



UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA
E MUCURI
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCOMBUSTÍVEIS



THIAGO ALVES LOPES SILVA

AVALIAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO DE EXPLOSÃO A VAPOR CATALISADO POR
ÁCIDO CÍTRICO E HIDRÓXIDO DE SÓDIO SOBRE A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO
BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Uberlândia

2017

THIAGO ALVES LOPES SILVA

AVALIAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO DE EXPLOSÃO A VAPOR CATALISADO POR
ÁCIDO CÍTRICO E HIDRÓXIDO DE SÓDIO SOBRE A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO
BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Biocombustíveis UFJM/UFU, da Universidade
Federal de Uberlândia, como requisito para obtenção do
título de Mestre em Ciência e Tecnologia de
Biocombustíveis.

Área de concentração: Processos químicos e
bioquímicos aplicados à conversão de biomassas a
biocombustíveis.

Orientador: Dr. Daniel Pasquini
Co-orientadora: Dr. Milla Alves Baffi

Uberlândia

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S586a Silva, Thiago Alves Lopes, 1988-
2017 Avaliação do pré-tratamento de explosão a vapor catalisado por
ácido cítrico e hidróxido de sódio sobre a hidrólise enzimática do bagaço
de cana-de-açúcar / Thiago Alves Lopes Silva. - 2017.
69 f. : il.

Orientador: Daniel Pasquini.

Coorientadora: Milla Alves, Baffi.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Pós-
Graduação em Biocombustíveis.

Inclui bibliografia.

1. Biocombustíveis - Teses. 2. Biomassa lignocelulósica - Teses. 3.
sacarose - Teses. 4. cana-de-açúcar - Teses. I. Pasquini, Daniel. II. Baffi,
Milla Alves, 1977. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de
Pós-Graduação em Biocombustíveis. IV. Universidade Federal dos Vales
do Jequitinhonha e Mucuri. Programa de Pós-Graduação em
Biocombustíveis. V. Título.

CDU: 662.756



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCOMBUSTÍVEIS**



**Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-Graduação em
Biocombustíveis, do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia
DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO, NÚMERO 10/PPBIC.**

DATA: 08/02/2017

DISCENTE: Thiago Alves Lopes Silva

MATRÍCULA: 11512PGB002

TÍTULO DO TRABALHO: Avaliação do pré-tratamento de explosão a vapor catalisado por ácido cítrico e hidróxido de sódio sobre a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Biocombustíveis

LINHA DE PESQUISA: Processos químicos e bioquímicos aplicados à conversão de biomassas a biocombustíveis.

PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: PRONEM FAPEMIG APQ-01360-14: Técnicas de pré-tratamento de resíduos lignocelulósicos para a produção de biogás (metano e hidrogênio), bioetanol, celulose nanocristalina e outros bioproductos químicos de valor agregado.

Às nove horas do dia oito de fevereiro do ano dois mil e dezessete, no Auditório da Biblioteca do Bloco 3C, no Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Leandro Vinícius Alves Gurgel, da Universidade Federal de Ouro Preto, Rosana Maria Nascimento de Assunção, da Faculdade de Ciências Integradas do Pontal, e Daniel Pasquini, do Instituto de Química, da Universidade Federal de Uberlândia, professor(a) orientador(a) e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o(a) presidente da mesa apresentou o(a) candidato(a) e a Banca Examinadora, agradeceu a presença do público e discorreu sobre as normas e critérios para a realização desta sessão, baseadas no Regulamento do Programa PPBIC. Em seguida, o(a) presidente da mesa concedeu a palavra ao(a) candidato(a) para a exposição do seu trabalho e, em sequência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir o(a) apresentador(a). A duração da apresentação e o tempo de arguição e resposta deram-se conforme as normas do Programa. Ultimada a arguição, desenvolvida dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais e Aprovou o(a) candidato(a). Por sugestão da Banca Examinadora, o título do

trabalho será

MANTIDO

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento do estabelecido nas normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU. As correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de 30 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 12 horas e 00 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.

Prof(a). Dr(a). Leandro Vinícius Alves Gurgel
UFOP

Prof(a). Dr(a). Rosana Maria Nascimento de
Assunção FACIP-UFU

Prof(a). Dr(a). Daniel Pasquini
IQUFU-UFU

Dedico este trabalho aos meus pais Edmilson e Simone, a minha esposa Haienny e ao meu filho Frederico, por todo amor, carinho, compreensão e apoio destinados a mim durante a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente agradeço a **DEUS** pela saúde, força e sabedoria necessária para que concluisse mais essa importante e essencial etapa da minha vida.

Aos meus pais, **Edmilson e Simone**, pelo apoio e incentivo durante todos os momentos de dificuldade e incertezas.

À minha esposa, **Haienny** e ao meu filho **Frederico**, pela paciência, amor, incentivo e pelo apoio incondicional que dispensaram a mim durante a realização de mais esse sonho.

Ao meu orientador, **Dr. Daniel Pasquini** pela confiança, dedicação, empenho e disponibilidade em sempre ajudar no que precisava, pelo imenso conhecimento aplicado na realização deste trabalho e pela oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa.

À minha co-orientadora **Dra. Milla Alves Baffi** pelas orientações na realização do processo de hidrólise enzimática.

Às técnicas, **Júlia e Beatriz**, do Laboratório de Microbiologia Ambiental por toda paciência e ajuda concedida durante a realização das etapas de hidrólise enzimática.

Aos meus colegas do Laboratório de Reciclagem de Polímeros da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho. Em especial, ao **Leandro, Hernán, Betina, Natália, Mariana, Ingrid, Elaine e Ana Paula** que não mediram esforços para ajudar-me com a parte experimental, discussão dos resultados ou simplesmente com uma palavra amiga em momentos de dificuldade.

À **Usina Araporã Bioenergia S/A** pela doação do bagaço de cana-de-açúcar e, em especial, ao meu amigo **Diogo Araújo** que intermediou tal doação.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis (UFVJM/UFU), que contribuíram de forma direta ou indireta para minha formação intelectual.

À Universidade Federal de Uberlândia e ao Instituto de Química por fornecerem toda a estrutura física e tecnológica necessária para a realização deste trabalho.

À FAPEMIG, CNPq e CAPES por todos os recursos dispensados para realização desta pesquisa.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”

(Albert Einstein)

RESUMO

Atualmente, tem-se estudado diversos tipos de pré- tratamentos para reduzir a recalcitrância da biomassa lignocelulósica com intuito de aumentar sua digestibilidade química/enzimática, para que esta possa ser utilizada na produção de etanol e/ou outros bioproductos de valor agregado. Neste estudo avaliou-se o efeito do pré-tratamento de explosão a vapor catalisada por ácido cítrico e hidróxido de sódio, e do pré-tratamento de deslignificação alcalina nas propriedades químicas e estruturais do bagaço de cana-de-açúcar (BCA), bem como sobre o processo de hidrólise enzimática. O pré-tratamento de explosão a vapor foi realizado em reator de 1,4L sob temperatura de 180 °C com tempo de retenção de 5 min. A etapa de deslignificação com NaOH (2% m:m) foi realizada a 120 °C, sob refluxo de 4h. A caracterização química e estrutural da biomassa *in natura* e pré-tratada foi realizada por FTIR, MEV, DRX. A hidrólise enzimática foi realizada com volume final de 20 mL constituído de 3% de BCA (massa seca), tampão de citrato de sódio 50 mM (pH=5,0) e 10 FPU do complexo enzimático Cellic® CTec 3. Os frascos foram mantidos sob agitação de 150 rpm a 50°C por 72 h. Retirou-se alíquotas de 1,5 mL após 0, 12, 24, 36, 48 e 72h para determinação de açúcares redutores totais (ART) pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). O bagaço de cana-de-açúcar apresentou 24,22% de lignina, 27,61% de hemiceluloses e 42,77% de celulose, no entanto após o pré-tratamento de explosão a vapor catalisado com ácido cítrico, obteve-se uma biomassa com menor quantidade de hemiceluloses (16,16%) e com formação de fissuras na parede celular da fibra. O bagaço pré-tratado por explosão a vapor com NaOH apresentou completa desestruturação da fibra, remoção de 65% da lignina e preservação da fração hemicelulósica. Depois de submeter à biomassa lignocelulósica sem tratamento e pré-tratada por explosão a vapor ao processo de deslignificação alcalina observou-se a completa desestruturação da matriz lignocelulósica e a solubilização de 85-90% da lignina em todas as amostras. O índice de cristalinidade da biomassa após os pré-tratamentos teve uma aumento quando comparado ao material *in natura*, podendo este ser associado à remoção de componentes amorfos, como a lignina e hemiceluloses, e também da fração amorfa da celulose. Frente ao percentual mássico de biomassa utilizada no processo de hidrólise enzimática valor teórico correspondente a 100% de sacarificação equivale, aproximadamente, a 33,0 g.L⁻¹. Após a hidrólise enzimática (72h) da biomassa *in natura* e pré-tratada por explosão a vapor obteve-se uma maior concentração de ART e um maior percentual de sacarificação para o bagaço de cana obtido a partir da explosão a vapor com NaOH (23,05 g.L⁻¹, 69,15% de sacarificação). Já na hidrólise da biomassa *in natura* após processo de deslignificação alcalina a concentração de ART aumentou em 18,33 g.L⁻¹, enquanto que para o bagaço pré-tratado por explosão a vapor com água, ácido cítrico e NaOH seguido da deslignificação alcalina o aumento de ART, correspondeu a 19,67 g.L⁻¹, 19,93 g.L⁻¹ e 6,87 g.L⁻¹. Diante da produção de ART após deslignificação notou-se que o percentual de sacarificação para a biomassa sem tratamento elevou-se de 11,88% para 69,15%, enquanto que para o bagaço após explosão a vapor e deslignificação este percentual ficou entre 82,05% - 89,79%. Por fim, cabe ressaltar que no BCA previamente pré-tratado por explosão a vapor com NaOH, a remoção de lignina após o segundo pré-tratamento teve um acréscimo de apenas 20% e a concentração de ART de 6,87 g.L⁻¹. Dessa forma, acredita-se que ao aumentar a concentração da solução de NaOH para realizar a explosão a vapor poderia-se não necessitar da realização da etapa de deslignificação.

Palavras-chave: Explosão a vapor. Biomassa lignocelulósica. Hidrólise Enzimática. Açúcares redutores totais.

ABSTRACT

Nowadays, there are various types of studied pre-treatments to reduce the lignocellulosic biomass recalcitrance in order to increase its chemical / enzymatic digestibility, so that it can be used in ethanol production and / or other bioproducts value. This study evaluated the effect of steam explosion pretreatment catalyzed by citric acid and sodium hydroxide, and alkaline delignification pretreatment over chemical and structural properties of sugarcane bagasse, as well as the enzymatic hydrolysis process. Steam explosion pretreatment was conducted in a 1.4 L reactor at temperature of 180 °C and 5 min hold time. The delignification step with NaOH (2% m:m) was performed at 120 °C under reflux for 4 hours. Chemical and structural characterization of raw and pretreated biomass was performed by FTIR, SEM and XRD. Enzymatic hydrolysis was performed with final volume of 20 mL consisting 3% SCB on dry-weight basis, sodium citrate buffer 50 mM (pH = 5.0) and 10 FPU of Cellic® Ctec 3 enzyme complex. Flasks were kept under agitation of 150 rpm at 50 °C during 72 h. It was analyzed 1.5 mL aliquots after 0, 12, 24, 36, 48 and 72 hours to determine total reducing sugars (TRS) by acid 3,5-dinitrosalicilic method (DNS). Sugarcane bagasse showed 24.22% lignin, 27.61% hemicelluloses and 42.77% of cellulose, however after steam explosion pretreatment catalyzed by citric acid, it was obtained a biomass with lesser hemicelluloses amount (16.16%) and cracks formation on fiber cell wall were observed. The bagasse pretreated by steam explosion by NaOH showed complete destructuring of fiber and lignin removal was 65%, while hemicellulosic fraction was preserved. After submitting untreated and pretreated lignocellulosic biomass by steam explosion to alkaline delignification process, complete destructuring and solubilization of the lignocellulosic matrix was observed with 85-90% lignin removal in all samples. The crystallinity index of biomass after pretreatments increased when compared to raw material and this could be associated to amorphous components removal, such as lignin and hemicelluloses, and also the amorphous cellulose fraction. The theoretical value corresponding to 100% of saccharification corresponds to approximately 33.0 g·L⁻¹, compared to the mass percentage of biomass used in the enzymatic hydrolysis process. After 72 h enzymatic hydrolysis of raw and pretreated biomass by steam explosion, the highest concentration of total reducing sugars (TRS) and the highest percentage of saccharification were obtained for sugarcane bagasse (23.05 g·L⁻¹, 69.15% saccharification). In in nature biomass hydrolysis, after alkaline delignification process, ART concentration increased 18.33 g·L⁻¹, while pretreated biomass by steam explosion with water, citric acid and NaOH followed by alkaline delignification increase TRS to 19.67 g·L⁻¹, 19.93 g·L⁻¹ and 6.87 g·L⁻¹. After delignification, it was noted that saccharification percentage for untreated biomass increased from 11.88% to 69.15%, while for bagasse after steam explosion and delignification this percentage was between 82.05% - 89.79%. Lastly, it should be noted that in biomass previously pretreated by NaOH steam explosion, lignin solubilization after the second pretreatment had an increase of only 20% and TRS concentration of 6.87 g·L⁻¹. Thus, it is believed that increasing NaOH solution concentration to perform steam explosion could not need to implement delignification step.

