

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 26/02/2020.

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA APLICADA
(MESTRADO)**

**Pré-tratamento ácido diluído e deslignificação afetam a área superficial
da lignina e a sacarificação enzimática**

GABRIEL OLIVEIRA DE AZEVEDO

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biociências do Campus
de Rio Claro, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre
em Microbiologia Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Michel Brienzo.

Rio Claro

2018

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA APLICADA
(MESTRADO)**

**Pré-tratamento ácido diluído e deslignificação afetam a área superficial
da lignina e a sacarificação enzimática**

GABRIEL OLIVEIRA DE AZEVEDO

Orientador: Prof. Dr. Michel Brienzo

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biociências do Campus
de Rio Claro, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre
em Microbiologia Aplicada.

Rio Claro

2018

547.758 Azevedo, Gabriel Oliveira de
A994p Pré-tratamento ácido diluído e deslignificação afetam a
 área superficial da lignina e a sacarificação enzimática /
 Gabriel Oliveira de Azevedo. - Rio Claro, 2018
 79 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots.

 Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
 Instituto de Biociências de Rio Claro
 Orientador: Michel Brienzo

 1. Enzimas. 2. Cana-de-açúcar. 3. Lignina. 4.
 Pré-tratamento ácido diluído. 5. Deslignificação. 6. Hidrólise
 enzimática. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Pré-tratamento ácido diluído e deslignificação afetam a área superficial da lignina e a digestibilidade enzimática

AUTOR: GABRIEL OLIVEIRA DE AZEVEDO

ORIENTADOR: JONAS CONTIERO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), área: MICROBIOLOGIA APLICADA pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. MICHEL BRIENZO

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

Dr. CELSO BARBOSA DE SANT'ANNA FILHO

Diretoria de Metrologia Aplicada às Ciências da Vida / Instituto Nacional de Metrologia (Videoconferência)


Prof. Dr. RENATO NALLIN MONTAGNOLLI

Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro

Rio Claro, 26 de fevereiro de 2018

Título alterado para: "Pré-tratamento ácido diluído e deslignificação afetam a área superficial da lignina e a sacarificação enzimática"

Agradecimentos

Ao meu orientador Michel Brienzo, pela paciência e dedicação em me guiar pelos trilhos da ciência.

A meus pais Amauri e Roseli, por terem sido minha inspiração até os dias de hoje.

A minha namorada Michele, pela paciência e por me acompanhar durante o desenvolvimento deste trabalho.

A meus amigos de laboratório, por terem compartilhado um pedaço de suas vidas comigo, e por todo o auxílio no trabalho do dia a dia.

Aos professores, Fernando Pagnocca, Jonas Contiero, Márcia Braga e Maria Aparecida Marin Morales, por terem cedido seus espaços de pesquisa em partes fundamentais deste trabalho.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
2.1 Bioetanol e o papel da biomassa lignocelulósica.....	9
2.2 Heterogeneidade da biomassa de cana-de-açúcar	11
3. LIGNINA.....	14
3.1 Definição e Função	14
3.2 Impacto da lignina em processos biotecnológicos	17
3.3 Determinação de lignina.....	19
3.4 Aplicações tecnológicas da lignina.....	22
4. PRÉ-TRATAMENTOS	25
4.1 Pré-tratamento ácido	25
4.2 Pré-tratamento por explosão de vapor	27
4.3 Pré-tratamento com clorito de sódio - deslignificação.....	28
5. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.....	30
6. OBJETIVOS.....	35
7. MATERIAIS E MÉTODOS	36
7.1 Separação das frações	36
7.2 Pré-tratamento com ácido diluído	36
7.3 Deslignificação branda com clorito de sódio (NaClO ₂) após pré-tratamento com ácido	36
7.4 Determinação da Atividade enzimática.....	37
7.5 Hidrólise enzimática das amostras	38
7.6 Composição química dos materiais	38
7.7 Preparo do corante Azure B, determinação da absorvidade molar e padronização de parâmetros	39
7.8 Determinação da superfície exposta ou área superficial da lignina (ASL) e área superficial específica da lignina (ASEL).....	39
8. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
8.1 Pré-tratamento ácido diluído.....	41
8.2 Deslignificação branda com clorito de sódio do material pré-tratado com ácido.....	43
8.3 Composição química das biomassas de cana-de-açúcar	46
8.4 Área de superfície da lignina	54
8.4.1 Padronização do tempo, temperatura e agitação na adsorção do corante Azure B em material lignocelulósico.	54

8.4.2 Área superficial da lignina (ASL) e específica (ASEL) nas biomassas de cana-de-açúcar pré-tratadas	56
8.5 Hidrólise enzimática das biomassas de cana-de-açúcar	63
9. CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

