74 ± 2,21
	0,32	35	130	29,71 ± 1,07
	3,68	35	130	46,36 ± 0,82
	2	35	130	31,99 ± 0,16
	2	35	130	37,04 ± 1,77
	2	35	130	44,00 ± 4,16

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 8 – Concentração de glicose no bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido sulfúrico.

Pré-tratamento	Concentração (% m/v)	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Glicose (mg/g)
Ácido sulfúrico	1	15	100	48,56 ± 6,73
	1	15	160	59,02 ± 0,94
	1	55	100	44,90 ± 1,19
	1	55	160	18,11 ± 0,20
	3	15	100	49,58 ± 6,80
	3	15	160	39,16 ± 1,42
	3	55	100	48,68 ± 3,35
	3	55	160	17,21 ± 0,28
	2	35	79,55	38,50 ± 1,07
	2	35	180,45	32,28 ± 1,75
	2	1,36	130	53,81 ± 0,62
	2	35	130	43,06 ± 3,91
	0,32	35	130	45,59 ± 3,59
	3,68	35	130	35,74 ± 2,84
	2	35	130	31,09 ± 1,02
	2	35	130	36,92 ± 1,70
	2	35	130	26,86 ± 0,64

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3 Correlação entre teores de lignina e glicose

SALIBA et al. (1998) verificaram que a lignina moída e isolada com solventes orgânicos é a ideal para estudos de caracterização pois sofre poucas modificações. Esse isolamento da lignina envolve o preparo de amostras livres de extrativos, a partir de uma técnica empregada que não cause alterações de natureza química, ocasionando mudanças estruturais, em que a lignina resultante difere da original presente no vegetal.

Os processos básicos de isolamento são três, nesse estudo foi utilizado o método como resíduo, que é o método de Klason, no qual pela hidrólise ácida os polissacarídeos são removidos e a lignina é liberada como resíduo (FENGEL & WEGENER, 1984).

A porcentagem de lignina nas amostras deste estudo é semelhante a resultados obtidos em outras pesquisas, que apontam uma média de 20-30 % de lignina após tratamento ácido (BENJAMIN et al., 2013).

O bagaço de cana-de-açúcar é um material rico em celulose que pode ser convertida em glicose por hidrólise enzimática. Entretanto, a associação da lignina e da hemicelulose a esse polímero dificulta a ação das enzimas celulolíticas nessa conversão.

Quando compara-se as Tabela 3, 4 e 5 com as Tabela 6, 7 e 8 nota-se que nos ensaios de maior produção de glicose, coincidiu com amostras com menor teor de lignina. A lignina remanescente nas amostras prejudicou o rendimento da hidrólise enzimática por impor restrições estruturais sobre a celulose, pois são ligadas de maneira que retardam o ataque enzimático.

Apesar dos valores de conversão de celulose em glicose deste estudo poderem ter ligação com a quantidade de lignina presente no bagaço pré-tratado pois a presença de lignina é um das dificuldades mais notórias para o ataque enzimático à estrutura da celulose, é possível obter altos rendimentos de conversão mesmo com porcentagens de lignina relativamente altas no bagaço pré-tratado, o que indica que apenas as quantidades de lignina removidas não são um indicativo da eficiência do pré-tratamento.

Garcia (2009), usando o bagaço de cana-de-açúcar em seus ensaios obteve rendimentos próximos de 100 % na hidrólise de bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino com porcentagem de lignina de 9,87 % e de xilana de 16,58 %. Fuentes (2009) obteve rendimentos em torno de 80 % na hidrólise de bagaço pré-tratado com meio alcalino cuja porcentagem de lignina era de 15,6 % e de hemicelulose de 21,3 %, também usando bagaço de cana-de-açúcar.

Estes resultados indicam que não apenas a remoção destes componentes, mas também a alteração na estrutura do material causada pelo pré-tratamento são importantes para obter altos rendimentos na hidrólise enzimática.

5.4 Análise da interferência dos pré-tratamentos

Com base nos resultados obtidos e em outros estudos realizados, foi possível notar que a concentração de glicose e lignina é afetada por pré-tratamentos com ácidos, principalmente com o ácido sulfúrico (SANTOS et al., 2018; AGUILAR et al., 2002; DOMINGUEZ et al., 2008).

O ácido sulfúrico usado como agente no pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar solubiliza a xilana e apenas uma pequena parte da lignina, além de redistribuir a estrutura química da lignina remanescente no bagaço. Usando tratamentos ácidos é necessário uma grande alteração na lignina para que os rendimentos de conversão obtidos não sejam baixos (GIA-LUEN GUO et al., 2009).

A atividade durante a conversão enzimática da fração celulósica nos materiais pré-tratados está estritamente relacionada às propriedades estruturais do material lignocelulósico, sendo assim o pré-tratamento com ácidos diluídos pode ser empregado a vários níveis com o objetivo de ajustar essas propriedades (BERLIN et al., 2006).

Usando 2 % de ácido sulfúrico a 100 °C, Aguilar et al. (2002) concluiu que apenas 5 % de celulose foi suscetível à hidrólise ácida, entretanto em condições mais estritas com 6 % de ácido sulfúrico a 128 °C, 51 % foi suscetível. Além disso, ele observou que em experimentos a 100 ou 122 °C essa porcentagem sempre foi inferior do que 18,2 %, sendo assim altas temperaturas são claramente relacionadas com o aumento de glicose, pois nestas condições que a celulose é hidrolisada, onde a região cristalina, além da amorfa, também reage (AGUILAR et al., 2002).