Keywords: Steam explosion. Lignocellulosic biomass. Enzymatic Hydrolysis. Total reducing sugars.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Produção mundial de etanol entre 2007-2015.....	17
Figura 2 - Etapas do processo de produção de etanol de 2 ^a geração.	18
Figura 3 - Composição química da biomassa lignocelulósica.	20
Figura 4 - Estrutura da celulose.....	22
Figura 5 - Representação da estrutura cristalina e amorfa da celulose.	22
Figura 6 - Principais unidades de açúcares que compõe as hemiceluloses.....	23
Figura 7 - Unidades percussoras da lignina.....	24
Figura 8 - Estrutura representativa da lignina.	25
Figura 9 - Representação das modificações que ocorrem na estrutura da biomassa após o pré-tratamento.....	26
Figura 10 - Ação de celulases na degradação da cadeia polimérica de celulose.....	30
Figura 11 - Ação de hemicelulases na degradação de diferentes hemiceluloses.	31
Figura 12 - Fluxograma do procedimento experimental.....	32
Figura 13 - Amostras de bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> e pré-tratado.	40
Figura 14 - Solubilização de celulose, hemiceluloses e lignina após o pré-tratamento de explosão a vapor.	42
Figura 15 - Solubilização de celulose, hemiceluloses e lignina após o pré-tratamento de explosão a vapor seguido de deslignificação alcalina.....	44
Figura 16 - Espectros de FTIR das amostras de bagaço <i>in natura</i> e pré-tratadas.	45
Figura 17 - Microscopia eletrônica de varredura do bagaço sem tratamento e pré-tratado por explosão a vapor.	48
Figura 18 - Microscopia eletrônica de varredura do bagaço sem tratamento deslignificado e do bagaço após a explosão a vapor e deslignificação alcalina.	49
Figura 19 - Difratogramas obtidos para o bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> e pré-tratado.	50
Figura 20 - Concentração de açúcares redutores totais obtidos para o bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> e pré-tratado por explosão a vapor.....	52
Figura 21 - Concentração de açúcares redutores totais obtidos para o bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> deslignificado e pré-tratado por explosão a vapor seguido de deslignificação alcalina.	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição de celulose, hemiceluloses e lignina de diferentes biomassas lignocelulósicas.....	20
Tabela 2 - Vantagens e desvantagens de alguns pré-tratamentos físicos, químicos, físico-químicos e biológicos.....	27
Tabela 3 - Condições utilizadas no pré-tratamento de explosão a vapor.....	33
Tabela 4 - Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar in natura e pré-tratado por explosão a vapor catalisada por ácido cítrico e NaOH.	41
Tabela 5 - Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar in natura e pré-tratado por explosão a vapor sem catalisador (água) e catalisada por ácido cítrico e NaOH, considerando o rendimento do pré-tratamento.....	41
Tabela 6 - Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar in natura e pré-tratado por explosão a vapor após o processo de deslignificação alcalina.	42
Tabela 7 - Rendimento combinado das etapas de explosão a vapor e deslignificação alcalina.	43
Tabela 8 - Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar in natura e pré-tratado por explosão a vapor após o processo de deslignificação alcalina.	43
Tabela 9 - Índice de cristalinidade do bagaço de cana-de-açúcar in natura e pré-tratado.....	51

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- ART** – Açúcares redutores totais
- BCA** – Bagaço de cana-de-açúcar
- BEA** – Bagaço explosão água
- BEAD** - Bagaço explosão água deslignificado
- BEH** - Bagaço explosão ácido
- BEHD** - Bagaço explosão ácido deslignificado
- BEOH** - Bagaço explosão NaOH
- BEOHD** - Bagaço explosão NaOH deslignificado
- BI**- Bagaço de cana *in natura*
- BID** - Bagaço *in natura* deslignificado
- DNS** – Ácido 3,5-dinitrosalicílico
- DRX** – Difração de raio-X
- EC 3.2.1.21** - β - Glicosidase
- EC 3.2.1.4** – Endo-1,4- β -D-Glucanase
- EC 3.2.1.91** – 1,4- β -Celobiohidrolase
- EUA** – Estados Unidos da América
- FPU** – Unidades de papel filtro
- FTIR** – Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
- I₂₀₀** - Intensidade máxima no pico cristalino
- I_{am}** - Intensidade da região amorfa
- ICr**- Índice de cristalinidade relativo
- MEV** – Microscopia eletrônica de varredura
- M_f** – Massa final da biomassa após pré-tratamento
- M_i** – Massa inicial da biomassa *in natura*
- MPa** – Megapascal
- NaOH** – Hidróxido de sódio
- R** – Rendimento do pré-tratamento
- S** – Percentual de solubilização
- V_{pt}** - Valor corrigido pelo rendimento do pré-tratamento
- Y_f** - Percentual do componente corrigido após pré-tratamento
- Y_i** - Percentual do componente no bagaço *in natura*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo Geral.....	16
2.2 Objetivos Específicos.....	16
3 REFERÊNCIAL TÉORICO	17
3.1 Combustíveis renováveis: etanol de 1 ^a e 2 ^a Geração	17
3.2 Biomassa Lignocelulósica	19
3.2.1 Bagaço de cana-de-açúcar	21
3.3.2 Celulose	21
3.2.3 Hemiceluloses	22
3.2.4 Lignina.....	24
3.3 Técnicas de pré-tratamento.....	25
3.3.1 Pré-tratamento de Explosão a Vapor.....	27
3.3.2 Pré-tratamento alcalino	28
3.4 Hidrólise Enzimática	29
4 METODOLOGIA	32
4.1 Biomassa lignocelulósica	32
4.2 Pré-tratamento de explosão a vapor	32
4.3 Pré- tratamento de deslignificação alcalina	33
4.4 Rendimento dos pré-tratamentos	33
4.5 Caracterizações da biomassa lignocelulósica	34
4.5.1 Caracterização química	34
4.5.2 Umidade.....	35
4.5.3 Cinzas	35
4.5.4 Lignina Klason Insolúvel.....	35
4.5.5. Lignina Klason Solúvel	36
4.5.6 Holocelulose	37
4.5.7 Celulose	37
4.5.8 Hemiceluloses	38
4.5.9 Análise de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	38
4.5.10 Difração de Raio –X (DRX)	38

4.5.11 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	38
4.5.12 Hidrólise enzimática	39
4.6 Análise estatística	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5. 1 Aspecto físico e Composição Química	40
5.2 Análise de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	45
5.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	47
5.4 Análise de Difração de Raio-X (DRX)	50
5.5 Hidrólise Enzimática	51
6 CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS	57

1 INTRODUÇÃO

Atualmente a matriz energética mundial utiliza em média 80% de combustíveis fósseis não renováveis para sustentar a crescente demanda de energia requerida por diversos setores da economia (MME, 2016), no entanto o esgotamento e a falta de uniformidade de distribuição das reservas, aliados as flutuações dos preços e aos diversos impactos ambientais causados pela queima de combustíveis fósseis, como a liberação de gases de efeito estufa e o aquecimento global (BHASKAR et al., 2011; MOOD et al., 2013), tem impulsionado a realização de inúmeras pesquisas que buscam fontes renováveis de energia.

O combustível de fonte renovável mais produzido mundialmente é o etanol de primeira geração, o qual é comumente obtido do milho, trigo, beterraba sacarina e cana-de-açúcar (PERRONE et al., 2016). Neste contexto, o Brasil ocupa um lugar de destaque juntamente com os Estados Unidos da América no que se refere à produção de etanol, no entanto o modelo brasileiro realiza a fermentação dos carboidratos presentes no caldo de cana (sacarose), enquanto o norte americano utiliza o hidrolisado enzimático do amido de milho (ROCHA et al., 2015).

Outra fonte de matéria-prima renovável utilizada para produção de etanol são os resíduos lignocelulósicos, os quais representam 50% da biomassa disponível no mundo (FERNANDES et al., 2015) e apresentam disponibilidade em grande quantidade em diferentes regiões do globo, em princípio, não interferindo no suprimento de alimentos e na biodiversidade (TOMÉ, 2014). Diversos trabalhos tem evidenciado a utilização de materiais lignocelulósicos na produção de etanol (2^a Geração), como a palha de milho (BONDESSON et al., 2015), palha de cana (OLIVEIRA et al., 2013), bagaço de cana (AMORES et al., 2013; GUTIÉRREZ-RIVERA et al., 2015; NEVES; PITARELO, RAMOS, 2016), palha de arroz (ZHU et al., 2015; PHITSUWAN et al., 2016), palha de trigo (SAHA et al., 2015), entre outros.

No cenário brasileiro destaca-se o bagaço de cana-de-açúcar, o qual é um resíduo obtido após o esmagamento da cana-de-açúcar realizado para obtenção do caldo utilizado na produção de açúcar e etanol. Diante da elevada produção brasileira de açúcar e álcool tem-se gerado elevadas quantidades de bagaço (ROCHA et al., 2012a). De acordo com Clauser et al. (2016), 1 tonelada de cana-de-açúcar gera entre 270 a 280Kg de bagaço com 50% de umidade. Sabendo que na safra de 2015/2016 a produção de cana-de-açúcar no Brasil foi de 665 milhões de toneladas (CONAB, 2016), gerou-se aproximadamente 186 milhões de toneladas de bagaço.

O bagaço de cana-de-açúcar, assim como outras biomassas lignocelulósicas, é composto principalmente de celulose (40-45%), hemiceluloses (30-35%), lignina (20-30%) e pequenas quantidades de extractivos e cinzas (BEZERRA; RAGAUSKAS, 2016). Os carboidratos presentes na celulose e hemiceluloses podem ser convertidos em bioetanol (GRIMALDI et al., 2015), contudo a alta complexidade das interações entre estes componentes garante a biomassa uma estrutura recalcitrante (PU et al., 2013; FERNANDES et al. 2015), sendo necessário ser submetida a uma etapa de pré-tratamento para aumento da digestibilidade enzimática e consequentemente uma maior produção de açúcares fermentescíveis, os quais são convertidos posteriormente em etanol celulósico (PAL et al., 2016).

Segundo Rocha et al. (2015) devido a estrutura recalcitrante formada entre os carboidratos e a lignina, apenas 20% da biomassa *in natura* consegue ser hidrolisada evidenciando-se assim a importância da realização de pré-tratamentos antes da etapa de hidrólise enzimática.

Diversos pré-tratamentos físicos, químicos, físico-químicos, biológicos e combinações entre estes, vem sendo estudados com intuito de aumentar a conversão enzimática da biomassa lignocelulósica. Os pré-tratamentos efetivos objetivam, atuar na remoção de lignina, reduzir a cristalinidade da celulose, aumentar a porosidade dos materiais lignocelulósicos (KUMAR et al., 2009), assim como minimizar a perda de açúcares e limitar a formação de produtos de inibição (SARKAR et al., 2012; SHAFIEI; KUMAR; KARIMI, 2015).

Dentre os pré-tratamentos, um dos mais utilizados para promover a desestruturação de materiais lignocelulósicos é o de explosão a vapor, no qual a biomassa é submetida a uma atmosfera de vapor saturado de alta pressão seguida de uma descompressão súbita (KUMAR et al., 2009), provocando assim a solubilização da fração hemicelulósica e modificações na estrutura da lignina devido as elevadas temperaturas atingidas (JACQUET et al., 2015).

Diante da crescente importância da biomassa lignocelulósica para matriz energética mundial e da necessidade do estudo de técnicas de pré-tratamento que visem aumentar a digestibilidade enzimática da mesma, o presente trabalho estudou o efeito dos pré-tratamentos de explosão a vapor catalisado com ácido cítrico e hidróxido de sódio (NaOH), e do pré-tratamento deslignificação alcalina nas propriedades químicas e estruturais do bagaço de cana-de-açúcar, bem como sobre o processo de hidrólise enzimática.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar os efeitos dos pré-tratamentos de explosão a vapor catalisada por ácido cítrico e hidróxido de sódio e da deslignificação alcalina, nas propriedades químicas e estruturais do bagaço de cana-de-açúcar, bem como sobre o processo de hidrólise enzimática.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar química e estruturalmente o bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e após realização dos pré-tratamentos de explosão a vapor e deslignificação alcalina, quanto ao teor de celulose, lignina, hemicelulose e por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e difração de raio-X (DRX);
- Calcular o percentual de solubilização de lignina, hemicelulose e celulose após realização do pré-tratamento de explosão a vapor catalisado por ácido cítrico e NaOH, e do pré-tratamento de deslignificação alcalina;
- Determinar a concentração de açúcares redutores totais (ART) pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico após a hidrólise enzimática do bagaço *in natura* e pré-tratado;
- Correlacionar o teor de lignina e o índice de cristalinidade com a concentração de açúcares redutores totais;
- Comparar a produção de açúcares redutores totais e a porcentagem de sacarificação após os pré-tratamentos de explosão a vapor e de deslignificação alcalina.

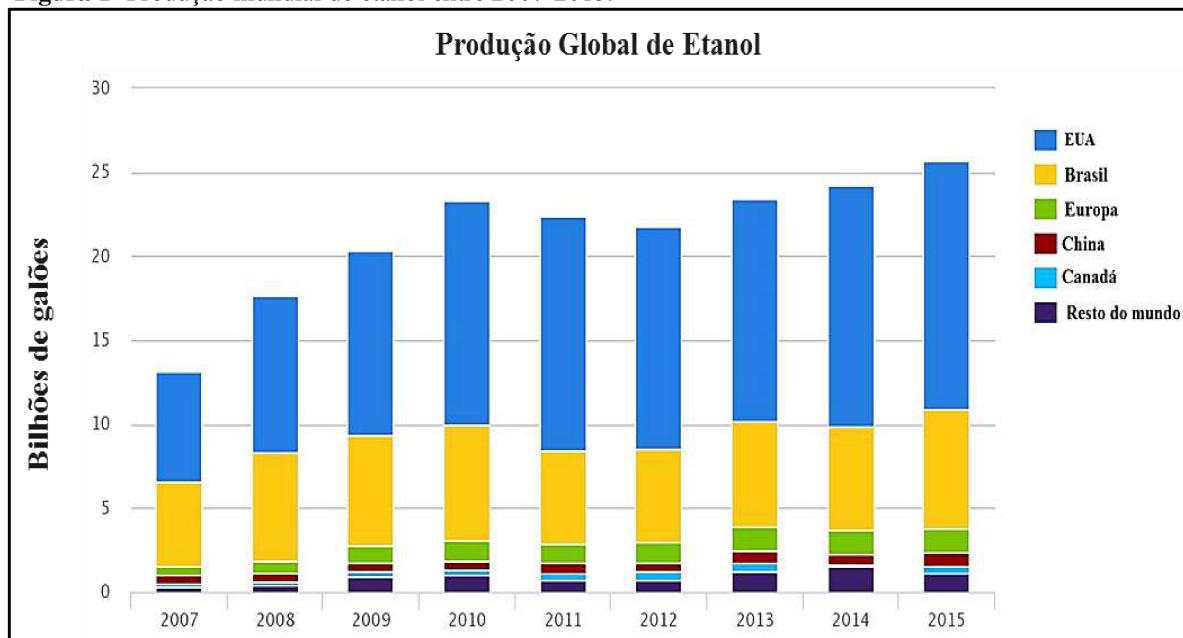
3 REFERÊNCIAL TÉORICO

3.1 Combustíveis renováveis: etanol de 1^a e 2^a Geração

Grande parte da energia consumida no mundo advém de combustíveis não renováveis de origem fóssil, no entanto questões como a redução das reservas de petróleo e problemas ambientais causados pela queima desses combustíveis, tem impulsionado a busca por combustíveis renováveis obtidos a partir de fontes biológicas sustentáveis. Nesse contexto, as culturas agroenergéticos e os resíduos vegetais são as duas matérias-primas mais promissoras e de baixo custo para a produção de biocombustíveis e geração de energia (BEZERRA; RAGAUSKAS, 2016), podendo assim serem utilizadas para suprir a crescente demanda de energia e assegurar a sustentabilidade energética mundial.