Resumo

O aproveitamento de resíduos é uma das questões amplamente discutidas no cenário ambiental e econômico no mundo todo. O desenvolvimento de tecnologias que possam dar destinos apropriados a resíduos que seriam descartados de forma imprópria, pode também movimentar a economia com produção de energia e moléculas de valor agregado. O bagaço de cana-de-açúcar é um destes resíduos, utilizado atualmente para a cogeração de energia, agora se apresenta, graças a novas tecnologias desenvolvidas, como uma matéria-prima então empregado para a produção de etanol, polímeros entre outros compostos que possuem valor agregado. Alguns desafios, no entanto, precisam ser superados, a lignina, um dos componentes dessa biomassa como é uma barreira a ação de enzimas que realizam a hidrólise dos polissacarídeos presentes nesse material. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito de pré-tratamentos e seu impacto em diferentes frações da biomassa de cana-de-açúcar. Dois diferentes pré-tratamentos foram empregados, um com ácido sulfúrico diluído (5, 10 e 20 % m/m, a 121°C/30 min), seguindo de uma deslignificação branda com clorito de sódio (30 % m/m, a 70°C/1 h). A área superficial da lignina foi determinada o corante catiônico Azure B em solução de 0,1 g/ml. Hidrólises enzimática (15 FPU/g por 24 h – Cellic Cetec 2 – Novozymes) foi aplicada nos materiais para avaliar o rendimento em glicose. O pré-tratamento ácido diluído removeu até 40% da hemicelulose de todas as frações em estudo. A deslignificação branda com clorito de sódio diminui o teor de lignina nos materiais, originando um material rico em celulose. O corante Azure B permitiu determinar a superfície ocupada pela lignina após o pré-tratamento ácido, e a residual após a deslignificação. A fração e condição com maior área superficial total de lignina foi a folha pré-tratada com ácido a 5 % com 52 m²/g de material. A fração externa apresentou a maior área superficial específica (240 m²/g) após a aplicação de deslignificação. Os resultados indicam que a redução na área superficial da lignina impacta positivamente no rendimento em glicose de hidrólise enzimática

Palavras chave: cana-de-açúcar, lignina, pseudo-lignina, pré-tratamento ácido diluído, deslignificação, hidrólise enzimática

Abstract

The reutilization of residues is a contemporary question in the environmental and economic scenario in the world. The development of technologies that could give proper destination to residues that would be discarded, could as well generate income by producing energy and chemical molecules of economic interest. The sugarcane bagasse is one of these sub products, used mostly for energy generation through its burning, presents itself now as an alternative to the production of biofuels due to the development of new strategies and technologies. Some challenges remain nonetheless, lignin, one of lignocellulosic biomass main components acts like a barrier, blocking the interaction between enzymes and the polysaccharides. In this context, the present study aimed to show the effect of two distinct pretreatments and their combination and its impacts in the lignocellulosic biomass digestibility. The pretreatments employed were dilute sulfuric acid (5, 10 and 20 % w/w, at 121°C/30 min), followed by a delignification with sodium chlorite (30 % w/w at 70°C/ 1 h). The lignin surface area was determined by the cationic dye Azure B in solution of 0.1 g/mL. Enzymatic hydrolysis (15 FPU/g for 24 h – Cellic Ctec 2 - Novozymes) of the material was employed to assess the glucose yield. The dilute acid pretreatment removed part of the hemicellulose in all fractions in study. The delignification with sodium chlorite reduced the lignin content in all samples, consequently increasing the overall glucan content. The Azure B dye detected the lignin surface area after the dilute acid pretreatment, and its remaining area after the delignification. The fraction with highest surface area was the leaves pretreated with 5% of diluted acid, resulting in 52 m²/g of material. The external fraction showed the highest specific surface area with 240 m²/g of lignin after the delignification procedure. The results of enzymatic hydrolysis and lignin surface area imply that the reduction of lignin surface area results in an increase in enzymatic hydrolysis for all fractions in study.

Keywords: sugarcane, lignin, pseudo-lignin, dilute acid pretreatment, delignification, enzymatic hydrolysis.

1. INTRODUÇÃO

O resíduo fibroso resultante da remoção do “suco” da cana-de-açúcar (sacarose), e sua maceração é chamado de bagaço de cana-de-açúcar, um dos resíduos de agricultura mais abundantes no planeta (FERNANDES et al., 2017). Diversas aplicações deste resíduo estão descritas como estudo na literatura, as quais vão desde a produção de papel, até a produção de biocombustíveis (LOH et al., 2013). Estratégias de utilização do bagaço para a geração de energia, principalmente na forma de biocombustíveis líquidos vêm sendo estudadas ao longo dos anos. A possibilidade de gerar energia sustentável associado com o baixo custo do bagaço, o tornam um alvo para o desenvolvimento de novas tecnologias nesta área (BEZERRA; RAGAUSKAS, 2016). Porém, o material lignocelulósico é recalcitrante e precisa de pré-tratamento para modificar sua estrutura.

Os constituintes principais do bagaço são: celulose, hemicelulose, lignina, extrativos e cinzas, sendo os três primeiros constituintes os presentes em maior quantidade. A alta composição em polissacarídeos favorece a sua aplicação em reações de hidrólise gerando carboidratos simples, os quais são empregados em fermentações para geração de produtos, sendo o principal o etanol (REZENDE et al., 2011). De forma semelhante a outras plantas, os polissacarídeos presentes no bagaço são formados por celulose e hemicelulose, imersos em uma matriz de lignina. A lignina é um composto fenólico amorfo, resistente a ataques enzimáticos e degradação, sendo considerado o principal elemento responsável pela recalcitrância da parede celular a hidrólise enzimática da celulose (HIMMEL et al., 2007; ISIKGOR et al. 2015).