Outras amostras submetidas a hidrólise com ácido sulfúrico demonstraram resultados semelhantes ao deste estudo, Canilha et al (2011) apontou que o ácido sulfúrico a 2 % (m/v), temperatura de 150 °C por 30 minutos revelou serem as melhores condições para a hidrólise do bagaço. Essa influência também foi notada neste estudo devido os melhores valores obtidos estarem submetidos a condições semelhantes. A temperatura foi o fator que mais influenciou nos teores liberados, seguida pela concentração de ácido, e por fim o tempo de permanência, nessa ordem.

Fangkum e Reungsang (2010) também realizaram hidrólise do bagaço com ácido sulfúrico, mas em concentrações de 0,25 e 5,0 % com tempo de reação de 60 minutos a 121 °C, e obtiveram o maior teor de glicose de 1,46 g/L com 1,0 % de concentração do ácido.

Em um estudo de Gómez et al. (2010) onde houve uma variação de concentração de ácido sulfúrico no pré-tratamento entre 0,5 e 3,5 % (m/v), tempo de reação entre 15 e 180 minutos, a temperatura de 130 °C, e o bagaço foi hidrolisado por uma celulase comercial produzida por *Trichoderma reesei* (Sigma) e β -glicosidase de *Aspergillus niger* (Sigma) em concentração de 7 FPU/g e 3,5 UI/g respectivamente. A combinação do pré-tratamento com ácido sulfúrico (0,5% (m/v) de ácido, por 15 minutos e a 130 °C) e da hidrólise enzimática resultou em 414,9 mg/g.

Schultz et al. (2017) realizou para cada grama de celullignina o correspondente a 15 FPU do complexo enzimático Cellic CTec3 (Novozymes), sob agitação constante de 200 rpm na temperatura de 50 °C, obtendo os melhores resultados de hidrólise com a combinação da hidrólise ácida a 1,5 % em volume de ácido sulfúrico em 56 minutos de reação, que atingiram 24,7 g/L de glicose em uma conversão de 42,1%.

Em um estudo de Gómez-Rueda (2010) com pré-tratamento com ácido sulfúrico, verificou-se máxima produção de glicose a 100 °C por 15 minutos e 0,5 % p/v de ácido sulfúrico, quando passou por deslignificação com 1 % p/v de hidróxido de sódio por 1 hora à 100 °C atingindo um rendimento aproximado de 92 % de conversão na hidrólise com concentração de enzima de celulase de 15 FPU/g e de β -glicosidase de 7,5 CBU/g.

A carga enzimática e as características estruturais estão intimamente interligadas na hidrólise enzimática, ou seja, biomassas com estruturas mais acessíveis para a enzima necessitarão de menores cargas de enzima para atingir elevados teores de açúcares, enquanto a digestibilidade da biomassa mais recalcitrante pode ser parcialmente melhorada com altas cargas enzimáticas. Devido ao alto preço das enzimas, é de interesse que a quantidade de enzima necessária para atingir altos rendimentos na hidrólise enzimática, seja reduzida.

Neste estudo o bagaço pré-tratado com ácido acético e sulfúrico diluídos demonstrou que não ocorreu remoção da lignina presente, como pode ser visto na Tabela 3, 4 e 5. De fato, os rendimentos na hidrólise enzimática foram baixos (Tabela 6, 7 e 8), o que pode ser atribuído à condensação da lignina no bagaço pré-tratado em presença de ácidos. Uma solução para melhorar essa suscetibilidade na hidrólise enzimática seria adicionar uma etapa de deslignificação para remoção da lignina remanescente no bagaço, e dos subprodutos formados, permitindo assim alcançar rendimentos mais altos na etapa de hidrólise.

5.5 Análise estatística

5.5.1 Auto-hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar

A análise estatística foi realizada utilizando o software Statistica, considerando nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). Para a autohidrólise foram identificados como significativos as variáveis temperatura e tempo. Os dados apresentaram ajuste ao modelo, com um R^2 de 0,87 (Tabela 9). A superfície de resposta indica que a maior solubilização ocorre nas condições extremas, maior temperatura e tempo de reação (Figura 11).

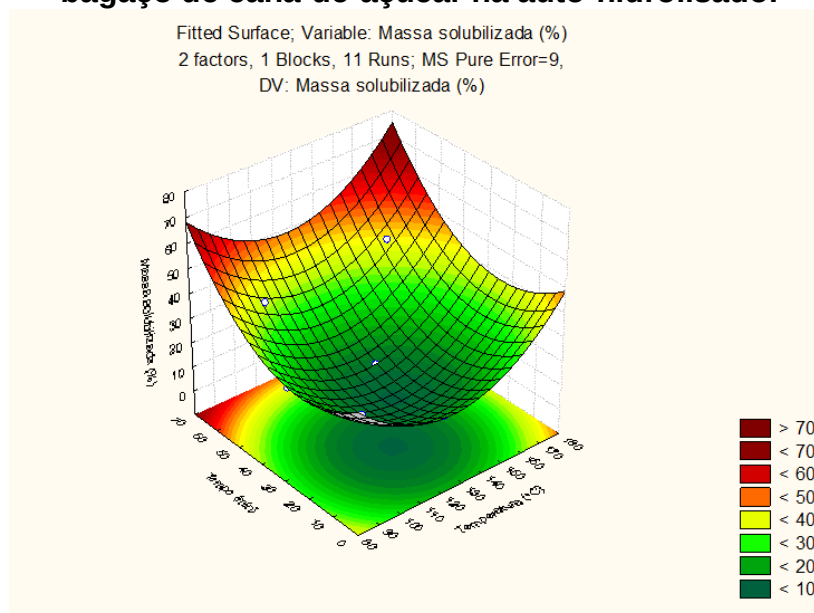
Tabela 9 - Análise de variância (ANOVA) para variáveis dependentes na solubilização de massa (%) do bagaço de cana-de-açúcar na auto-hidrólise.