O biocombustível renovável que apresenta maior produção mundial é o etanol de 1^a geração. De acordo com os dados da “Renewable Fuels Association” (Associação de Combustíveis Renováveis) os Estados Unidos são os maiores produtores de etanol do mundo tendo produzido aproximadamente 15 bilhões de galões no ano de 2015. O Brasil ocupa a 2º posição de maior produtor mundial de etanol, com produção em 2015 equivalente a 7 bilhões de galões (RFA, 2015). Dessa forma, estes dois países são responsáveis pela produção de 85% do etanol mundial, sendo que nos EUA o mesmo é produzido a partir do milho enquanto que no Brasil utiliza-se açúcares presentes no caldo de cana-de-açúcar (Figura 1) (AFDC, 2015).

Figura 1- Produção mundial de etanol entre 2007-2015.



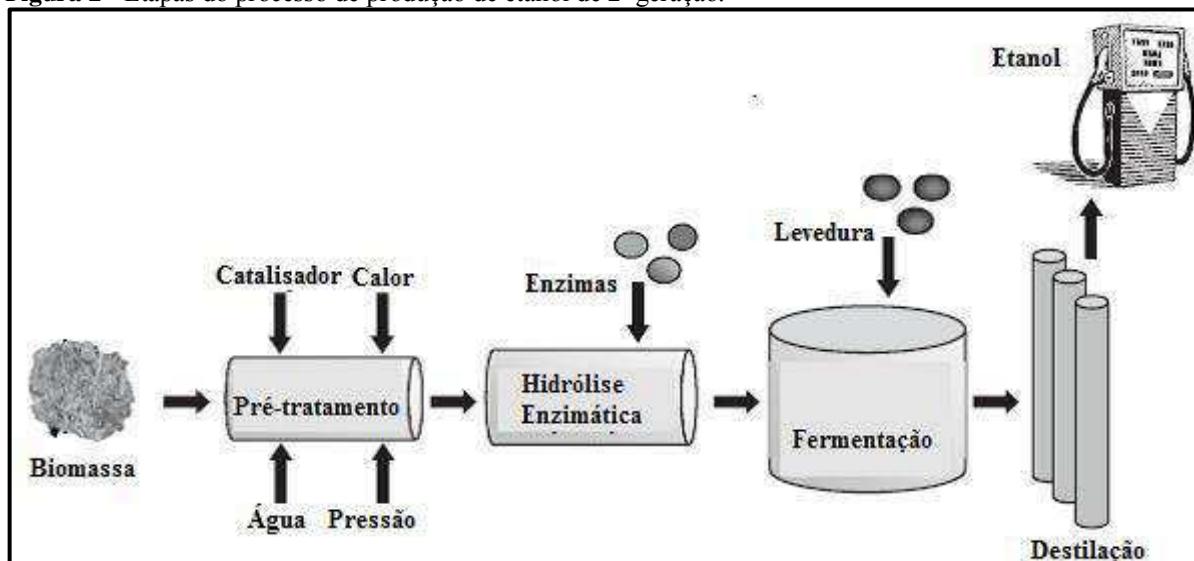
Fonte: AFDC (2015). *Dados obtidos da Renewable Fuels Association.

A produção de etanol de primeira geração é realizada comercialmente por duas rotas tecnológicas, utilizando matérias-primas açucaradas, diretamente fermentáveis, como o caldo cana-de-açúcar e da beterraba açucareira ou matérias-primas amiláceas, como o milho e o trigo, cujo amido antes da etapa de fermentação deve ser convertido em açúcares (NUNES et al., 2013).

Diante da perspectiva de um significativo aumento na demanda por etanol, tem-se buscado expandir a produção deste biocombustível sem comprometer a segurança alimentar devido à competição pelo uso da terra para produção de energia e alimentos (PACHECO, 2011). Nesse contexto outra rota tecnológica que vem sendo amplamente estudada para a produção de bioetanol, consiste na utilização de materiais lignocelulósicos como, o bagaço de cana-de-açúcar, casca de arroz, palha de trigo, palha de arroz, gramíneas e resíduos de madeiras, etc. (SINGH et al., 2014).

O etanol produzido a partir de biomassa lignocelulósica é denominado etanol de 2^a geração ou etanol celulósico. O processo de produção utilizando a rota de 2^a geração consiste basicamente em três etapas: 1^a) pré-tratamento da biomassa para aumentar a acessibilidade aos carboidratos (celulose e hemicelulose), 2^a) hidrólise da biomassa pré-tratada para liberação de açúcares monoméricos e 3^a) fermentação dos monômeros de açúcares conforme as tecnologias pré-estabelecidas para produção de etanol de 1^a geração (Figura 2) (ZHENG; PAN; ZHANG, 2009).

Figura 2 - Etapas do processo de produção de etanol de 2^a geração.



Fonte: Adaptado de Modenbach; Nokes (2013).

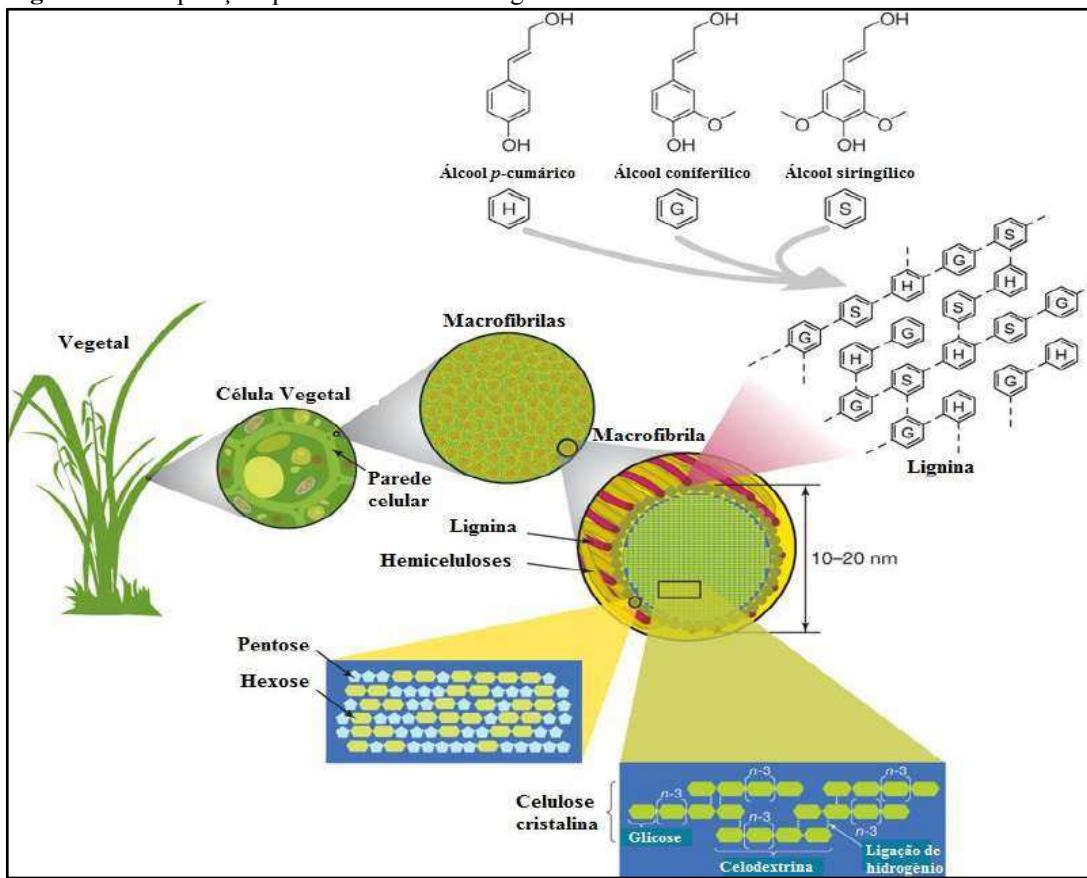
O Brasil, também apresenta vantagens competitivas em relação aos outros países na produção do etanol de segunda geração, visto que apresenta disponibilidade de grandes quantidades de matéria-prima com menor custo e de fácil disponibilidade, considerando a possibilidade de utilização do bagaço e da palha da cana-de-açúcar (PACHECO, 2011).

3.2 Biomassa Lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica compreende toda a matéria de origem vegetal não comestível, advinda de florestas, culturas energéticas e fazendas agrícolas. Dentre estas destacam-se os resíduos agrícolas (ex: palha de milho, bagaço de cana, palha de trigo, casca de arroz, etc), assim como os resíduos de madeira e da indústria de papel (NANDA et al., 2015).

Muitas vezes a destinação dada a esses materiais lignocelulósicos é pouco nobre e representa uma perda do potencial de produção energético, além de gerarem um passivo ambiental. Neste contexto, o Brasil assume uma posição destacada, ao se considerar o volume da produção agrícola e agroflorestal do país e a consequente geração de resíduos lignocelulósicos. Tais biomassas residuais estão disponíveis em uma forma razoavelmente limpa e em grandes quantidades (BRAGATTO, 2010).

A biomassa lignocelulósica representa uma fonte natural, barata e abundante que pode ser explorada para produção de biocombustíveis e bioproductos de alto valor agregado. A mesma é composta basicamente de celulose (35-50%), hemiceluloses (20-35%) e lignina (15 a 30%) (Figura 3) (AMARASEKARA, 2014a; SHAFIEI, KUMAR, KARIMI, 2015). Além destes componentes são encontrados diferentes compostos inorgânicos (cinzas), pectinas, proteínas, carboidratos solúveis, terpenos, alcaloides, dentre outros (MOHAN; PITTMAN; STEELE, 2006).

Figura 3 - Composição química da biomassa lignocelulósica.

Fonte: Rubin (2008).

Na Tabela 1 encontra-se descritos a composição (base seca) de celulose, hemicelulose e lignina de algumas biomassas lignocelulósicas, consideradas resíduos agrícolas, que podem ser convertidas em etanol de 2^a geração, no entanto no contexto brasileiro destaca-se o bagaço de cana-de-açúcar devido a elevado produção de açúcar e álcool no país.

Tabela 1 - Composição de celulose, hemiceluloses e lignina de diferentes biomassas lignocelulósicas.

Biomassa Lignocelulósica	% Celulose*	% Hemiceluloses*	% Lignina*
Bagaço de cana-de-açúcar	31,9 – 43,4	12,2 -25,5	23,1- 27,6
Palha de arroz	29,2 – 34,7	23,0 – 25,9	17,0 -19,0
Cascas de arroz	28,7 – 35,6	12,0 – 29,3	15,4 – 20,0
Palha de milho	30,6 – 38,1	19,1 – 25,3	16,7 – 21,3
Espigas de milho	33,7 – 41,2	31,9 – 36,0	6,1 – 15,9
Talos de milho	35,0 – 39,6	16,8 – 35,0	7,0 – 18,4
Palha de trigo	35,0 – 39,0	23,0 – 30,0	12,0 – 16,0
Casca de cevada	34,0	36,0	13,8 – 19,0
Palha de cevada	36,0 – 43,0	24,0 – 33,0	6,3 – 9,8
Palha de aveia	31,0 – 35,0	20,0 – 26,0	10,0 – 15,0
Palha de sorgo	32,0 – 35,0	24,0 – 27,0	15,0 – 21,0
Palha de centeio	36,0 - 47,0 5	19,0 - 24.	9,9 – 24,0

Fonte: Adaptado de Mussatto; Dragone (2016).*Valores em base seca.

3.2.1 Bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço da cana-de-açúcar é a fração de biomassa resultante após os procedimentos de limpeza, preparo e extração do caldo da cana-de-açúcar (LIMA, 2014), sendo constituído principalmente de celulose (35-45%), hemiceluloses (26,2-35,8%) e lignina (11,4-25,2%) (CHANDEL et al., 2013).

No cenário brasileiro foram gerados 186 milhões de toneladas (base úmida) e 93 milhões de toneladas (base seca) de bagaço de cana-de-açúcar na safra 2015/2016, considerando que a produção de cana-de-açúcar foi de 665 milhões de toneladas (CONAB, 2016), e que a cada 1 tonelada de cana-de-açúcar produz-se entre 270-280 kg de bagaço (base úmida) (CLAUSER et al., 2016) e 140 kg (base seca) (TOMÉ, 2014).