Para diminuir a recalcitrância do material lignocelulósico, a qual é devida a composição química em combinação as propriedades físico-químicas (BRIENZO et al., 2015), e aumentar a taxa de conversão enzimática da celulose e hemicelulose a carboidratos simples, diversos pré-tratamentos vem sendo estudados (KUMAR; SHARMA, 2017; KUMAR et al., 2009). Os diferentes pré-tratamentos possuem diferentes características e maneiras de ação distintas, levando, portanto, a diferentes alterações na composição e estrutura do material lignocelulósico. Os pré-tratamentos podem diminuir a cristalinidade e grau de polimerização da celulose, remover parte do conteúdo de lignina ou hemicelulose, ou modificar a estrutura da lignina (KUMAR; SHARMA, 2017). Os pré-tratamentos podem afetar a celulose, levando a

despolimerização parcial, dependendo da sua severidade (ZENG et al., 2014). Alguns pontos negativos são possíveis perdas de carboidratos por degradação, com produção de inibidores enzimáticos ou compostos que afetam negativamente o processo subsequente de fermentação (TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

Os pré-tratamentos físico-químicos mais utilizados na indústria do etanol são a explosão a vapor, os pré-tratamentos de ácido diluído, e os alcalinos, sendo que os efeitos causados por cada um destes variam. Os pré-tratamentos ácidos são considerados mais eficientes e econômicos se comparados com os pré-tratamentos alcalinos ou oxidativos, e são capazes de solubilizar a hemicelulose (na forma de monossacarídeo) e uma pequena fração da lignina. Portanto, é um pré-tratamento bastante utilizado como método de separação de hemicelulose quando seu objetivo é obter um hidrolisado rico em xilose. Pré-tratamentos que utilizam substâncias alcalinas como hidróxido de sódio são capazes de solubilizar hemicelulose e lignina, além de contribuir com melhora na digestão enzimática das fibras de celulose (REZENDE et al., 2011). Por fim, o pré-tratamento por explosão a vapor modifica a estrutura do material lignocelulósico, levando a altas taxas de liberação de glicose por hidrólise enzimática. Porém, este pré-tratamento ocasiona a formação de alguns compostos inibitórios do processo de fermentação (LASER et al., 2002; JÖNSSON; MARTÍN, 2016).

Devido aos impactos negativos no rendimento de hidrólise enzimática causados pela presença de lignina (barreira física e adsorção improdutiva de enzimas), sua remoção ou modificação se faz necessária para a conversão de materiais lignocelulósicos em biocombustíveis. Neste contexto, o presente estudo analisou a área superficial referente a lignina total, levando em consideração a ocorrência de depósitos de lignina sobre o material após a aplicação dos pré-tratamentos ácido diluído e sua combinação deslignificação branda com clorito de sódio. As análises foram baseadas na estimativa da área superficial da lignina (total e específica) através da adsorção do corante Azure B. De forma complementar, a adsorção de corante foi relacionada com a composição química do material (lignina residual total) e rendimento em glicose na hidrólise enzimática.

9. CONCLUSÃO

O pré-tratamento ácido nas concentrações utilizadas (5, 10 e 20 % m/m) foi eficiente em remover seletivamente a lignina, aumentando consequentemente o teor de glicose e lignina das amostras, para todas as frações em estudo, em especial as menos recalcitrantes, o nó e o entrenó. A folha foi a fração cujo teor de lignina se apresentou o maior em todos os casos, porém não a mais recalcitrante, conforme evidenciado pelos resultados de hidrólise enzimática. A conversão de celulose a glicose foi menor na fração externa, que apesar de não ter o maior teor de lignina, apresentou o menor conteúdo de glicose entre todas as frações estudadas.

A área superficial total e específica da lignina é modificada pela ação dos pré-tratamentos ácido e a subsequente deslignificação com clorito de sódio. A concentração de ácido utilizado no pré-tratamento tem efeito negativo sobre a superfície total da lignina para todas as frações, a subsequente deslignificação amplifica a redução da área total, enquanto que área específica aumenta para as frações externa, nó e entrenó, conforme a concentração de ácido. A redução na área superficial ocupada pela lignina aparenta ter efeito positivo sobre o rendimento de hidrólise enzimática, aumentando a quantidade de glicose obtida após 24 h de reação para todas as frações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL R, GAUR R, MATHUR A, KUMAR A, GUPTA RP, TULI DK, SATLEWAL A. Improved saccharification of pilot-scale acid pretreated wheat straw by exploiting the synergistic behavior of lignocellulose degrading enzymes. **RSC Advances**, 5, pp. 71462-71471, 2015.

ALLEN, S. E. Chemical Analysis of Ecological Materials. **Blackwell Scientific Publications**, Oxford, England. 2nd ed. 1989.

ALVIRA, P., TOMÁS-PEJÓ, E., BALLESTEROS, M., NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource technology**, 101(13), pp. 4851-4861. 2010.