Factor	SQ	GL	MQ	F	P
Temperatura (°C) (L)	47,292	1	47,292	5,25469	0,148932
Temperatura (°C) (Q)	399,588	1	399,588	44,39868	0,021790
Tempo (min) (L)	509,386	1	509,386	56,59845	0,017213
Tempo (min) (Q)	297,926	1	297,926	33,10287	0,028905
Temperatura * Tempo (L)	0,160	1	0,160	0,01778	0,906135
Falta de ajuste	127,283	3	42,4277	4,71419	0,179963
Erro puro	18,000	2	9,000		
Total	1243,520	10			
$R^2 = 0.87$					

SQ: soma dos quadrados; GL: grau de liberdade; MQ: média dos quadrados.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 11 – Superfície de resposta para massa solubilizada do bagaço de cana-de-açúcar na auto-hidrolisado.



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.5.2 Hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar com ácido acético

No pré-tratamento ácido diluído as variáveis significativas foram temperatura, tempo e concentração de ácido (Tabela 10). Apesar de apresentar um R^2 de 0,87, não foi observado um bom ajuste entre os dados experimentais e os dados previstos pelo modelo. Uma vez que a falta de ajuste foi significativa, a superfície de resposta não foi utilizada. Entretanto, plotando os rendimentos em função das condições experimentais de temperatura e concentração de ácido, observou-se que os maiores rendimentos estão na região de maior temperatura (Figura 12).

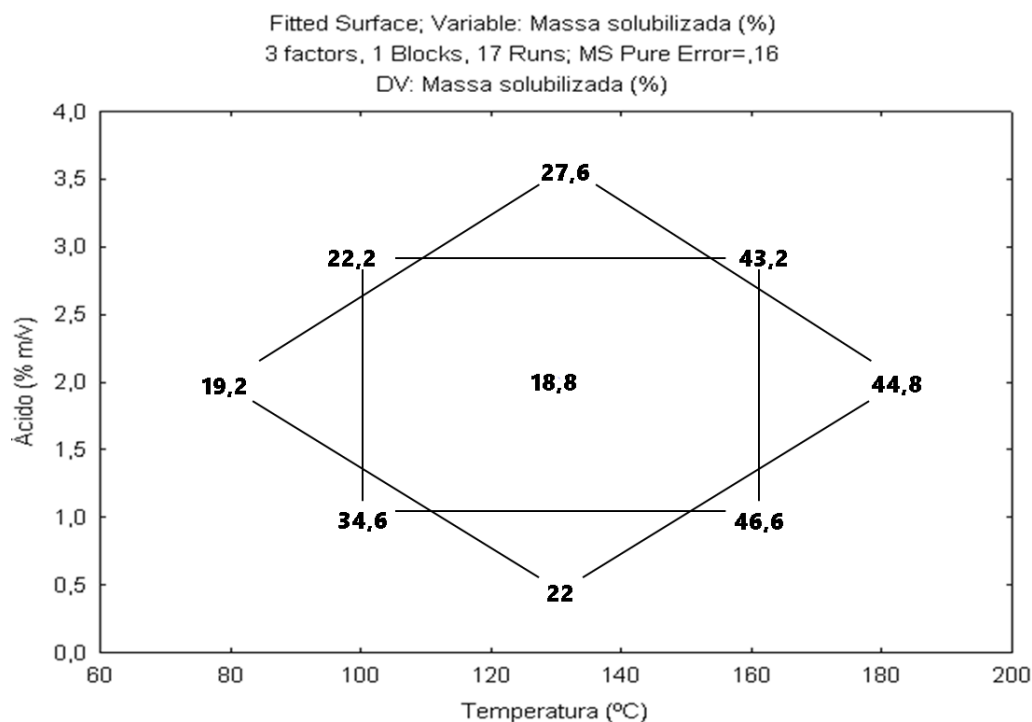
Tabela 10 - Análise de variância (ANOVA) para variáveis dependentes na solubilização de massa (%) do bagaço de cana-de-açúcar na hidrólise com ácido acético.