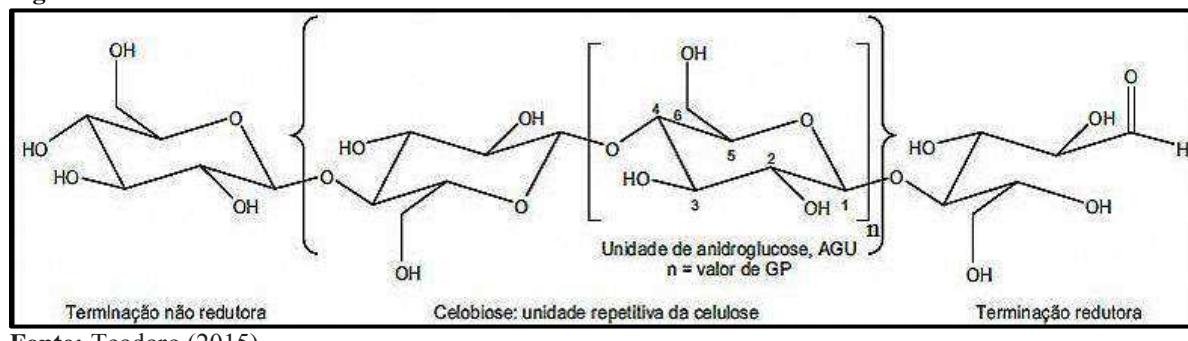
O bagaço de cana tem sido utilizado principalmente para produção de energia elétrica e calor de processo, sendo a maior parte voltada para a autosuficiência da própria planta industrial, e o excedente vendido. No entanto esta biomassa lignocelulósica, também, pode ser utilizada para produção de etanol celulósico (2^a geração) por meio da fermentação dos açúcares presentes nos carboidratos que o compõe.

Segundo Tomé (2014) o bagaço apresenta vantagens para produção de etanol de 2^a geração quando comparado a outros materiais lignocelulósicos, das quais cabe elucidar: 1^a) não necessita de transporte, visto que já está disposto dentro da usina de açúcar e álcool e 2^a) o bagaço resultante do esmagamento nas moendas apresenta características físicas (tamanho das fibras) e químicas (umidade) adequadas ao processo de produção de etanol celulósico. No entanto uma desvantagem dessa biomassa consiste na quantidade de areia presente (2 a 4%, podendo chegar a 10% dependendo dos processos de colheita e limpeza da cana), pois esta impureza causa desgaste nos equipamentos e aumenta a capacidade tamponante da biomassa, dificultando ação dos ácidos e consequentemente reduzindo a solubilização das hemiceluloses.

3.3.2 Celulose

A celulose ($C_6H_{10}O_5$)_n é um homopolímero linear, tendo como unidade repetitiva a celobiose, que por sua vez é constituída por duas unidades de D-β-anidroglicopiranose unidas por ligações glicosídicas β (1→4) (Figura 4) (AGBOR et al., 2011; AMARASEKARA, 2014b).

Figura 4- Estrutura da celulose.

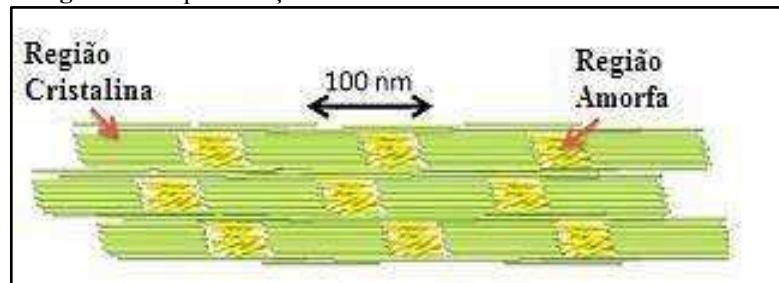


Fonte: Teodoro (2015).

O homopolímero celulose é o composto orgânico natural mais abundante e representa cerca de 40 a 60% da parede celular das plantas. A hidroxila (OH), principal grupo funcional presente na cadeia de celulose, facilita a formação de ligações de hidrogênio na mesma cadeia ou em cadeias vicinais conduzindo a formação de microfibrilas, que são responsáveis pelas propriedades mecânicas da célula, promovendo assim o suporte e resistência à parede celular (EMONS; SCHEL; MULDER, 2002).

A estrutura da celulose é formada por regiões cristalinas altamente ordenadas e por regiões amorfas que apresentam pouca organização (Figura 5) (TURUMTAY, 2015; COSTA et al., 2016). As regiões cristalinas e amorfas são mantidas por ligações de hidrogênio e pelas forças de Van der Waals, no entanto na parte amorfa existem torções que alteram o arranjo ordenado da celulose (QUIROZ-CASTAÑEDA; FOLCH-MALLOL, 2013).

Figura 5 - Representação da estrutura cristalina e amorfa da celulose.



Fonte: Adaptada de Reddy et al. (2013).

3.2.3 Hemiceluloses

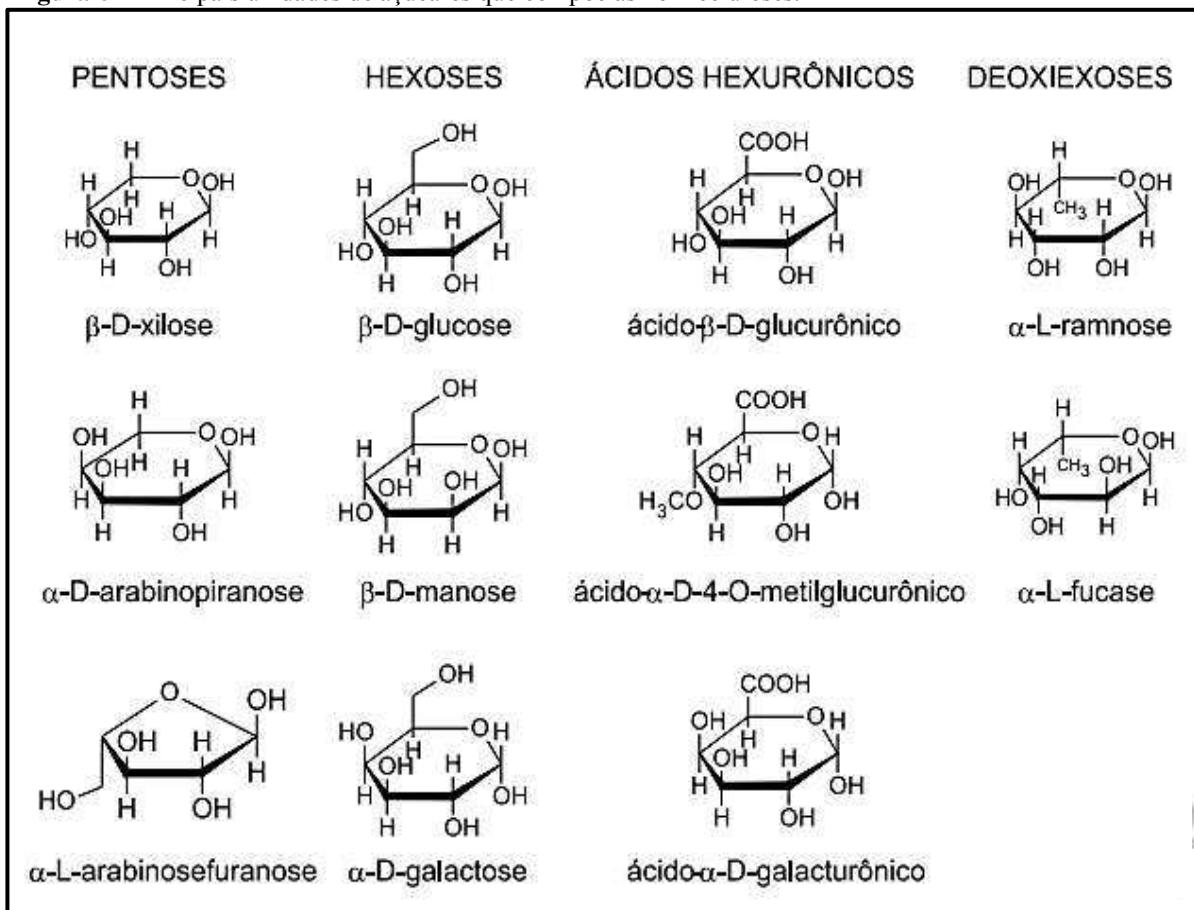
As hemiceluloses são consideradas o segundo componente mais abundante da biomassa lignocelulósica, sendo compostas principalmente de monômeros de xilose, no entanto dependendo da biomassa a composição das hemiceluloses é variável, por exemplo, as

hemiceluloses de madeiras apresentam como monômero de açúcar majoritário a manose ao invés da xilose (AGBOR et al., 2011; AMARASEKARA, 2014b; BAJPAI, 2016).

Quanto à composição química, estas são consideradas macromoléculas heterogêneas constituídas de pentoses (D-xilose, D-arabinose), metil pentoses (L-ramnose), hexoses (D-glucose, D-mannose, D-galactose) e ácidos carboxílicos (ácido D-glucurônico, ácido D-galacturônico, ácido metilglucurônico) (Figura 6), os quais podem ser direcionados a processos de bioconversão para a produção de etanol e outros produtos de valor agregado (AKHTAR et al., 2015).

As hemiceluloses apresentam uma estrutura ramificada amorfa constituída de cadeias laterais curtas de diferentes açúcares, o que facilita sua hidrólise. A hidrólise das hemiceluloses produz hidrolisados ricos principalmente em xilose, arabinose, glicose e galactose (ZHAO et al., 2012).

Figura 6 - Principais unidades de açúcares que compõe as hemiceluloses.



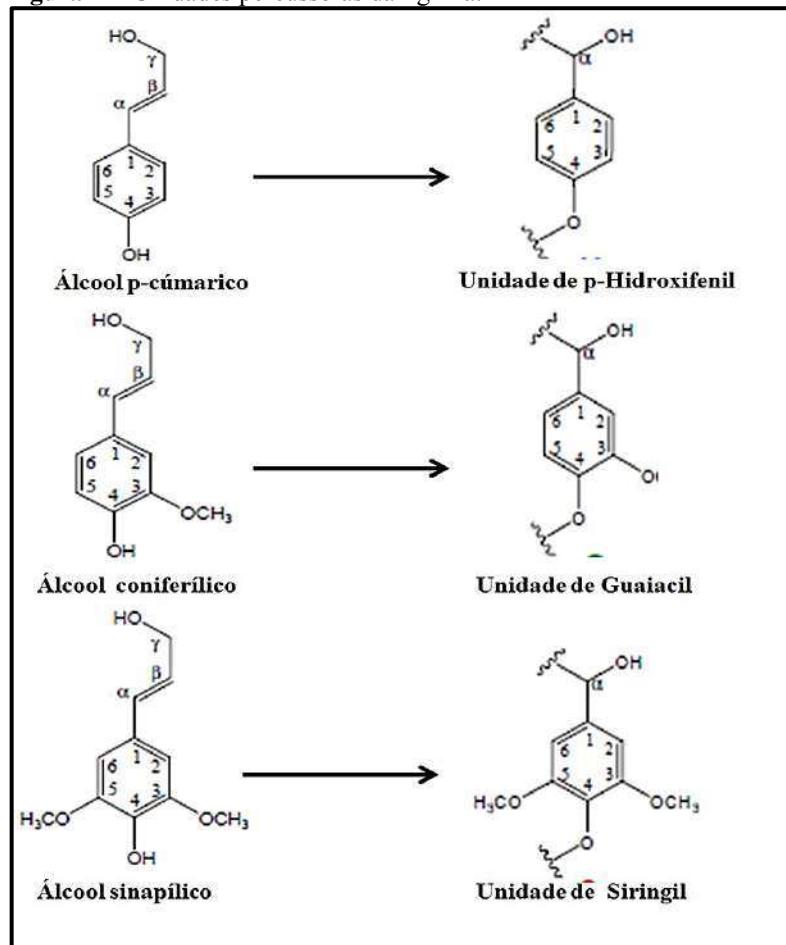
Fonte: Morais; Nascimento; Melo (2005).

3.2.4 Lignina

A lignina é o terceiro componente de maior proporção em materiais lignocelulósicos, sendo considerada uma macromolécula amorfada formada por unidades percussoras de álcool *p*-cúmarico, álcool coniferílico e álcool sinapílico (AMARASEKARA, 2014b). Estes percussores após sofrerem polimerização formam, respectivamente, as unidades de *p*-hidroxifenil, guaiacil e siringil (Figura 7), que são unidas por ligações do tipo C-C e éter (MARTÍNEZ et al., 2008; DEL RÍO et al., 2012; SHAFIEI; KUMAR; KARIMI, 2015), formando a estrutura da lignina (Figura 8).