ALVIRA, P., NEGRO, M. J., BALLESTEROS, I., GONZÁLEZ, A., BALLESTEROS, M. Steam explosion for wheat straw pretreatment for sugars production. **Bioethanol**. 2(1). 2016.

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, 7-18. 2013.

BEZERRA, T. L. RAGAUSKAS, A. J. A review of sugarcane bagasse for second-generation bioethanol and biopower production. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**. 10(5), 634-647. 2016.

BRIENZO, M., SIQUEIRA, A. F. MILAGRES, A. M. F. Search for optimum conditions of sugarcane bagasse hemicellulose extraction. **Biochemical Engineering Journal**, 46(2), 199-204. 2009.

BRIENZO, M., FERREIRA, S., VICENTIM, M. P., DE SOUZA, W., SANT'ANNA, C. Comparison Study on the Biomass Recalcitrance of Different Tissue Fractions of Sugarcane Culm. **BioEnergy Research**, 7(4), 1454-1465. 2014.

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), 253-262, 2015.

BRIENZO, M., ABUD, Y., FERREIRA, S., CORRALES, R.C., FERREIRA-LEITÃO, V.S., 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**, 84, 305-313. 2016.

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, 271-280. 2017.

BRUCE, R. J. WEST, C. A. Elicitation of lignin biosynthesis and isoperoxidase activity by pectic fragments in suspension cultures of castor bean. **Plant Physiology**, 91, 889–897. 1989.

CAI, J., HE, Y., YU, X., BANKS, S. W., YANG, Y., ZHANG, X., BRIDGWATER, A. V. Review of physicochemical properties and analytical characterization of lignocellulosic biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 76, 309-322. 2017.

CARDONA, C. A., QUINTERO, J. A., PAZ I. C. "Production of bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives." **Bioresource technology** 101(13), 4754-4766. 2010.

CARROLL, A., SOMERVILLE, C. Cellulosic biofuels. **Annual review of plant biology**, 60, 165-182, 2009.

CHEALI, P. POSADA, J. A. GERNAEY, K.V. SIN, G. Upgrading of lignocellulosic biorefinery to value-added chemicals: Sustainability and economics of bioethanol-derivatives. **Biomass and Energy**, 75, 282-300. 2015.

CHEN, H. Chemical composition and structure of natural lignocellulose. In **Biotechnology of Lignocellulose**. Springer Netherlands. 1, 25-71. 2014.

CHUNG, Y. L. OLSSON, J. V. LI, R. J. FRANK, C. W. WAYMOUTH, R. M. BILLINGTON, S. L. SATTELY, E. S. A renewable lignin–lactide copolymer and application in biobased composites. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering** 1, 1231-1238. 2013.

COLARES, C. J. G., PASTORE, T. C. M., CORADIN, V. T. R., CAMARGOS, J. A. A., MOREIRA, A. C. O., RUBIM, J. C., BRAGA, J. W. B. Exploratory Analysis of the Distribution of Lignin and Cellulose in Woods by Raman Imaging and Chemometrics. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 26(6), 1297-1305. 2015.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_08_24_08_59_54_bolbole_cana_portugues_-_2o_lev_-_17-18.pdf. Acessado em: 27/01/2018. Agosto de 2017.

DRABIK, D., GORTER, H., JUST, D. R., TIMILSINA, G. R. The Economics of Brazil's Ethanol-Sugar Markets, Mandates, and Tax Exemptions. **American Journal of Agricultural Economics**, 97. 1433-1450. 2015.

DUTTA, S., WU, K. C. W. Enzymatic breakdown of biomass: enzyme active sites, immobilization, and biofuel production. **Green Chemistry**, 16(11), 4615-4626. 2014.

ESHKIKI, R. B., MORTHA, G., LACHENAL, D. A new method for the titration of free phenolic groups in pulps. **Holzforschung**, 61(3), 242-246, 2007.

ESTEGHLALIAN, A. R., SVIVASTAVA, V., GILKES, N., GREGG, D. J., SADDLER, J. N. An overview of factors influencing the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic

feedstocks. In: Himmel, M.E., Baker, W., Saddler, J.N. (Eds.), **Glycosyl Hydrolases for Biomass Conversion**. ACS, 100–111. 2001.

EUDES, A. GEORGE, A. MUKERJEE, P. KIM, J. S. POLLET, B. BENKE, P. I. YANG, F. MITRA, P. SUN, L. ÇETINKOL, Ö. P. CHABOUT, S. Biosynthesis and incorporation of side-chain-truncated lignin monomers to reduce lignin polymerization and enhance saccharification. **Plant biotechnology journal**, 10, 609-620. 2012.

EVERT, R.F. Esau's plant anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function, and development. **John Wiley & Sons**. 2006.

FANG, R. XIAN SU, C. XIAORONG, X. Synthesis of lignin-base cationic flocculant and its application in removing anionic azo-dyes from simulated wastewater. **Bioresource technology** 101, 7323-7329. 2010.