Factor	SQ	GL	MQ	F	P
Temperatura (°C) (L)	578,093	1	578,083	3613,081	0,000227
Temperatura (°C) (Q)	347,465	1	347,465	2171,655	0,000460
Tempo (min) (L)	46,362	1	46,362	289,764	0,003433
Tempo (min) (Q)	59,539	1	59,539	372,116	0,002677
CH ₃ COOH (% m/v) (L)	11,993	1	11,993	74,953	0,013080
CH ₃ COOH (% m/v) (Q)	102,0022	1	102,0022	637,154	0,001565
Temperatura * Tempo (L)	295,245	1	295,245	1845,281	0,000541
Temperatura * CH ₃ COOH (L)	0,045	1	0,045	0,281	0,648877
Tempo * CH ₃ COOH (L)	45,125	1	45,125	282,031	0,003527
Falta de ajuste	142,845	5	28,5690	178,556	0,005579
Erro puro	0,320	2	0,160		
Total	1492,249	16			
R ² = 0.87					

SQ: soma dos quadrados; GL: grau de liberdade; MQ: média dos quadrados

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 12 – Porcentagem de massa solubilizada do bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado com ácido acético.



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.5.3 Hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar com ácido sulfúrico

No pré-tratamento ácido sulfúrico diluído do bagaço de cana-de-açúcar com as variáveis significativas foram temperatura, tempo e concentração de ácido (Tabela 11). A superfície de resposta indica que a maior solubilização de massa pode ser obtida com temperatura entre 140 e 160°C. Nesta reação, a concentração de ácido apresentou menor influência (Figura 13).

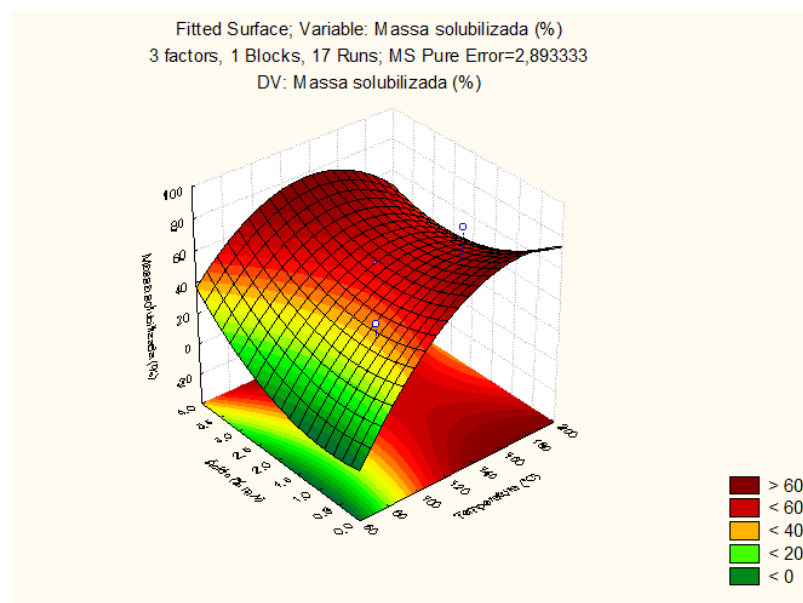
Tabela 11 - Análise de variância (ANOVA) para variáveis dependentes na solubilização de massa (%) do bagaço de cana-de-açúcar na hidrólise com ácido sulfúrico.

Factor	SQ	GL	MQ	F	P
Temperatura (°C) (L)	1400,533	1	1400,533	484,0553	0,002059
Temperatura (°C) (Q)	450,994	1	450,994	155,8734	0,006354
Tempo (min) (L)	907,784	1	907,784	313,7501	0,003172
Tempo (min) (Q)	89,938	1	89,938	31,0846	0,030697
CH ₃ COOH (% m/v) (L)	89,041	1	89,041	30,7744	0,030992
CH ₃ COOH (% m/v) (Q)	228,205	1	228,205	78,8726	0,012443
Temperatura * Tempo (L)	0,125	1	0,125	0,0432	0,854588
Temperatura * CH ₃ COOH (L)	105,125	1	105,125	36,3335	0,026436
Tempo * CH ₃ COOH (L)	389,205	1	389,205	134,5179	0,007352
Falta de ajuste	255,532	5	51,106	17,6635	0,054444
Erro puro	5,787	2	2,893		
Total	4179,802	16			
R ² = 0.87					

SQ: soma dos quadrados; GL: grau de liberdade; MQ: média dos quadrados.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 13 - Superfície de massa solubilizada do bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado com ácido sulfúrico.



Fonte: Elaborado pelo autor.

6. CONCLUSÃO

Após o pré-tratamento com ácido, principalmente com ácido sulfúrico, foi possível obter melhores rendimentos de conversão de celulose em glicose pela hidrólise enzimática, corroborando dados das literaturas, pois provavelmente houve uma maior alteração na estrutura da lignina. A alteração na estrutura da lignina favorece a hidrólise enzimática e possibilita melhor liberação de glicose.

A quantidade de lignina remanescente nas amostras, assim como prováveis alterações na estrutura do material lignocelulósico causadas pelos pré-tratamentos, também devem ser considerados como prováveis razões prejudiciais a etapa de hidrólise, podendo ser responsáveis pelos menores rendimentos de conversão da celulose em glicose.

A celulose pode ser utilizada em muitos produtos, sendo assim resíduos agrícolas como o bagaço de cana-de-açúcar e técnicas de pré-tratamento com ácido, como a deste trabalho, podem servir como uma excelente alternativa renovável para uma variedade de produtos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADITIVOS & INGREDIENTES. **A celulose microcristalina na indústria de alimentos**. Revista nº 148, p. 50-57, 2018.

AGÊNCIA NACIONAL DE ENERGIA ELÉTRICA (ANEEL). **Atlas de Energia Elétrica**. 3. ed. Brasília: Aneel, p. 236, 2008.