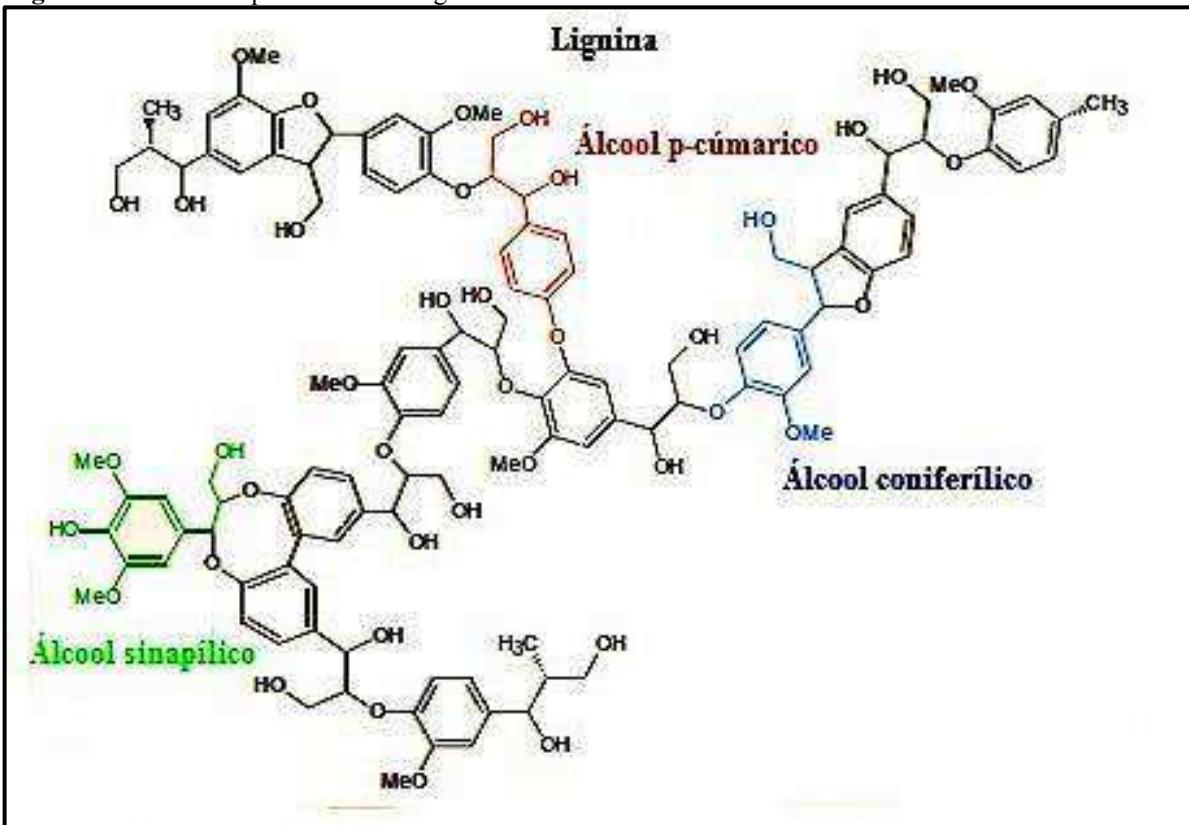
A lignina encontra-se presente na parede celular das células vegetais de todas as plantas vasculares promovendo a recalcitrância das mesmas (SATTLER; FUNNELL-HARRIS, 2013), e logo atuando na proteção dos polissacarídeos presente na parede celular contra o ataque microbiano, tornando-se assim um fator limitante para conversão da biomassa vegetal em biocombustíveis (VANHOLME et al., 2010).

Figura 7 - Unidades percussoras da lignina.



Fonte: Adaptado de Del Río et al. (2012).

Figura 8 - Estrutura representativa da lignina.



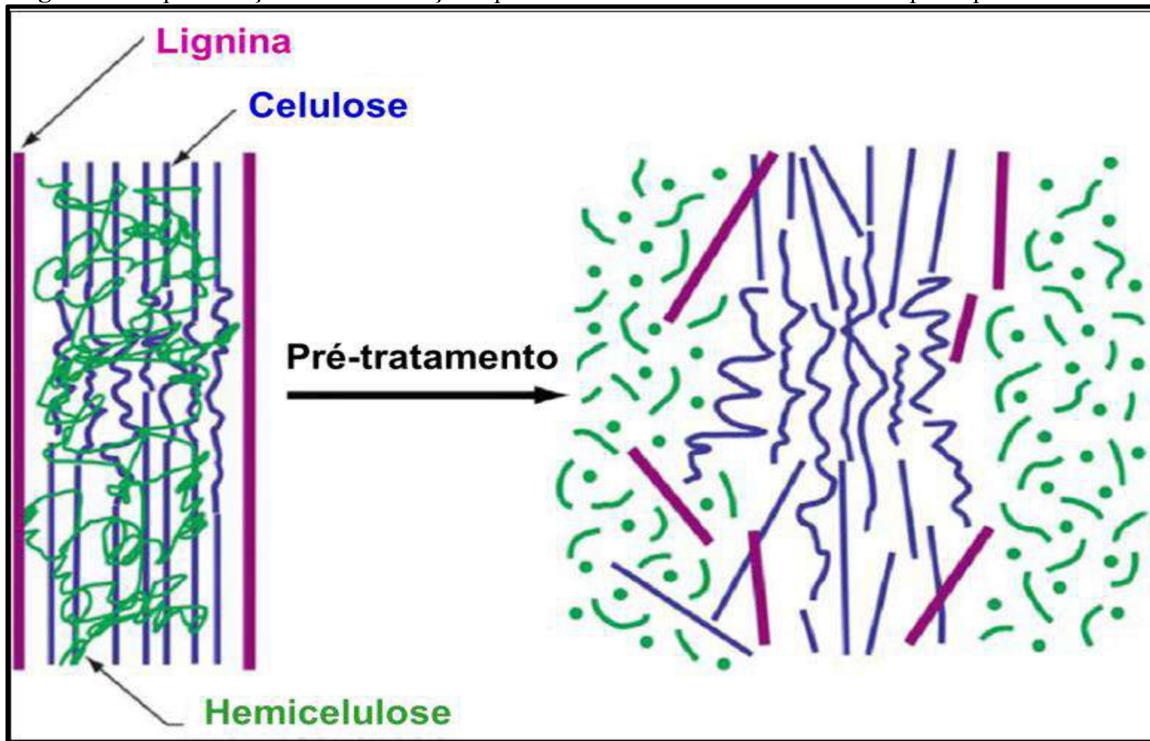
Fonte: Mussato; Dragone (2016).

3.3 Técnicas de pré-tratamento

Um dos principais obstáculos tecnológicos para conversão da biomassa lignocelulósica em etanol de 2^a geração e/ou bioproductos de valor agregado, consiste na elevada recalcitrância das fibras lignocelulósicas proveniente das complexas interações formadas entre a lignina, hemiceluloses e celulose (SUN; CHENG, 2002; CHATURVEDI; VERMA, 2013; LANGAN et al., 2014).

Dessa forma, a utilização da biomassa lignocelulósica como matéria-prima para produção de combustíveis e químicos verdes está condicionada a realização de uma etapa de pré-tratamento, que objetiva romper a estrutura da parede celular da biomassa deixando os carboidratos mais acessíveis ao ataque enzimático e, consequentemente promovendo o aumento do rendimento de açúcares fermentescíveis (Figura 9) (MOSIER et al., 2005; BINOD; PANDEY, 2015; PAL et al., 2016).

Figura 9 - Representação das modificações que ocorrem na estrutura da biomassa após o pré-tratamento.



Fonte: Bhatia; Johri; Ahmad (2012).

No entanto um determinado pré-tratamento é considerado efetivo quando, promove o aumento da área superficial e da porosidade da biomassa lignocelulósica, reduz o índice de cristalinidade da celulose, modifica e remove a lignina, despolimeriza parcialmente as hemiceluloses, diminui a formação de produtos de degradação inibidores da hidrólise e fermentação, minimiza a degradação dos carboidratos e possui custo efetivo (SUN; CHENG, 2002; KUMAR et al., 2009; HARMSEN et al., 2010). A escolha de um pré-tratamento eficaz para melhoria da digestibilidade da biomassa lignocelulósica, mostra-se de extrema importância, visto que mais de 40% dos custos totais do processo produtivo do etanol celulósico, são advindos da etapa de pré-tratamento (SHINDHU; BINOD; PANDEY, 2016).

Nessa perspectiva, diferentes métodos de pré-tratamento vem sendo estudados nas últimas décadas. Tais processos podem ser classificados em físicos (moagem, irradiação, extrusão, entre outros), químicos (ácido diluído, alcalino, líquidos iônicos, agentes oxidantes, organossolve), físico-químicos (explosão a vapor, hidrotérmico, expansão da fibra com amônia (AFEX)) e biológicos (KUMAR et al., 2009; BRODEUR et al., 2011). As vantagens e desvantagens de alguns pré-tratamentos físicos, químicos, físico-químicos e biológicos utilizados para aumentar a digestibilidade da biomassa lignocelulósica encontram-se elucidadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Vantagens e desvantagens de alguns pré-tratamentos físicos, químicos, físico-químicos e biológicos.

PRÉ-TRATAMENTO	VANTAGENS	DESVANTAGENS
FÍSICO		
- Moagem; - Irradiação - Extrusão	- Redução da cristalinidade e do grau de polimerização da celulose; - Aumento da área superficial.	- Elevado gasto energético; - Não promove remoção de lignina
QUÍMICO		
- Ácido concentrado; - Ácido diluído; - Alcalino; - Organossolve.	- Alto rendimento de glicose; - Solubilização parcial ou total da lignina; - Diminuição da cristalinidade da celulose; - Aumento da área superficial da biomassa; - Diminuição grau de polimerização da celulose.	- O tratamento com ácidos concentrados promove a corrosão dos equipamentos; - Alto custo dos ácidos, bases e dos solventes; - Dificuldades de recuperação dos ácidos, bases e solventes; - Formação de produtos inibidores de hidrólise e fermentação;
FÍSICO-QUÍMICO		
- Explosão a vapor - Hidrotérmico, entre outros.	- Solubilização parcial ou total das hemiceluloses; - Altos rendimentos de glicose e açúcares de hemicelulose;	- Formação de produtos de degradação; - Necessário uma posterior etapa de deslignificação;
BIOLÓGICO		
- Fungos da podridão branca e bactérias	- Remove quantidade considerável de lignina; - Pré-tratamento brando, não formando produtos inibidores de fermentação	- Maior tempo de residência; - Necessidade de monitoramento durante o crescimento dos microrganismos; - Os fungos e bactérias consomem um pouco do carboidrato disponível, reduzindo assim o rendimento dos açúcares.

Fonte: Sims et al. (2008); Kumar et al. (2009); Ogeda; Petri (2010); Agbor et al.(2011); Mood et al., (2013); Shafiei; Kumar; Karimi (2015).

3.3.1 Pré-tratamento de Explosão a Vapor

Dentre os pré-tratamentos destacados, o de explosão a vapor é um dos métodos mais aplicados para biomassas lignocelulósicas (AMARASEKARA, 2014c; ZHENG et al., 2014), uma vez que promove modificações químicas na composição da biomassa e fraturas na estrutura da parede celular (ZHAO, ZHANG, LIU, 2012), garantindo maior acessibilidade das enzimas aos carboidratos.

No pré-tratamento de explosão a vapor com e sem adição de catalisadores, a biomassa é submetida, por segundos a minutos, a uma atmosfera de vapor saturado de alta

pressão em temperaturas entre 160°-240°C e pressões entre 0,7 e 4,8 MPa, seguida de uma descompressão súbita que provoca a solubilização da fração hemicelulósica e modificações na lignina, garantindo assim uma maior acessibilidade de enzimas a fração celulósica, e logo promovendo uma maior digestibilidade da biomassa lignocelulósica (KUMAR et al., 2009; AGBOR et al., 2011).

O processo ocorre em duas etapas, sendo a primeira denominada autohidrólise e a segunda descompressão. Na primeira etapa, o vapor condensa e permeia a estrutura lignocelulósica removendo os grupos acetil e urônicos presentes nas cadeias de hemiceluloses e formando, respectivamente, ácido acético e ácido urônico, os quais atuam na hidrólise da fração hemicelulósica. Na etapa de descompressão, a umidade condensada nas fibras evapora novamente e promove a ruptura mecânica da estrutura lignocelulósica (ZHENG et al., 2014; WANG et al., 2015; DUQUE et al., 2016).

A utilização do pré-tratamento de explosão a vapor apresenta como vantagens, o uso limitado de produtos químicos, o baixo gasto energético quando comparado aos pré-tratamento mecânicos, não requer gastos com reciclagem devido ao baixo impacto ambiental e a biomassa após a explosão é bastante suscetível à ação de enzimas celulolíticas. No entanto este método apresenta como principais desvantagens: a formação de produtos de degradação inibidores do processo fermentação (furfural e 5-hidrometilfurfural), solubilização de uma parte da fração de carboidratos (hemiceluloses), necessidade de lavar a biomassa para remoção dos produtos tóxicos formados e desestruturação incompleta do complexo lignina-carboidrato (SUN ; CHEN, 2002; AGBOR et al., 2011; WANG et al., 2015).

Diversos estudos tem mostrado a eficiência deste pré-tratamento para melhoria da digestibilidade enzimática de inúmeras biomassas lignocelulósicas, como bagaço de cana-de-açúcar (VERARDI et al., 2015; ROCHA et al., 2012b), palha de cana (OLIVEIRA et al., 2013) palha de milho (ÖHGREN et al., 2007; LIU; CHEN, 2016), palha de trigo (ALVIRA et al., 2016); palha de arroz (SHARMA et al., 2015), resíduo de eucalipto (PARK et al., 2012), capim-elefante (SCHOLL et al., 2015), palha de colza (LÓPEZ-LINARES et al., 2015), entre outros.

3.3.2 Pré-tratamento alcalino

O pré-tratamento alcalino é um dos métodos químicos que tem sido utilizado para melhorar a digestibilidade enzimática de diferentes biomassas lignocelulósicas. Neste método utiliza-se bases, como NaOH (Hidróxido de sódio), KOH (Hidróxido de potássio), NH₃

(amônia) e Ca(OH)₂ (Hidróxido de cálcio) que atuam majoritariamente na solubilização da fração de lignina presente na biomassa, porém o tratamento utilizando NaOH é o mais utilizado (XU; SUN, 2016).

No pré-tratamento alcalino, a biomassa sofre reações de solvatação e saponificação, que provocam principalmente a solubilização da lignina, além do inchamento da estrutura lignocelulósica, aumento da área superficial, redução da cristalinidade e do grau de polimerização da celulose, bem como remoção dos grupos acetil e de ácido urônico da cadeia das hemiceluloses. Essas modificações promovem o aumento da digestibilidade enzimática, uma vez que se tem uma maior acessibilidade de enzimas aos carboidratos presentes no material lignocelulósico (AGBOR et al., 2011; SINDHU; PANDEY; BINOD, 2015).

Dentre as principais vantagens do pré-tratamento alcalino, destacam-se a possibilidade de ser realizado em baixas temperaturas e pressões, promover uma maior degradação da lignina e menor degradação dos açúcares, possibilidade de recuperação e/ou regeneração dos sais cáusticos e baixa corrosão nos reatores quando comparado ao pré-tratamento com ácidos. A principal desvantagem consiste no tempo de reação que pode levar de horas a dias (KUMAR et al., 2009; XU; SUN, 2016).