FERNANDES, E., ALVES, R. C., PAGNOCCA, F. C., CONTIERO, J., BRIENZO, M., Sugar and ethanol production process from sugarcane. In: MURPHY R. Sugarcane: production systems, uses and economic importance. **Nova Iorque: Nova Publishers**, 1, 193-216. 2017.

FOLEY, W. J., MCILWEE, A., LAWLER, I., ARAGONES, L., WOOLNOUGH, A. P., BERDING, N. Ecological applications of near infra-red reflectance spectroscopy—a tool for rapid, cost-effective prediction of the composition of plant animal tissues and aspects of animal performance. **Oecology**. 116, 293–308. 1998.

GHAFFAR, S. H., FAN, M. Lignin in straw and its applications as an adhesive. **International Journal of Adhesion and Adhesives**. 48. 92-101. 2014.

GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. **Pure and applied Chemistry**, 59(2), 257-268. 1987.

GILNA, P., LYND, L.R., MOHNEN, D., DAVIS, M.F., DAVISON, B.H. Progress in understanding and overcoming biomass recalcitrance: a BioEnergy Science Center (BESC) perspective. **Biotechnology for Biofuels**, 10(1), 285. 2017.

HANSEN, M.A.T., JØRGENSEN, H., LAURSEN, K.H., SCHJØRRING, J.K., FELBY, C. Structural and chemical analysis of process residue from bio-chemical conversion of wheat straw (*Triticum aestivum* L.) to ethanol. **Biomass and bioenergy**, 56, 572-581. 2013.

HASHMI, M., SUN, Q., TAO, J., WELLS JR, T., SHAH, A.A., LABBE, N., RAGAUSKAS, A.J. Comparison of autohydrolysis and ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium acetate pretreatment to enhance enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. **Bioresource technology**, 224, 714-720. 2017.

HATAKEYAMA, H; HATAKEYAMA, T. Lignin structure, properties, and applications. In: Biopolymers. **Springer Berlin Heidelberg**. 1, 1-63. 2009.

HEITNER, C. DIMMEL, D. SCHMIDT, J. Lignin and Lignans: advances in chemistry. **CRC Press**. 1, 11. 2016.

HIMMEL, M. E., DING, S. Y., JOHNSON, D. K., ADNEY, W. S., NIMLOS, M. R., BRADY, J. W., FOUST, T. D Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. **Science**, 315(5813), 804-807, 2007.

HOLLADAY, J. E., WHITE, J. F., BOZELL, J. J., JOHNSON, D. Top Value-Added Chemicals from Biomass-Volume II—Results of Screening for Potential Candidates from Biorefinery Lignin. **Pacific Northwest National Laboratory (PNNL)**, Richland, WA (US), 2007.

HSU, T. C., GUO, G. L., CHEN, W. H., HWANG, W. S. Effect of dilute acid pretreatment of rice straw on structural properties and enzymatic hydrolysis. **Bioresource technology**, 101(13), 4907-4913. 2010.

HU, F., JUNG, S., RAGAUSKAS, A. Pseudo-lignin formation and its impact on enzymatic hydrolysis. **Bioresource technology**, 117, 7-12. 2012.

HUBBELL, C.A., RAGAUSKAS, A.J. Effect of acid-chlorite delignification on cellulose degree of polymerization. **Bioresource Technology**, 101(19), 7410-7415. 2010.

INTERNATIONAL ENERGY AGENCY, **Key World Energy Statistics** 2015.

Disponível em:

<https://www.iea.org/publications/freepublications/publication/WorldEnergyBalances2017Overview.pdf>, 2017.

ISIKGOR, F.H., BECER, C. R. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. **Polymer Chemistry**. 1, 4497-4559. 2015.

JIN, W., CHEN, L., HU, M., SUN, D., LI, A., LI, Y., HU, Z., ZHOU, S., TU, Y., XIA, T. WANG, Y. Tween-80 is effective for enhancing steam-exploded biomass enzymatic saccharification and ethanol production by specifically lessening cellulase absorption with lignin in common reed. **Applied Energy**.175, 82-90. 2016.

JÖNSSON, L.J., MARTÍN, C. Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresource technology**, 199, 103-112. 2016.

JÚNIOR, R; AGUDO, R. Análise da viabilidade do aproveitamento da palha da cana de açúcar para cogeração de energia numa usina sucroalcooleira. **UNESP-Dissertação de Mestrado**. 2009.

JUNIOR, C.S., MILAGRES, A.M.F., FERRAZ, A., CARVALHO, W. The effects of lignin removal and drying on the porosity and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. **Cellulose**. 20(6), 3165-3177. 2013.

JUNG, S. K. KIM, S. H. CHUNG, I. M. Comparison of lignin, cellulose and hemicellulose contents for biofuels utilization among 4 types of lignocellulosic crops. **Biomass and Bioenergy**. 83. 322-327. 2015.

KAFLE, K., LEE, C.M., SHIN, H., ZOPPE, J., JOHNSON, D.K., KIM, S.H., PARK, S. Effects of delignification on crystalline cellulose in lignocellulose bi-omass characterized by vibrational sum frequency generation spectroscopy and X-ray diffraction. **BioEnergy Research**, 8(4), 1750-1758. 2015.