AGUILAR, R., RAMIREZ, J.A., GARROTE, G., & VAZQUEZ, M. **Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse**. Journal of Food Engineering, 55 (4), p. 309–318, 2002.

ALBERTS, B. et al. **Fundamentos da Biologia Celular**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, p. 145-159, 2006.

ANWARA, Z., GULFRAZB, M., IRSHADA, M. **Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review**. Journal of Radiation and Applied Science, v. 7 (2), p. 163-173, 2014.

ARAÚJO, C. R. et al. **Estudo das rotas de hidrólise química e biológica para a produção de etanol de segunda geração a partir de resíduos lignocelulósicos.** Revista Eletrônica SEPA - Seminário Estudantil de Produção Acadêmica, UNIFACS, v. 12, 2013.

ARGYROPOULOS, D. S., & MENACHEM, S. B. **Lignin.** In **Biopolymers from renewable resources.** Springer Berlin Heidelberg, p. 292-322, 1998.

ASGHER, M., AHMAD, Z. IQBAL, H. M. N. **Alkali and enzymatic delignification of sugarcane bagasse to expose cellulose polymers for saccharification and bio-ethanol production.** Industrial Crops and Products, v 44, p. 488-495, 2013.

BALAT, M., BALAT, H., OZ, C. **Progress in Bioethanol Processing.** Progress in Energy and Combustion Science, v. 34, p. 551-573, 2008.

BATALHA, L.A., HAN, Q., JAMEEL, H., CHANG, H.M., COLODETTE, J.L., BORGES GOMES, F.J. **Production of fermentable sugars from sugarcane bagasse by enzymatic hydrolysis 13 after autohydrolysis and mechanical refining.** Bioresource Technology, 180, p. 97-105, 2015.

BEHERA, S., ARORA, R., NANDHAGOPAL, N., KUMAR, S. **Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass.** Renewable and Sustainable Energy Reviews, v 36, p. 91-106, 2014.

BENJAMIN, Y., CHENG, H., & GÖRGENS, J. F. **Evaluation of bagasse from different varieties of sugarcane by dilute acid pretreatment and enzymatic hydrolysis.** Industrial crops and products, 51, p. 7-18, 2013.

BERLIN A., BALAKSHIN M. AND GILKES N, KADLA J. **Inhibition of cellulase, xylanase and B-glucosidase activities by softwood lignin preparations.** J Biotechnol, v.125, p.198–209, 2006.

BRIENZO, M., FIKIZOLO, S., BENJAMIN, Y., TYHODA, L., & GÖRGENS, J. **Influence of pretreatment severity on structural changes, lignin content and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse samples.** Renewable Energy, 104, p. 271-280, 2017.

BRIENZO, M., TYHODA, L., BENJAMIN, Y., & GÖRGENS, J. **Relationship between physicochemical properties and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse varieties for bioethanol production.** New biotechnology, 32(2), p. 253-262, 2015.

BRODEUR, G., YAU, E., BADAL, K., COLLIER, J., RAMACHANDRAN, K. B., & RAMAKRISHNAN, S. **Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: a review.** Enzyme research, 2011.

CALIARI, Í. P., BARBOSA, M. H., FERREIRA, S. O., & TEÓFILO, R. F. **Estimation of cellulose crystallinity of sugarcane biomass using near infrared spectroscopy and multivariate analysis methods.** Carbohydrate polymers, 158, p. 20-28, 2017.

CANILHA, L., SANTOS, V. T., ROCHA, G. J., E SILVA, J. B. A., GIULIETTI, M., SILVA, S. S., ... & CARVALHO, W. **A study on the pretreatment of a sugarcane bagasse sample with dilute sulfuric acid.** Journal of industrial microbiology & biotechnology, 38(9), p. 1467-1475, 2011.

CARERE, C. R., SPARLING, R., CICEK, N., LEVIN, D. B. **Third generations biofuels via direct cellulose fermentation.** International Journal Molecular Science, v 9., p. 134213-134260, 2008.

CHANG, V. S., HOLTZAPPLE M. T. **Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity.** Applied Biochemistry and Biotechnology, New York, v 84/86, p. 5-37, 2000.

COSGROVE, D. J. **Growth of the plant cell wall.** Nature reviews molecular cell biology, 6(11), p. 850-861, 2005.

DADI, A. P., VARANASI, S., SCHALL, C. A. **Enhancement of cellulose saccharification kinetics using an ionic liquid pretreatment step.** Biotechnology Bioengineering, v. 95, p. 904-910, 2006.

DA SILVA, A. S. A., TEIXEIRA, R. S. S., DE OLIVEIRA MOUTTA, R., FERREIRA-LEITÃO, V. S., DE BARROS, R. D. R. O., FERRARA, M. A., & DA SILVA BON, E. P. **Sugarcane and woody biomass pretreatments for ethanol production.** Sustainable degradation of lignocellulosic biomass-techniques, applications and commercialization, p. 47-88, 2013.

DAVISON, B. H., PARKS, J., DAVIS, M. F., & DONOHUE, B. S. **Plant cell walls: basics of structure, chemistry, accessibility and the influence on conversion.** Aqueous Pretreatment of Plant Biomass for Biological and Chemical Conversion to Fuels and Chemicals, p. 23-38, 2013.