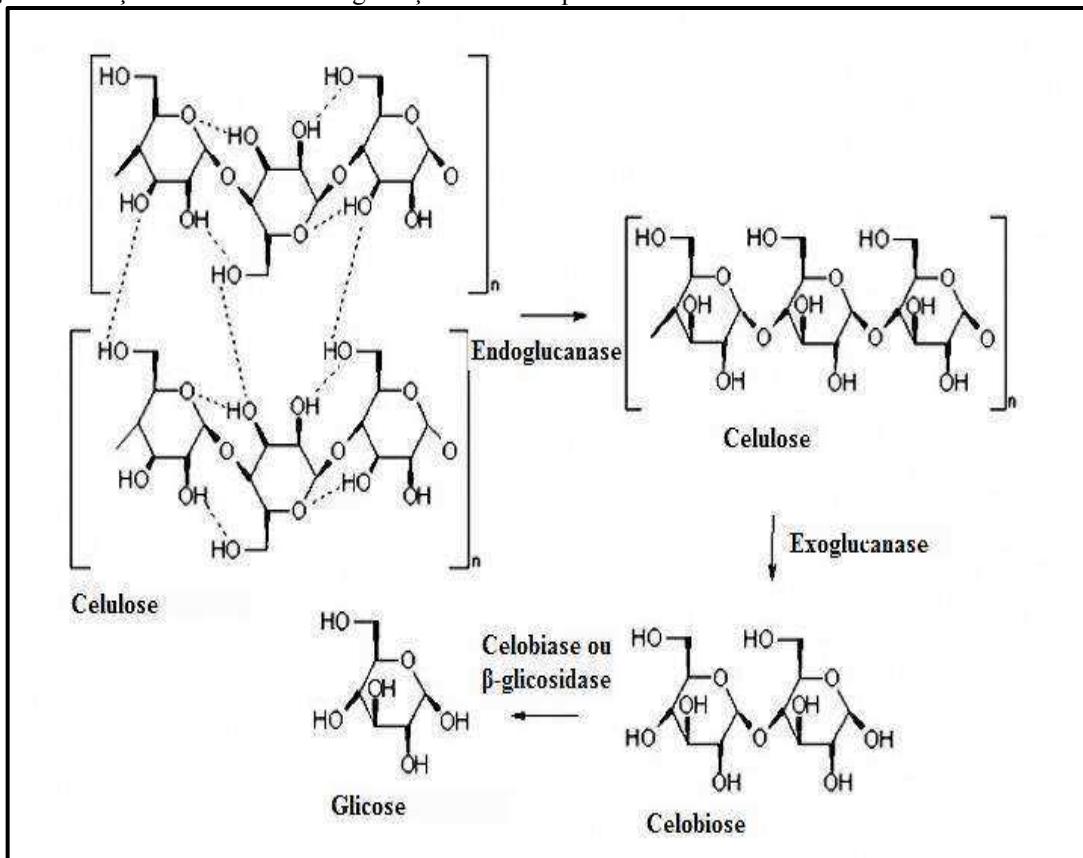
3.4 Hidrólise Enzimática

O processo de conversão dos carboidratos presentes na biomassa lignocelulósica, celulose e hemicelulose, em açúcares fermentáveis é denominado hidrólise ou sacarificação. O processo de hidrólise pode ser dividido em hidrólise ácida e em hidrólise enzimática. Na hidrólise ácida empregam-se ácidos como catalisadores, enquanto que na enzimática utilizam-se enzimas (SHUDDHODANA et al., 2016).

Durante a hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica, uma série de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas atuam em sinergia produzindo, respectivamente, monômeros de glicose e xilose (considerando que as hemiceluloses são constituídas principalmente de xilana) (ZHANG et al., 2010). A hidrólise das cadeias de celulose ocorre pela ação de celulases, que de acordo com sua função podem ser classificadas em: **endoglucanases** (EC 3.2.1.4) que clivam as ligações glicosídicas β (1-4) da cadeia de celulose formando novas extremidades redutoras e não redutoras; **exoglucanases ou cellobiohidrolase** (EC 3.2.1.91) que atuam na extremidade não redutora da celulose formando unidades de celobiose e as β -

glicosidases ou celobiases (EC 3.2.1.21), que clivam a celobiose formando monômeros de glicose (Figura 10) (RABELO, 2010; AMARASEKARA, 2014d).

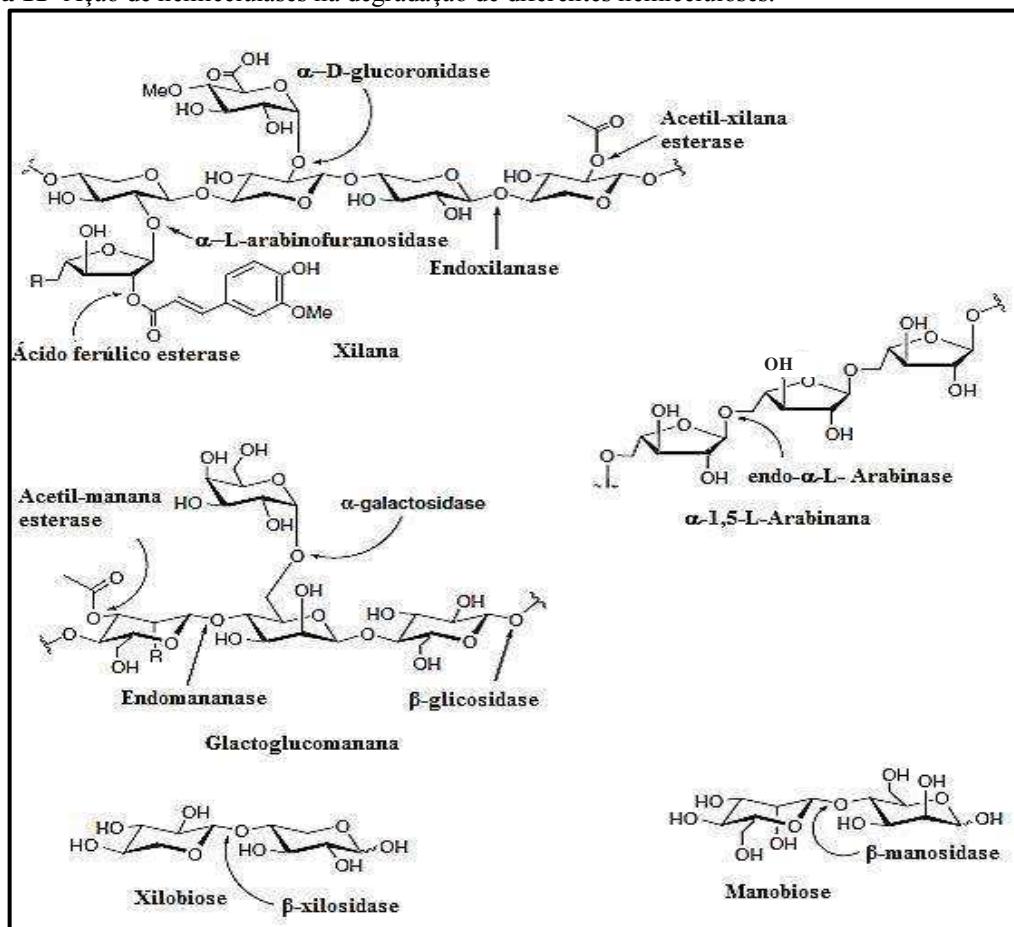
Figura 10 - Ação de celulases na degradação da cadeia polimérica de celulose.



Fonte: Farinas (2011).

Já a hidrólise das hemiceluloses, requer uma série de enzimas uma vez que estas apresentam uma estrutura heterogênea. As principais enzimas envolvidas na sacarificação das hemiceluloses são as **β -xilanases** que quebram as ligações glicosídicas internas da cadeia de xilana reduzindo o grau de polimerização do substrato e as **β -xilosidase** que hidrolisam pequenos xilooligossacarídeos e xilobiose a partir da extremidade não redutora, liberando xilose. O complexo hemicelulolítico além de possuir β -xilanases e β -xilosidase, é formado por outras enzimas como a α -L-arabinofuranosidase, α -glucuronidase, acetil xilano esterase, e esterases de ácido hidroxicinâmico, as quais clivam as cadeias laterais ligadas a xilana (Figura 11) (POLIZELI et al., 2005; RIZK; ANTRANIKIAN; ELLEUCHE, 2012; AMARASEKARA, 2014d).

Figura 11- Ação de hemicelulases na degradação de diferentes hemiceluloses.



Fonte: Amarasekara (2014d).

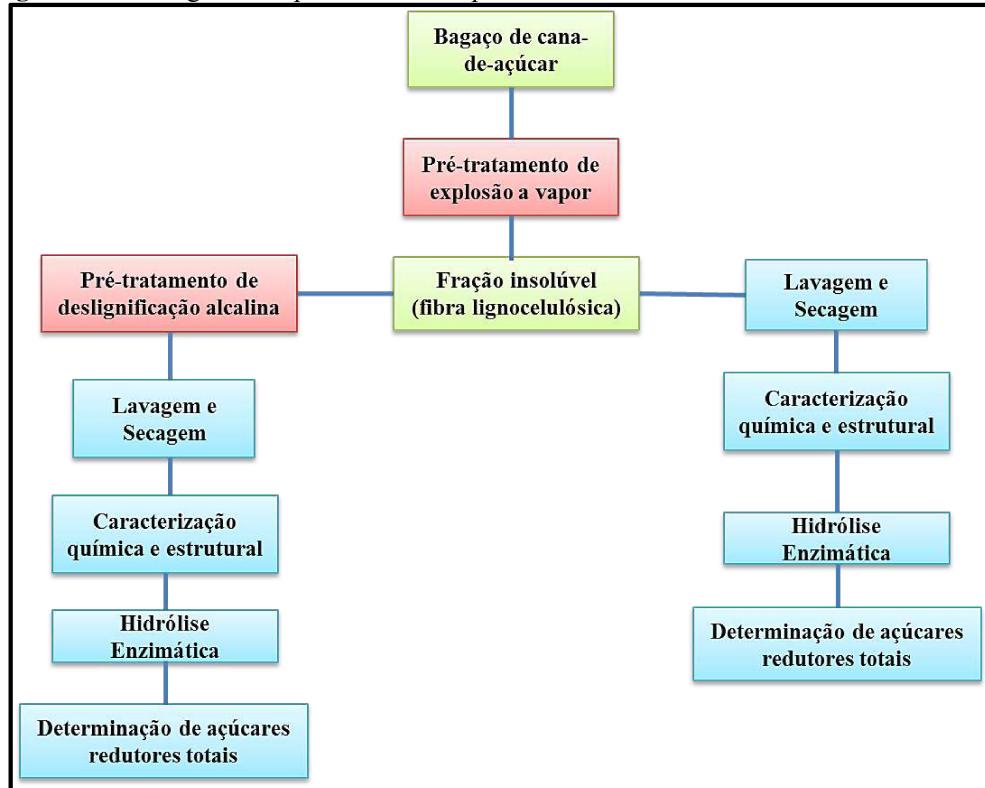
O processo de hidrólise enzimática dos carboidratos (celulose e hemiceluloses) presentes na biomassa pode ser limitado por diferentes fatores, como a cristalinidade, grau de polimerização e área superficial da celulose, percentual de lignina e o grau de acetilação das hemiceluloses (LAUREANO-PEREZ et al., 2005; YANG et al., 2011).

Diante dos dados apresentados na revisão de literatura, cabe destacar que as principais contribuições do presente estudo para o estado da arte da produção de etanol de 2^a geração, concernem na utilização de um ácido orgânico como catalisador do processo de explosão a vapor, o qual garante um menor custo e uma maior sustentabilidade ambiental a referido pré-tratamento quando comparado com a utilização de ácido sulfúrico, clorídrico ou fosfórico, os quais vem sendo amplamente estudados. Outro ponto que merece destaque refere-se a realização da explosão a vapor com NaOH, a qual promoveu simultaneamente a desestruturação da fibra e a remoção de lignina, reduzindo assim uma das etapas do processo de produção de etanol celulósico, uma vez que após pré-tratamento de explosão a vapor a biomassa, geralmente, necessita ser submetida a uma etapa de deslignificação com intuito de torná-la mais susceptível ao ataque enzimático.

4 METODOLOGIA

As etapas metodológicas utilizadas para realização do presente trabalho encontram-se sistematizadas no fluxograma abaixo (Figura 12) e detalhadas nos tópicos seguintes.

Figura 12 - Fluxograma do procedimento experimental.



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.1 Biomassa lignocelulósica

O bagaço de cana-de-açúcar (BCA) doado pela Usina Araporã Bioenergia S/A foi previamente seco ao sol até umidade inferior a 15% e armazenado em sacos plásticos até utilização.

4.2 Pré-tratamento de explosão a vapor

O pré-tratamento de explosão a vapor foi conduzido em um reator térmico de escala laboratorial com volume de 1,4 L com controle de tempo reacional e temperatura, e equipado com uma válvula de despressurização do modelo abre e fecha com diâmetro interno

de 2,0 cm. O carregamento do reator foi realizado manualmente pela adição da fração de biomassa seguida da solução geradora de vapor, na proporção de 1:20 (m/v). O tempo para aquecimento do reator até a temperatura de trabalho (180 °C) foi de 1h30min. Após atingir a temperatura em questão a mistura reacional foi mantida por mais 5 min (tempo de retenção) e subitamente despressurizada. Após a despressurização súbita do reator o BCA pré-tratado foi lavado com água até pH neutro para remoção das frações solúveis e seco em estufa de circulação de ar a 105°C por 12 h.

As condições operacionais de realização do pré-tratamento de explosão a vapor encontram-se descritas na Tabela 3.

Tabela 3 - Condições utilizadas no pré-tratamento de explosão a vapor.

Massa de BCA*	Volume da solução	Temperatura	Pressão	Tempo de retenção
40,0 g	800 mL de água destilada	180 °C	0,86 MPa	5 min
40,0 g	800 mL de ácido cítrico 0,01 M (pH = 2,7)	180 °C	0,86 MPa	5 min
40,0 g	800 mL de NaOH 0,1 M (pH = 13)	180 °C	0,86 MPa	5 min

* massa em base úmida (umidade de aproximadamente 13%).