KIM, I. J., LEE, H. J., CHOI, I. G., KIM, K. H. Synergistic proteins for the enhanced enzymatic hydrolysis of cellulose by cellulase. **Applied microbiology and biotechnology**. 98(20), 8469-8480. 2014.

KUMAR, P., BARRETT, D. M., DELWICHE, M. J., STROEVE, P. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial & engineering chemistry research**, 48, 8, 3713-3729, 2009.

KUMAR, R., HU, F., SANNIGRAHI, P., JUNG, S., RAGAUSKAS, A. J., WYMAN, C. E. Carbohydrate derived-pseudo-lignin can retard cellulose biological conversion. **Biotechnology and bioengineering**, 110(3), 737-753. 2013.

KUMAR, A. K., SHARMA, S. Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review. **Bioresources and bioprocessing**, 4(1), 7. 2017.

LABEEUW, L., MARTONE, P. T., BOUCHER, Y., CASE, R. J. Ancient origin of the biosynthesis of lignin precursors. **Biology Direct**, 10(1), 1. 2015.

LASER, M., SCHULMAN, D., ALLEN, S. G., LICHWA, J., ANTAL JR, M. J., LYND, L. R. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. **Bioresource technology**, 81(1) 33-44, 2002.

LI, J., GELLERSTEDT, G., TOVEN, K. Steam explosion lignins; their extraction, structure and potential as feedstock for biodiesel and chemicals. **Bioresource technology**, 100(9), 2556-2561, 2009.

LI, H., PU, Y., KUMAR, R., RAGAUSKAS, A.J., WYMAN, C.E. Investigation of lignin deposition on cellulose during hydrothermal pretreatment, its effect on cellulose hydrolysis, and underlying mechanisms. **Biotechnology and bioengineering**, 111(3), pp.485-492. 2014.

LOH, Y. R., SUJAN, D., RAHMAN, M. E., DAS, C. A. Sugarcane bagasse—The future composite material: A literature review. **Resources, Conservation and Recycling**, 75, 14-22, 2013.

MACHINET, G.E. BERTRAND, I. BARRIÈRE, Y. CHABBERT, B. RECOUS, S. Impact of plant cell wall network on biodegradation in soil: role of lignin composition and phenolic acids in roots from 16 maize genotypes. **Soil biology and biochemistry**, 43(7), 1544-1552. 2011.

MARABEZI, K. Estudo sistemático das reações envolvidas na determinação dos teores de Lignina e Holocelulose em amostras de Bagaço e Palha de Cana-de-Açúcar. **Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo**. 2009.

MENG, X., RAGAUSKAS, A. J. Pseudo-lignin formation during dilute acid pretreatment for cellulosic ethanol. **Recent Advances in Petrochemical Science**. 1(1). 2017.

MENG, X., RAGAUSKAS, A. J. Recent advances in understanding the role of cellulose accessibility in enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates. **Current Opinion in Biotechnology**. 27, 150-158. 2014.

MESA, L., MARTÍNEZ, Y., BARRIO, E., GONZÁLEZ, E. Desirability function for optimization of Dilute Acid pretreatment of sugarcane straw for ethanol production and preliminary economic analysis based in three fermentation configurations. **Applied Energy**, 198, 299-311. 2017.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical chemistry**, 31(3), 426-428. 1959.

MONTIES, B. Lignins. pp. 113–157, in P. M. Dey and J. B. Harborne (eds.). **Methods in Plant Biochemistry**. Academic Press, New York. 1989.

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**. 27, 77-93. 2013.

MOODLEY, P., KANA, E.G. Optimization of xylose and glucose production from sugarcane leaves (*Saccharum officinarum*) using hybrid pretreatment techniques and assessment for hydrogen generation at semi-pilot scale. **International journal of hydrogen energy**, 40(10), 3859-3867. 2015.

MORRISON, I. M. A semi-micro method for the determination of lignin and its use in prediction the digestibility of forage crops. **J. Science and Food Agriculture**. 23, 455–463. 1972.

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

NAKAGAME, S., CHANDRA, R. P, SADDLER, J. N. The effect of isolated lignins, obtained from a range of pretreated lignocellulosic substrates, on enzymatic hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**. 105, 871–9. 2010.

NORGREN, M., EDLUND, H. Lignin: recent advances and emerging applications. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, 19(5), 409-416. 2014.

OKAMURA-ABE, Y. Beta-ketoadipic acid and muconolactone production from a lignin-related aromatic compound through the protocatechuate 3, 4-metabolic pathway. **Journal of bioscience and bioengineering**, 121(6), 652-658, 2016.

OLIVEIRA, R. A., ROSSELL, C. E. V., MACIEL FILHO, R. Using Hemicellulosic Liquor from Sugarcane Bagasse to Produce Second Generation Lactic Acid. **World**

Academy of Science, Engineering and Technology, International Journal of Bioengineering and Life Sciences, 4(6). 2017.

PAN, X., XIE, D., GILKES, N., GREGG, D. J., SADDLER, J. N. Strategies to enhance the enzymatic hydrolysis of pretreated softwood with high residual lignin content. In Twenty-Sixth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals 1, 1069-1079. **Humana Press**. 2005.