DING, S. Y., HIMMEL, M. E. **The maize primary cell wall microfibril: a new model derived from direct visualization.** Journal of Agriculture and Food Chemistry, Washington, v. 54, p. 597-606, 2006.

DOMINGUEZ, J. C., OLIET, M., ALONSO, M. V., GILARRANZ, M. A., RODRIGUEZ, F. **Thermal stability and pyrolysis kinetics of organosolv lignins obtained from Eucalyptus globulus.** Ind. Crops Prod, 27, p. 150–156, 2008.

DU, B., SHARMA, L. N., BECKER, C., CHEN, S. F., MOWERY, R. A., VAN WALSUM, G. P., & CHAMBLISS, C. K. **Effect of varying feedstock-pretreatment chemistry combinations on the formation and accumulation of potentially inhibitory degradation products in biomass hydrolysates.** *Biotechnology and Bioengineering*, 107(3), p. 430-440, 2010.

FANGKUM, A.; REUSANG, A. **Biohydrogen production from sugarcane bagasse hydrolysate by elephant dung: Effects of initial pH and substrate concentration.** *International Journal of Hydrogen Energy*, 36, p. 8687-8696, 2010.

FENGEL, D., WEGENER, G. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions.** Berlin: Walter de Gruyter, p. 613, 1989.

FERNANDO, S.; ADHIKARI, S.; CHANDRAPAL, C.; MURALI, N. **Biorefineries: Current Status, Challenges, and Future Direction.** *Energy & Fuels*, 20, p. 1727-1737, 2006.

FERREIRA, V. F., ROCHA, D. R., SILVA, F. C. **Potencialidades e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares.** Universidade Federal Fluminense, Departamento de Química Orgânica, 240, p. 20-141, 2009.

FITZPATRICK, S. W. **Final technical report: Commercialization of the Biofine technology for levulinic acid production from paper sludge.** FINAL n. DOE/CE-41178, BioMetics, 2002.

FUENTES, L. G. **Determinação de dados cinéticos da deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar e da hidrólise enzimática no pré-tratamento com hidróxido de cálcio.** Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Dissertação (Mestrado), 2009.

GARCIA, D. R. **Determinação de dados cinéticos do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com peróxido de hidrogênio alcalino e da hidrólise enzimática posterior.** Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Dissertação (Mestrado), 2009.

GIA-LUEN GUO, DENG-CHIEH HSU, WEN-HUA CHEN, WEI-HSICHEN, WEN-SONG HWANG. **Characterization of enzymatic saccharification for acid-pretreated lignocellulosic materials with different lignin composition.** *Enzyme and Microbial Technology*, 45, p. 80-87, 2009.

GÓMEZ, S. M. R.; ANDRADE, R. R.; SANTANDER, C. G.; COSTA, A. C.; MACIEL, F. R. **Pretreatment of sugar cane bagasse with phosphoric and sulfuric diluted acid for fermentable sugars production by enzymatic hydrolysis.** *Chemical Engineering Transactions*, v. 20, 2010.

GÓMEZ-RUEDA, S. M. **Pré-tratamento e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar.** Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Dissertação (mestrado), p. 130, 2010.

GONÇALVES, A. R., GUIMARÃES, R. C. O. **Abstracts 14th Intern. Symp. Anal. Appl. Pyrolysis.** Sevilha, p. 142, 2000.

GONÇALVES, C.; RODRIGUEZ-JASSO, R. M.; GOMES, N.; TEIXEIRA, J. A.; BELO, I. **Adaptation of dinitrosalicylic acid method to microtiter plates.** Analytical Methods, London, v. 2, p. 2046-2048, 2010.

GUERRIERO, G., HAUSMAN, J. F., STRAUSS, J., ERTAN, H., & SIDDIQUI, K. S. **Lignocellulosic biomass: Biosynthesis, degradation, and industrial utilization.** Engineering in Life Sciences, 16(1), p. 1-16, 2016.

GUSTAFSSON, J., CIOVICA, L., PELTONEN, J. **The ultrastructure of spruce kraft pulps studied by atomic force microscopy (AFM) and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS).** Polymer 44 (3), p. 661–670, 2003.

HAO, X., WENXIAO, P., RUOXI, W., DONGJU, Z., CHENGBU, L. **Understanding the mechanism of cellulose dissolution in 1-butyl-3-methylimidazolium chloride ionic liquid via quantum chemistry calculations and molecular dynamics simulations.** Journal of Computer-Aided Molecular Design, v. 26, p. 329, 2012.

HIDENO, A., INOUE, H., TSUKAHARA, K., FUJIMOTO, S., MINOWA, T., INOUE, S., ... & SAWAYAMA, S. **Wet disk milling pretreatment without sulfuric acid for enzymatic hydrolysis of rice straw.** Bioresource Technology, 100(10), p. 2706-2711, 2009.

KELLER, F. A., HAMILTON, J. E., & NGUYEN, Q. A. **Microbial pretreatment of biomass.** Applied biochemistry and biotechnology, 105, p. 27-41, 2003.

KONDO, T. **The relationship between intramolecular hydrogen bonds and certain physical properties of regioselectively substituted cellulose derivatives.** Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics, 35, p. 717, 1997.

KUMAR, R., MAGO, G., BALAN, V., & WYMAN, C. E. **Physical and chemical characterizations of corn stover and poplar solids resulting from leading pretreatment technologies.** Bioresource Technology, 100(17), p. 3948-3962, 2009.