4.3 Pré- tratamento de deslignificação alcalina

A deslignificação do bagaço *in natura* e pré-tratado por explosão a vapor com ácido cítrico, NaOH e sem catalisador (água), foi realizada considerando uma relação sólido/líquido (1:20), ou seja, a cada 1 g de bagaço adicionou-se 50 mL de NaOH 2%. Para realização da deslignificação colocou-se 50 g de bagaço (umidade entre 9,0-10,0%) em um balão de fundo redondo com duas bocas e adicionou-se 1 L de NaOH 2% (m/m). A mistura reacional foi mantida em refluxo por 4 horas a uma temperatura de 120°C e em seguida a biomassa deslignificada foi lavada com água até pH neutro e seca em estufa de circulação de ar a 105°C por 12 h.

4.4 Rendimento dos pré-tratamentos

Os rendimentos dos pré-tratamentos de explosão a vapor e deslignificação alcalina foram calculado pela equação 1.

$$R = \frac{M_f}{M_i} \times 100 \quad \text{equação (1)}$$

Onde **R** é rendimento do pré-tratamento; **M_f** a massa final da biomassa após o pré-tratamento (base seca) e **M_i** a massa inicial da biomassa *in natura* (base seca).

4.5 Caracterizações da biomassa lignocelulósica

4.5.1 Caracterização química

A determinação da composição química do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratado por explosão a vapor com água, ácido cítrico e NaOH e após a deslignificação alcalina foi realizada por metodologias de referência para caracterização de matérias lignocelulósicos, sendo: umidade (TAPPI T264 OM-88), cinzas (TAPPI T211 OM-93), lignina Klason insolúvel e solúvel (TAPPI T13M-54), holocelulose pelo método do clorito ácido e celulose por extração alcalina (BROWNING, 1967) e hemiceluloses por medida indireta da diferença entre os teores de holocelulose e celulose.

Todas as análises químicas descritas foram realizadas em triplicata e os valores foram expressos em base seca e considerando o rendimento dos pré-tratamentos.

Os valores dos constituintes presentes na biomassa foram corrigidos pelo rendimento de cada pré-tratamento, conforme equação 2.

$$Y_f = P_f \times \frac{R}{100} \quad \text{equação (2)}$$

Sendo **Y_f** o valor do componente corrigido pelo rendimento do pré-tratamento; **P_f** o percentual do componente no bagaço de cana-de-açúcar após o pré-tratamento e **R** o rendimento do pré-tratamento.

A solubilização da lignina, hemicelulose e celulose foi calculada por meio da equação 3 proposta por Oliveira (2010):

$$S = (1 - \frac{Y_f}{Y_i}) \times 100 \quad \text{equação (3)}$$

Sendo **S** o percentual de solubilização do componente (celulose, hemiceluloses e lignina); **Y_f** o percentual do componente corrigido após o pré-tratamento e **Y_i** o percentual do componente no bagaço *in natura*.

4.5. 2 Umidade

Colocou-se uma massa de aproximadamente $2,0000 \pm 0,0001$ g de amostra em um cadinho de porcelana previamente seco e tarado e acondicionou-se este conjunto em estufa a 105 ± 3 °C por 2 horas, posteriormente o mesmo foi resfriado em dessecador até temperatura ambiente e pesado. Em seguida, o conjunto foi colocado novamente na estufa por mais 1 hora a 105 ± 3 °C e repetiram-se os procedimentos de arrefecimento e pesagem até massa constante, ou seja, quando as pesagens não diferiram por mais de 0,002 g. O teor de umidade foi calculado por meio da diferença percentual entre a massa inicial e a massa final da amostra após o processo de secagem.

4.5.3 Cinzas

Em um cadinho de porcelana previamente seco e tarado, foi colocada uma massa de aproximadamente 1,0000 g de amostra e o conjunto foi acondicionado em um forno mufla em temperatura de 800°C por 2 h. Em seguida o sistema (cadinho + amostra calcinada) foi resfriado em dessecador até temperatura ambiente e pesado. O conteúdo de cinzas foi determinado considerando a porcentagem de massa da amostra após a calcinação com relação a massa inicial de amostra seca.

4.5.4 Lignina Klason Insolúvel

Uma massa de aproximadamente $1,0000 \pm 0,0001$ g de BCA seca foi disposta em um almofariz e adicionou-se 15,0 mL de solução de ácido sulfúrico 72% (m/m) ($d = 1,6338$ g.mL⁻¹, 20°C). Posteriormente macerou-se a mesma exaustivamente e deixou-se em repouso por 2 horas a temperatura ambiente (contadas a partir da adição de ácido). Transcorridas às 2 horas, a mistura foi transferida para um balão de fundo chato com capacidade de 1 L, e adicionou-se água destilada até que a concentração de ácido sulfúrico fosse de 3% (m/m) (adição de 551 mL de água). Sequencialmente aqueceu-se o sistema sob refluxo por 4 h.

Em seguida, filtrou-se a lignina insolúvel em funil de vidro sinterizado nº4, previamente seco e tarado. Coletou-se o filtrado para análise posterior de lignina Klason solúvel. O funil com a lignina insolúvel foi seco em estufa a 105 ± 3 °C por 12 horas, resfriado em dessecador até temperatura ambiente e pesado (em uma balança com precisão de

0,0001g), sedo o conteúdo de lignina insolúvel calculado pela relação entre a porcentagem da massa de lignina insolúvel em relação à massa inicial de amostra seca.

4.5.5. Lignina Klason Solúvel

O teor de lignina Klason solúvel foi quantificado por meio da técnica de espectroscopia na região do ultravioleta (UV-VIS). As soluções para as análises foram preparadas tomando o filtrado da etapa anterior e diluindo-o com aguá até a concentração final de 0,05 mol.L⁻¹ de ácido sulfúrico. Uma solução de referência (branco) de concentração de 0,05 mol.L⁻¹ foi preparada, a partir do ácido sulfúrico 72%. Mediú-se a absorbância do filtrado nos comprimentos de onda de 215 e 280 nm. A concentração (g.L⁻¹) de lignina Klason solúvel foi calculada pela equação 4:

$$C \text{ (g.L}^{-1}\text{)} = \frac{[(4,53 \cdot A_{215}) - A_{280}]}{300} \quad \text{equação (4)}$$

Em que **C** (g.L⁻¹) corresponde a concentração de lignina Klason solúvel em meio ácido; **A₂₁₅** o valor da absorbância em 215 nm e **A₂₈₀** o valor da absorbância em 280 nm.

A absorbância em 280 nm corresponde a uma correção para os compostos de furfural gerados no processo de hidrólise, enquanto que a absorbância em 215 nm é a medida da concentração de lignina solúvel. Dessa forma, a equação (4) é resultante da resolução simultânea das equações (5) e (6):

$$A_{280} = 0,68 C_D + 18 C_L \quad \text{equação (5)}$$

$$A_{215} = 0,15 C_D + 70 C_L \quad \text{equação (6)}$$

Onde o **A₂₈₀** representa o valor da absorbância a 280 nm; **A₂₁₅** é o valor da absorbância a 215 nm, **C_D** a concentração dos carboidratos (g.L⁻¹) e **C_L** a concentração da lignina solúvel (g.L⁻¹).

Os valores 0,68 e 0,15 correspondem, respectivamente, as absorvividades molares dos produtos de degradação dos carboidratos em 280 e 215 nm, e os valores 18 e 70 são as respectivas absorvividades molares da lignina solúvel em 280 e 215nm.

4.5.6 Holocelulose

Colocou-se uma massa de 5,0000 g de amostra seca em um erlenmeyer de 250 mL e adicionou-se 100 mL de água destilada. Em seguida o erlenmeyer foi colocado em banho-maria, a 75 °C e adicionou-se 2,0 mL de ácido acético e 3,0 g de clorito de sódio, nesta ordem, tampando o erlenmeyer para não ocorrer à perda do gás produzido na reação. Após 1 hora, adicionou-se novamente 2,0 mL de ácido acético e 3,0 g de clorito de sódio, sendo esse processo foi repetido por mais duas vezes.

Por fim, a mistura foi resfriada em banho de gelo até 10 °C, filtrada em funil de vidro sinterizado n°2, previamente seco e tarado, e lavada com água destilada a 5°C até que o resíduo fibroso apresentasse coloração esbranquiçada e o pH do eluído igual ao da água de lavagem. Em seguida, o funil com o resíduo fibroso foi seco em estufa a 105 ± 3 °C por 6 horas, resfriado em dessecador e pesado. O percentual de holocelulose foi calculado pela relação entre a massa de holocelulose obtida e a massa inicial da amostra.

4.5.7 Celulose

Transferiu-se 3,0000 g de holocelulose seca para um erlenmeyer de 250 mL, adicionou-se 100 mL de solução de KOH (5%) e borbulhou-se gás nitrogênio durante os primeiros cinco minutos da extração, para evitar a oxidação da celulose. O erlenmeyer foi vedado e mantido em agitação constante por 2 horas. A mistura foi então filtrada em funil de vidro sinterizado n° 2, lavada com 50 mL de solução de KOH (5%) e em seguida com 100 mL de água destilada. O resíduo fibroso retido no funil foi transferido novamente para o Erlenmeyer de 250 mL e o mesmo procedimento de extração foi repetido utilizando solução de KOH (24 %). Para lavagem do resíduo fibroso retido no funil, utilizou-se 25 mL de solução de KOH (24%), 50 mL de água destilada, 25 mL de ácido acético (10%) e 100 mL de água destilada. Após a extração dos componentes solúveis em soluções aquosas de hidróxido de potássio, o resíduo fibroso foi lavado com água destilada até que o filtrado apresentasse pH neutro. Por fim, o resíduo foi lavado com 50 mL de acetona, seco a 105 ± 3 °C por 6 horas e pesado. O conteúdo de celulose foi determinado como a porcentagem da massa de resíduo em relação a massa inicial de amostra seca, levando em conta o rendimento calculado na obtenção da holocelulose.

4.5.8 Hemiceluloses

O teor de hemiceluloses foi determinado pela diferença percentual entre a holocelulose e a celulose em relação a massa inicial de amostra seca, levando em conta a o rendimento calculado na obtenção da holocelulose.

4.5.9 Análise de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A análise das alterações dos grupos funcionais do bagaço sem tratamento e após os pré-tratamentos de explosão a vapor e deslignificação alcalina foi obtida utilizando um espectrofotômetro Shimadzu IRPrestige 21. As amostras foram pastilhadas com KBr na proporção mássica de 1:100 e os espectros foram obtidos na região de 4500 a 400 cm^{-1} , resolução de 4 cm^{-1} e 32 varreduras.

4.5.10 Difração de Raio -X (DRX)

Os difractogramas de raio-X da biomassa *in natura* e pré-tratada foram obtidos utilizando um difratômetro Shimadzu XRD - 6000 LabX com intervalo de 4 a 45° (2θ), velocidade de varredura de 2°/min, potência de 40 kV com uma corrente de 30 mA e radiação CuKa (1,5406 Å) . O índice de cristalinidade das amostras de bagaço foi determinado pela equação 3, proposta por Segal et al., 1959.

$$\mathbf{ICr} = \frac{(I_{200} - I_{am})}{I_{200}} \times 100 \quad \text{equação (7)}$$

Onde **ICr** expressa o grau de cristalinidade relativo; **I₂₀₀** refere-se a intensidade máxima, em unidades arbitrárias, no pico cristalino à aproximadamente $2\theta = 22^\circ$ e **I_{am}** é a intensidade da região amorfa em $2\theta = 18^\circ$.

4.5.11 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para análise da superfície das amostras sem tratamento e pré-tratadas utilizou-se um microscópio eletrônico de varredura modelo de Carl Zeiss EVO 10 MA. As amostras

foram fixadas em suportes de alumínio com fita de carbono e metalizadas com ouro. As imagens de MEV foram obtidas com ampliação de 500X e tensão de aceleração de 5.0 kV.

4.5.12 Hidrólise enzimática

Os parâmetros operacionais do processo de hidrólise foram definidos de acordo com as recomendações descritas na ficha técnica do complexo enzimático de celulases e hemicelulases, Cellic® CTec 3 (NOVOZYMES, 2012). A atividade da enzima em unidades de papel filtro (FPU) foi determinada de acordo com método descrito por Ghose (1987), sendo que para a enzima em questão esta foi equivalente a 194,73 FPU/mL.

Inicialmente, antes de submeter à biomassa ao processo de hidrólise enzimática, está foi umidificada por 2h em 15 mL de tampão de citrato de sódio 50 mM (pH=5,0) sob rotação de 150 rpm. A hidrólise enzimática foi realizada em erlenmeyers de 50 mL com volume final de 20 mL constituído de 3% de BCA (massa seca), tampão de citrato de sódio 50 mM (pH=5,0), 10 FPU do complexo enzimático Cellic® CTec 3/g de celulose presente no substrato. Os frascos de reacionais foram mantidos sob agitação de 150 rpm a 50°C por 72 h em uma incubadora shaker Novatecnica e retirou-se alíquotas de 1,5 mL após os tempos de reação de 0, 12, 24, 36, 48 e 72h para determinação de açúcares redutores totais (ART) utilizando o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) proposto por Miller (1959). O percentual de sacarificação (hidrólise) foi calculado pela equação (8) descrita por Mandels; Sternberg (1976).

$$\% \text{Sacarificação} = \frac{[\text{ART}] \text{ mg.mL}^{-1} \times 0,9 \times 100}{[\text{Biomassa}] \text{ mg.mL}^{-1}} \quad \text{equação (8)}$$

Em que **[ART]** representa a concentração de açúcares redutores totais e **[Biomassa]** corresponde à concentração inicial da biomassa. O fator **0,9** foi usado para converter polissacarídeo em monossacarídeo após absorção de água na hidrólise.