PARK, J. W., TAKAHATA, Y., KAJIUCHI, T., AKEHATA, T. Effects of nonionic surfactant on enzymatic hydrolysis of used newspaper. **Biotechnol Bioeng**. 39, 117–20. 1992.

PEARL, I.W. The Chemistry of Lignin. **Marcel Dekker**, Inc.: New York. 339, 1967.

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. Master thesis. **Federal University of Paraná**. 2007.

RAGAUSKAS, A., BECKHAM, G., BIDDY, M. J., CHANDRA, R., CHEN, F., DAVIS, M. F., DAVISON, B. H., DIXON, R. A., GILNA, P., KELLER, M., LANGAN, P., NASKAR, A. N., SADDLER, J. N., TSCHAPLINSKI, T. J., TUSKAN, G. A., WYMAN, C. E. Lignin valorization: Improving lignin processing in the biorefinery. **Science**. 344. 1246843. 2014.

RAJAN, K., CARRIER, D. J. Effect of dilute acid pretreatment conditions and washing on the production of inhibitors and on recovery of sugars during wheat straw enzymatic hydrolysis. **Biomass and Bioenergy**, 62, 222-227. 2014.

RAVEN, P. H., EVERT, R. F., EICHHORN, S. E. **Biology of plants**. W. H. Freeman, 2005.

REZENDE, C. A. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. **Biotechnology for Biofuels**, 4(1), 1, 2011.

ROCHA, G. D. M., GONÇALVES, A. R., OLIVEIRA, B. R., OLIVARES, E. G., ROSSELL, C. E. V. Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production. **Industrial Crops and Products**, 35(1), 274-279, 2012a.

ROCHA, G. J. M., MARTIN, C., SILVA, V. F. N., GOMEZ, E. O., GONÇALVES, A. R. Mass balance of pilot-scale pretreatment of sugarcane bagasse by steam explosion followed by alkaline delignification. **Bioresource Technology**. 111, 447–452. 2012b

ROCHA, G. J. M., NASCIMENTO, V. M., GONÇALVES, A. R., SILVA, V. F. N., MARTÍN, C. Influence of mixed sugarcane bagasse samples evaluated by elemental and physical–chemical composition. **Industrial Crops and Products**. 64, 52-58. 2015a

ROCHA, G. J. M., GONÇALVES, A. R., NAKANISHI, S. C., NASCIMENTO, V. M., SILVA, V. F. N. Pilot scale steam explosion and diluted sulfuric acid pretreatments: Comparative study aiming the sugarcane bagasse saccharification. **Industrial Crops and Products**, 74, 810-816. 2015b.

SAHA, B. C., ITEN, L. B., COTTA, M. A., WU, Y. V. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. **Process Biochemistry**. 40(12), 3693-3700. 2005.

SANNIGRAHI, P., KIM, D. S. H., JUNG, S., RAGAUSKAS, A. Pseudo-lignin and pretreatment chemistry. **Energy & Environmental Science** 4, 1306–1310. 2011.

SANT'ANNA, C. SOUZA, W., BRIENZO, M. The influence of the heterogeneity, physicochemical and structural properties on the recalcitrance and conversion of sugarcane bagasse. **Nova publishers**. 1, 1-34. 2014.

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, 193-200. 2018.

SANTOS, V. T. O., SIQUEIRA, G., MILAGRES, A. M. F., FERRAZ, A. Role of hemicellulose removal during dilute acid pretreatment on the cellulose accessibility and enzymatic hydrolysis of compositionally diverse sugarcane hybrids. **Industrial Crops and Products**, 111, 722-730. 2018.

SCHWEINEBARTH, H., BAKER, D., TOMANI, P. Lignin–Evaluation of Properties for Applications. **NWBC 2015**, 387. 2015.

SHEKIROL, J., MUHN, E. M., NAGLE, N. J., TUCKER, M., ELANDER, R. T., SCHELL, D.J. Characterization of pilot-scale dilute acid pretreatment performance using deacetylated corn stover. **Biotechnology for Biofuels**, 7-23, 2014.

SEIDL, P. R., GOULART, A. K. Pretreatment processes for lignocellulosic biomass conversion to biofuels and bioproducts. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, 2, 48-53. 2016.

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**. 1, 47-88. 2003.

SIMMONS, B. A., LOQUE, D., RALPH, J. Advances in modifying lignin for enhanced biofuel production. **Current opinion in plant biology**, 13(3), 312-319. 2010.

SINGH, J., SUHAG, M., DHAKA, A. Augmented digestion of lignocellulose by steam explosion, acid and alkaline pretreatment methods: a review. **Carbohydrate Polymers**. 117, 624-631. 2015.

SIPPONEN, M. H., PIHLAJANIEMI, V., PASTINEN, O., LAAKSO, S. Reduction of surface area of lignin improves enzymatic hydrolysis of cellulose from hydrothermally pretreated wheat straw. **Rsc Advances**, 4(69), 36591-36596. 2014a.