LAUREANO-PEREZ, L., TEYMOURI, F., ALIZADEH, H., & DALE, B. E. **Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass.** Applied Biochemistry and Biotechnology, 124(1-3), p. 1081-1099, 2005.

LEI, H., CYBULSKA, I., JULSON, J. **Hydrothermal pretreatment of lignocellulosic biomass and kinetics.** J. Sust. Bioenerg. Syst. 3(04), p. 250, 2013.

LIN, Z., HUANG, H., ZHANG, H., ZHANG, L., YAN, L., & CHEN, J. **Ball milling pretreatment of corn stover for enhancing the efficiency of enzymatic hydrolysis.** Applied Biochemistry and Biotechnology, 162(7), p. 1872-1880, 2010.

LISSENS, G., THOMSEN, A. B., DE BAERE, L., VERSTRAETE, W., AHSRING, B. K. **Thermal wet oxidation improves anaerobic biodegradability of raw and digested biowaste.** Environmental Science & Technology. v 38, p. 3418-3424, 2004.

LIU, C., & WYMAN, C. E. **The effect of flow rate of very dilute sulfuric acid on xylan, lignin, and total mass removal from corn stover.** Industrial & engineering chemistry research, 43(11), p. 2781-2788, 2004.

LU, Y., YANG, B., GREGG, D., SADDLER, J. N., & MANSFIELD, S. D. **Cellulase adsorption and an evaluation of enzyme recycle during hydrolysis of steam-exploded softwood residues.** Applied biochemistry and biotechnology, 98(1-9), p. 641-654, 2002.

MELATI, R. B., SHMATZ, A. A., PAGNOCCA, F. C. et al. **Sugarcane: production system, uses and economic importance.** Agriculture issues and policies, p. 9-15, 2017.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). **Agricultura Sustentável.** Brasília: MMA, p. 57, 2000.

MOOD, S. H., GOLFESHAN, A. H., TABATABAEI, M., JOUZANI, G. S., NAJAFI, G. H., GHOLAMI, M., ARDJMAND, M. **Lignocellulosic Biomass to Bioethanol, a Comprehensive Review with a Focus on Pretreatment.** Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 27, p. 77–93, 2013.

MOONEY, C. A., MANSFIELD, S. D., TOUHY, M. G., & SADDLER, J. N. **The effect of initial pore volume and lignin content on the enzymatic hydrolysis of softwoods.** Bioresource Technology, 64(2), p. 113-119, 1998.

MORO, M. K.. **Pré-tratamento da biomassa de cana-de-açúcar por extrusão com dupla-rosca.** Universidade Federal do Rio de Janeiro, Dissertação (Mestrado), 119, 2015.

MOSIER, N., WYMAN, C., DALE, B., ELANDER, R., LEE, Y.Y., HOLTZAPPLE, M., LADISCH, M. **Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass.** Bioresour Technol, 96, p. 673–686, 2005.

NEGRULESCU, A.; PATRULEA, V.; MINCEA, M. M.; IONASCU, C.; VLAD-OROS, B. A.; OSTAFE, V. **Adapting the reducing sugars method with dinitrosalicylic acid to microtiter plates and microwave heating.** Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 23, n. 12, p. 2176-2182, 2012.

NELSON, D. L.; Cox, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger.** Porto Alegre: Artmed, 5 ed., p. 183-233, 2011.

NISHIYAMA, Y.; LANGAN, P.; CHANZY, H.; LANGAN C. **Crystal Structure and Hydrogen-Bonding System in Cellulose I β from Synchrotron X-ray and Neutron Fiber Diffraction.** J. Am. Chem. Soc, 124 (31), 90, p. 74–82, 2002.

NOVOZYMES, S/A. **Cellic CTec2 and HTec2 - Enzymes for hydrolysis of lignocellulosic materials.** Fuel ethanol. Application sheet, 2010.

OOSHIMA, H., BURNS, D. S., & CONVERSE, A. O. **Adsorption of cellulase from Trichoderma reesei on cellulose and lignocellulosic residue in wood pretreated by dilute sulfuric acid with explosive decompression.** Biotechnology and Bioengineering, 36(5), p. 446-452, 1990.

ÓRFÃO, J. J. M., FIGUEIREDO, J. L. **A simplified method for determination of lignocellulosic materials pyrolysis kinetics from isothermal thermogravimetric experiments.** Thermochimica Acta. v. 380, p. 67-78, 2001.

PAGE, D. H. **A note on the cell-wall structure of softwood tracheids.** Wood & Fiber, v. 7, p. 246-8, 1976.

PALONEN, H. **Role of lignin in the enzymatic hydrolysis of lignocellulose.** VTT Technical Research Centre of Finland, 2004.

PEREIRA, N. J., COUTO, M. A. P. G., SANTA ANNA L. M. M. **Biomass of Lignocellulosic Composition for fuel ethanol production within the context of biorefinery.** Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2008.

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.** Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Tese de Doutorado, 2010.

RABELO, S. C., CARRERE, H., MACIEL FILHO, R., COSTA, A. C. **Production of Bioethanol, Methane and Heat from Sugarcane Bagasse in a Biorefinery Concept.** Bioresource Technology, v. 102, p. 7887–7895, 2011.