SIPPONEN, M. H., PIHLAJANIEMI, V., LITTUNEN, K., PASTINEN, O., LAAKSO, S. Determination of surface-accessible acidic hydroxyls and surface area of lignin by cationic dye adsorption. **Bioresource technology**, 169, 80-87. 2014b.

SIPPONEN, M. H., RAHIKAINEN, J., LESKINEN, T., ÖSTERBERG, M. Structural changes of lignin in biorefinery pretreatments and consequences to enzyme-lignin interactions. **Nordic Pulp and Paper Research Journal**. 32(04), 550-571. 2017.

SIQUEIRA, G., MILAGRES, A.M., CARVALHO, W., KOCH, G., FERRAZ, A. Topochemical distribution of lignin and hydroxycinnamic acids in sugar-cane cell walls and its correlation with the enzymatic hydrolysis of polysaccharides. **Biotechnology for biofuels**, 4(1), 7. 2011.

SIQUEIRA, G., VÁRNAI, A., FERRAZ, A., MILAGRES, A. M. Enhancement of cellulose hydrolysis in sugarcane bagasse by the selective removal of lignin with sodium chlorite. **Applied Energy**, 102, 399-402. 2013.

SJÖSTRÖM, E. Wood Chemistry: Fundamentals and Application. **Academic Press: Orlando**. 293, 1993.

SLUITER, J. B., RUIZ, R. O., SCARLATA, C. J., SLUITER, A. D., & TEMPLETON, D. W. Compositional analysis of lignocellulosic feedstocks. 1. Review and description of methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 58(16), 9043-9053, 2010.

SUN, Y., CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**.83(1), 1-11. 2002.

SUN, Q., FOSTON, M., MENG, X., SAWADA, D., PINGALI, S.V., O'NEILL, H.M., LI, H., WYMAN, C.E., LANGAN, P., RAGAUSKAS, A.J. AND KUMAR, R. Effect of lignin content on changes occurring in poplar cellulose ultrastructure during dilute acid pretreatment. **Biotechnology for biofuels**, 7(1), 150. 2014.

SUN, S., SUN, S., CAO, X. AND SUN, R. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. **Bioresource technology**, 199, 49-58. 2016.

USMANI, M.A., KHAN, I., HAQUE, A., BHAT, A.H., MONDAL, B., GAZAL, U. Biomass-based composites from different sources: Properties, characterization, and transforming biomass with ionic liquids. In book: Lignocellulosic Fibre and Biomass-Based Composite Materials, Edition: 1, Chapter: 4. **Elsevier**. 45-94. 2017.

VANHOLME, R., DEMEDTS, B., MORREEL, K., RALPH, J., BOERJAN, W. Lignin biosynthesis and structure. **Plant physiology**, 153(3), 895-905, 2010.

VANHOLME, R., MORREEL, K., DARRAH, C., OYARCE, P., GRABBER, J. H., RALPH, J., & BOERJAN, W. Metabolic engineering of novel lignin in biomass crops. **New Phytologist**, 196(4), 978-1000, 2012.

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

THAKUR, V. K., THAKUR, M. K., RAGHAVAN, P., KESSLER, M. R. Progress in green polymer composites from lignin for multifunctional applications: a review. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**. 2(5), 1072-1092. 2014.

THAKUR, V. K., THAKUR, M. K. Recent advances in green hydrogels from lignin: a review. **International Journal of Biological Macromolecules**. 72, 834-847. 2015.

XIAO, Z., ZHANG, X., GREGG, D. J., SADDLER, J. N. Effects of sugar inhibition on cellulases and β -glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. In: Proceedings of the Twenty-Fifth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals Held May 4–7, 2003, in Breckenridge, CO. **Humana Press**. 1115-1126 2004.

WALLACE, J., BRIENZO, M., GARCÍA-APARICIO, M. P., GÖRGENS, J. F. Lignin enrichment and enzyme deactivation as the root cause of enzymatic hydrolysis slowdown of steam pretreated sugarcane bagasse. **New biotechnology**, 33(3), 361-371. 2016.

WAGNER, A., TOBIMATSU, Y., PHILIPS, L., FLINT, H., GEDDES, B., LU, F., RALPH, J. Syringyl lignin production in conifers: Proof of concept in a Pine tracheary element system. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 112(19). 6218-6223. 2015.

WHETTEN, R. W., MACKAY, J. J., SEDEROFF, R. R. Recent advances in understanding lignin biosynthesis. **Annual review of plant biology**, 49(1), 585-609. 1998.

WYMAN, C. Handbook on bioethanol: production and utilization. **CRC press**, 1996.

YUE, Y., HAN, J., HAN, G., AITA, G. M., WU, Q. Cellulose fibers isolated from energycane bagasse using alkaline and sodium chlorite treatments: Structural, chemical and thermal properties. **Industrial Crops and Products**, 76, 355-363. 2015.

ZENG, Y., ZHAO, S., YANG, S., DING, S.Y. Lignin plays a negative role in the biochemical process for producing lignocellulosic biofuels. **Current opinion in biotechnology**, 27, 38-45. 2014.

ZHAO, X., ZHANG, L., LIU, D. Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, 6(4), 465-482, 2012.