ROSA, M. F. et al. **Valorização de Resíduos da Agroindústria.** In: II Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais – II SIGERA, 2011.

SAAKE, B., & LEHNEN, R. **Lignin**. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 2007.

SALIBA, E. O. S., RODRIGUEZ, N. M., BARRETO, S. L. T., et al. **Isolation and infrared spectroscopic characterization of lignin from boter corn and soybean agricultural residues**. Arq Bras Me.d Vet Zootec, v. 50, n. 6, p. 727-730, 1998.

SANTOS, C. C., DE SOUZA, W., SANT'ANNA, C., & BRIENZO, M. **Elephant grass leaves have lower recalcitrance to acid pretreatment than stems, with higher potential for ethanol production**. Industrial Crops and Products, 111, p. 193-200, 2018.

SCHULTZ, E. L.; RODRIGUES, A. de A.; MENDES, T. D.; MENDES, T. D.; CAMPANHA, R. B.; PACHECO, T. F.; RODRIGUES, D. de S.; RODRIGUES, C. M.; DAMASO, M. C. T. **Otimização de pré-tratamento ácido do bagaço de cana-de-açúcar para obtenção de açúcares fermentescíveis**. Embrapa Agroenergia, 2017.

SHIMIZU, F. L. **Remoção de lignina e hemicelulose: influência na acessibilidade à celulose e sacarificação enzimática**. Universidade Estadual Paulista, Dissertação (mestrado), 2018.

SILVA, D. J.; D'ALMEIDA, M. L. O. **Nanocristais de celulose**. Revista O Papel, 2009.

SILVA, R. N.; MONTEIRO, V. N.; ALCANFOR, J. A. X.; ASSIS, E. M.; ASQUIERI, E.; SILVA, S. S., CARVALHO, R. R., FONSECA, J. L. C., GARCIA, R. B. **Extração e Caracterização de Xilanas de Sabugos de Milho**. Polímeros: Ciência e tecnologia, 1998.

SOARES, I. B., TRAVASSOS, J. A., BAUDEL, H. M., BENACHOUR, M., ABREU, C. A. M. **Effects of washing, milling and loading enzymes on the enzymatic hydrolysis of a steam pretreated sugarcane bagasse**. Industrial Crops and Products, v. 33, p. 670–675, 2011.

SOMERVILLE, C. **Cellulose synthesis in higher plants**. Annu. Rev. Cell Dev. Biol., v. 22, p. 53-78, 2006.

TABIL, L., ADAPA, P., KASHANINEJAD, M. **Biomass feedstock pre-processing-Part-1: Pretreatment**. In: M. A. D. S. Bernardes, editor. Biofuel's engineering process technology. 18, p. 411-438, 2011.

TAHERZADEH, M. J., KARIMI, K. **Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review**. BioResources, v. 2, p. 472-499, 2007.

TAHERZADEH, M. J., & KARIMI, K. **Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review.** International journal of molecular sciences, 9(9), p. 1621-1651, 2008.

TRAJANO, H. L., & WYMAN, C. E. **Aqueous pretreatment of plant biomass for biological and chemical conversion to fuels and chemicals.** Fundamentals of biomass pretreatment at low pH. p. 103-128, 2013.

ULLMAN, L. M. A. **Isolamento e visualização por AFM de microfibras do bagaço processado de Saccharum officinarum.** Universidade Federal de Pelotas, Relatório Técnico-Científico (estágio), 54, 2010.

VINZANT, T., BOWER, S., & JECHURA, J. **BSCL use plan: solving biomass recalcitrance.** National Renewable Energy Laboratory, 2005.

WALKER, L. P.; WILSON, D. B. **Enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview.** Bioresource technology, v. 36, n. 1, p. 3-14, 1991.

WANG, Z. J., LAN, T. Q., & ZHU, J. Y. **Lignosulfonate and elevated pH can enhance enzymatic saccharification of lignocelluloses.** Biotechnology for biofuels, 6(1), 9, 2013.

XIAO, L. P., SUN, Z. J., SHI, Z. J., XU, F., SUN, R. C. **Impact of hot compressed water pretreatment on the structural changes of woody biomass for bioethanol production.** Bioresources, v. 6, p. 1576-1598, 2011.

ZHANG, Z. P., SHOW, K. Y., TAY, J. H., LIANG, D. T., LEE, D. J., JIANG, W. J., **Rapid formation of hydrogen-producing granules in an anaerobic continuous stirred tank reactor induced by acid incubation.** Biotechnol. Bioeng., 96 (6), p. 1040–1050, 2007.

ZHENG, Y., TSAO, G. T. **Avicel hydrolysis by cellulose enzyme in supercritical CO₂.** Biotechnology Letters, v 18, p. 45145-45164, 1996.

ZHENG, Y., ZHAO, J., XU, F., LI, Y. **Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogás production.** Progress in Energy and Combustion Science, v. 42, p. 35-53, 2014.

ZHU, J. Y., WANG, G. S., PAN, X. J. **Specific Surface to Evaluate the Efficiencies of Milling and Pretreatment of Wood for Enzymatic saccharification.** Chemical Engineering Science, v. 64, p. 474-485, 2009.

ZHU, L., O'DWYER, J. P., CHANG, V. S., GRANDA, C. B., & HOLTZAPPLE, M. T. **Structural features affecting biomass enzymatic digestibility.** Bioresource Technology, 99(9), p. 3817-3828, 2008.