4.6 Análise estatística

Determinou-se a média e o desvio padrão entre os valores obtidos na caracterização química e na hidrólise enzimática da biomassa em estudo, bem como a

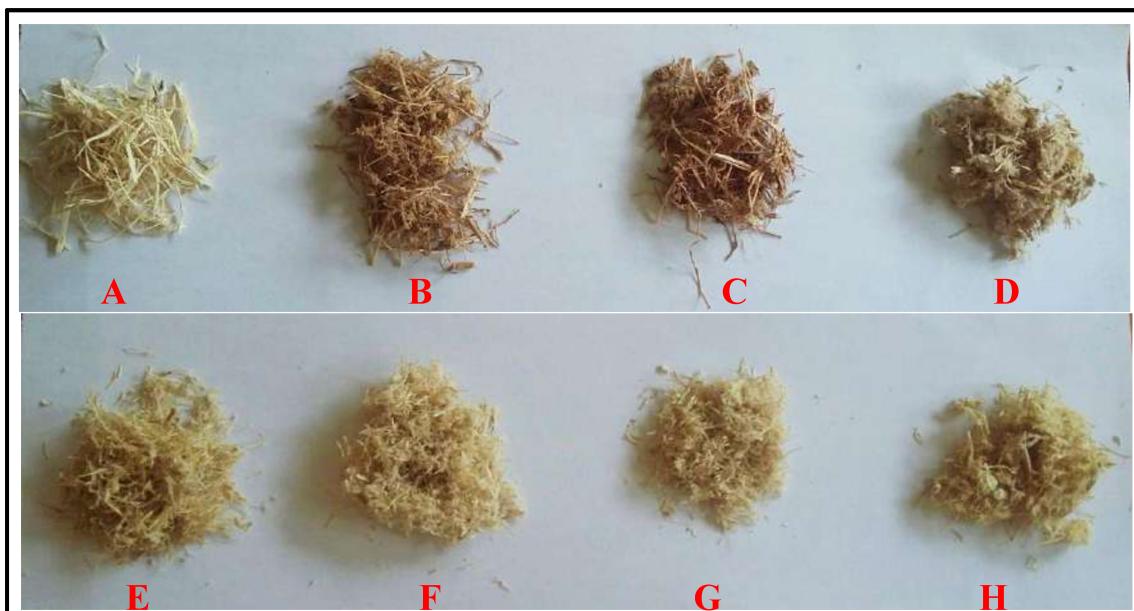
correlação de Person ($p<0,05$) entre o teor de lignina, índice de cristalinidade e a concentração de ART, utilizando o software Statistica 10.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. 1 Aspecto físico e Composição Química

O bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratado por explosão a vapor sem catalisador e com ácido cítrico, apresentou um coloração mais escura quando comparados a fibra sem tratamento (Figura 13A, B e C). De acordo com Cureli et al. (2002) o escurecimento da biomassa tratada com ácido pode ser proveniente da formação de produtos de degradação dos celulose e hemicelulose e ou da catálise acida da ligações entre a lignina e os carboidratos. Haseth (2012) atribuiu o escurecimento da biomassa tratada com líquidos iônicos à condensação da lignina. No entanto após a realização da explosão com NaOH e do processo de deslignificação alcalina a biomassa apresentou-se mais quebradiça e com coloração em tons mais claros que o material *in natura*, possivelmente devido a elevada remoção de lignina (Figura 13D, E, F, G e H).

Figura 13 - Amostras de bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratado.



Fonte: Elaborada pelo autor. **A**- Bagaço de cana *in natura*; **B**- Bagaço explosão água; **C**- Bagaço explosão ácido; **D** – Bagaço explosão NaOH; **E** – Bagaço *in natura* deslignificado; **F** – Bagaço explosão água deslignificado; **G** – Bagaço explosão ácido cítrico e deslignificado; **H**- Bagaço explosão NaOH e deslignificado.

Os valores do percentual mássico da composição química do BCA *in natura* e pré-tratado em base seca, e os valores corrigidos pelo rendimento dos pré-tratamentos de explosão a vapor com água (89,98%), ácido cítrico (76,18) e NaOH (71,82%) encontram-se descritos nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4 - Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratado por explosão a vapor catalisada por ácido cítrico e NaOH.

COMPOSIÇÃO QUÍMICA (%)	BI	BEA	BEH	BEOH
Lignina Total	24,22 ± 0,36	25,06 ± 0,21	27,24 ± 0,23	11,82 ± 0,56
Hemiceluloses	27,61 ± 0,07	27,65 ± 0,40	21,21 ± 0,56	38,78 ± 0,27
Celulose	42,77 ± 0,29	49,07 ± 0,69	52,32 ± 0,59	46,55 ± 0,10
Cinzas	2,14 ± 0,32	-	-	-
Total de matéria seca	96,74 ± 1,04	101,78 ± 1,3	100,77 ± 1,38	97,15 ± 0,93

Fonte: Elaborada pelo autor. **BI** – Bagaço *in natura*; **BEA** – Bagaço explosão água; **BEH** – Bagaço explosão ácido; **BEOH** – Bagaço explosão NaOH.

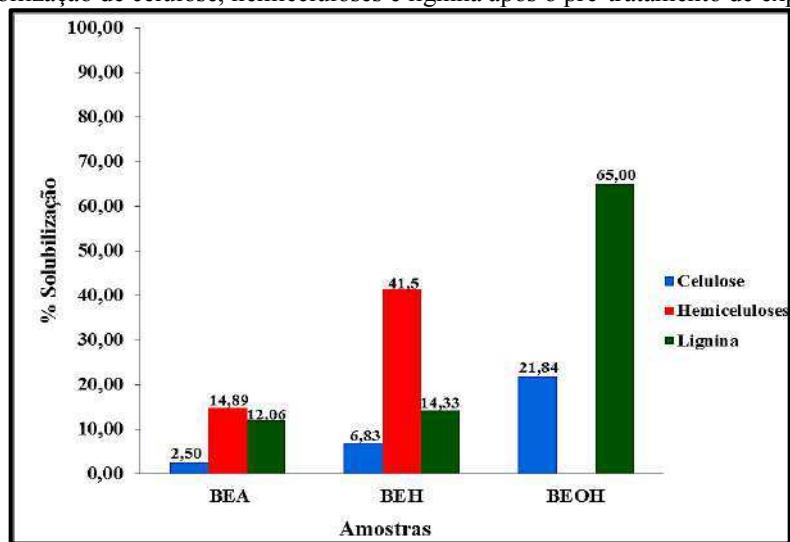
Os teores de lignina, hemiceluloses e celulose presentes bagaço *in natura* (Tabela 2) encontram-se dentro da faixa reportada para materiais lignocelulósicos, sendo 15-30% lignina, 20-35% hemiceluloses e 35-50% celulose (AMARASEKARA, 2014a; SHAFIEI, KUMAR, KARIMI, 2015). De acordo com Bezerra; Ragauskas (2016) o bagaço de cana-de-açúcar é composto principalmente por 20-30% de lignina, 40-45% de celulose e 30-35% hemicelluloses, com quantidades limitadas de extractivos e cinzas.

Analizando os dados da Tabela 5 e a Figura 14, pode-se afirmar que dentre os pré-tratamento de explosão a vapor, o que utilizou ácido cítrico apresentou a maior remoção de hemiceluloses (41,50%), enquanto que o tratamento com NaOH solubilizou maior parte da lignina (65%) e o tratamento com água obteve a maior preservação da fração celulósica (97,5%).

Tabela 5 - Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratado por explosão a vapor sem catalisador (água) e catalisada por ácido cítrico e NaOH, considerando o rendimento do pré-tratamento.

COMPOSIÇÃO QUÍMICA (%)	BI	BEA	BEH	BEOH
		R= 84,98%	R= 76,18%	R= 71,82%
Lignina Total	24,22 ± 0,36	21,30 ± 0,19	20,75 ± 0,18	8,48 ± 0,40
Hemiceluloses	27,61 ± 0,07	23,50 ± 0,33	16,16 ± 0,42	27,85 ± 0,19
Celulose	42,77 ± 0,29	41,70 ± 0,59	39,85 ± 0,44	33,43 ± 0,08
Cinzas	2,14 ± 0,32	-	-	-

Fonte: Elaborada pelo autor. **R**- rendimento do pré-tratamento.

Figura 14 - Solubilização de celulose, hemiceluloses e lignina após o pré-tratamento de explosão a vapor.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os efeitos da utilização de ácidos e bases na remoção de hemiceluloses e lignina apresentados neste estudo, assemelham-se aos reportados nos trabalhos de Brodeur et al. (2011); Tómas-Pejó et al. (2011); Karp et al. (2013), os quais afirmam que o tratamento com ácido atua principalmente na solubilização da hemiceluloses e o com álcali age majoritariamente na remoção da lignina, por meio da saponificação dos grupos ésteres.

Após a realização do pré-tratamento de deslignificação alcalina nota-se um aumento proporcional dos percentuais mássicos da celulose e hemicelulose quando comparado a biomassa *in natura* e pré-tratada por explosão a vapor, o qual é resultante da elevada remoção de lignina do material lignocelulósico (Tabela 6).

Tabela 6 - Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratado por explosão a vapor após o processo de deslignificação alcalina.

COMPOSIÇÃO QUÍMICA (%)	BID	BEAD	BEHD	BEOHD
Lignina Total	5,99 ± 0,05	4,93 ± 0,28	5,04 ± 0,48	5,99 ± 0,02
Hemiceluloses	43,52 ± 0,71	44,26 ± 0,22	34,07 ± 0,08	46,02 ± 0,33
Celulose	48,81 ± 0,47	54,40 ± 0,18	55,64 ± 0,35	49,78 ± 0,42
Total de matéria seca	98,32 ± 1,23	103,69 ± 0,68	104,81 ± 0,84	102,55 ± 1,2

Fonte: Elaborada pelo autor. **BID** – Bagaço *in natura* deslignificado; **BEAD** – Bagaço explosão água deslignificado; **BEHD** – Bagaço explosão ácido deslignificado; **BEOHD** – Bagaço explosão NaOH deslignificado.

Para comparar os efeitos combinados dos pré-tratamento de explosão a vapor e deslignificação alcalina em relação composição da biomassa *in natura*, utilizou-se o rendimento combinado entre ambas às etapas, como descrito na Tabela 7.

Tabela 7 - Rendimento combinado das etapas de explosão a vapor e deslignificação alcalina.

RENDIMENTO	AMOSTRA			
	BID	BEAD	BHD	BEOHD
$R_1(\%)$	-	84,98	76,18	71,82
$R_2(\%)$	60,82	62,36	58,63	81,27
$\frac{R_1(\%) \times R_2(\%)}{100}$	60,82	53,00	44,66	58,37

Fonte: Elaborada pelo autor. $R_1(\%)$ – Rendimento do pré-tratamento de explosão a vapor; $R_2(\%)$ – Rendimento da deslignificação alcalina.

Após a correção dos teores de lignina, hemiceluloses e celulose pelo rendimento combinado dos pré-tratamento de explosão a vapor e de deslignificação alcalina, nota-se uma redução mássica destes componentes na biomassa em comparação com o material *in natura* (Tabela 8).

Tabela 8 - Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratado por explosão a vapor após o processo de deslignificação alcalina.

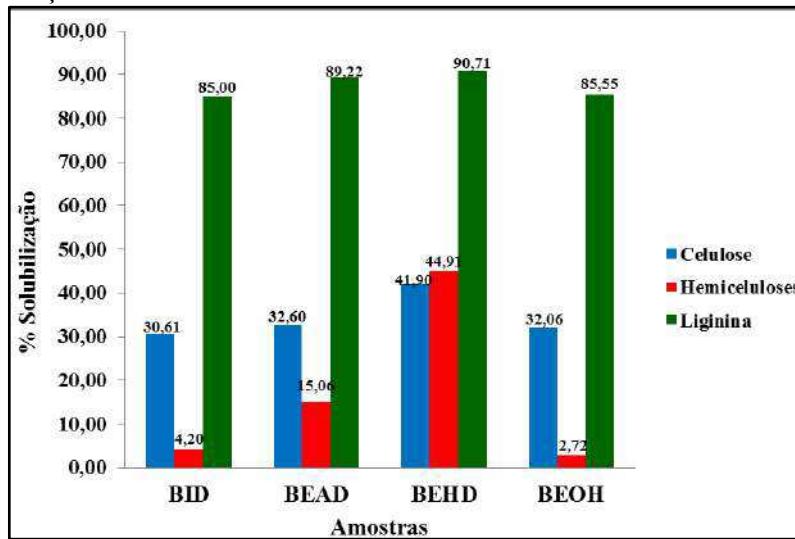
COMPOSIÇÃO QUÍMICA (%)	BI	BID	BEAD	BEHD	BEOHD
		R= 60,82%	R= 53,00%	R= 44,65%	R= 58,37%
Lignina Total	$24,22 \pm 0,36$	$3,64 \pm 0,05$	$2,61 \pm 0,28$	$2,25 \pm 0,48$	$3,50 \pm 0,02$
Hemiceluloses	$27,61 \pm 0,07$	$26,46 \pm 0,71$	$23,45 \pm 0,22$	$15,22 \pm 0,08$	$26,86 \pm 0,33$
Celulose	$42,77 \pm 0,29$	$29,68 \pm 0,47$	$28,83 \pm 0,18$	$24,85 \pm 0,35$	$29,06 \pm 0,42$
Cinzas	$2,14 \pm 0,32$	-	-	-	-

Fonte: Elaborada pelo autor.

A solubilização da lignina apresentou valores entre 85,0 e 90,0%, enquanto que as hemiceluloses e celulose apresentaram, respectivamente, remoção entre 4,0 – 44,91% e 30,60 - 41,90% (Figura 15). Os valores de remoção para lignina e celulose aproximam-se dos obtidos por Oliveira (2010), que ao submeter palha da cana-de-açúcar ao pré-tratamento de explosão a vapor (180°C) seguido da deslignificação alcalina promoveu a solubilização de 86,6% da lignina e 37,4% da celulose, sendo a solubilização da celulose atribuída a degradação, principalmente, da fase amorfa da cadeia celulósica, enquanto que a fase cristalina manteve-se conservada ou parcialmente degradada.

No trabalho de Oliveria (2012), a solubilização de lignina e de celulose no bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (200 °C) e deslignificado, correspondeu a 90% e 18%. Em ambos os estudos a solubilização das hemiceluloses apresentou valores superiores (88,6% - palha de cana; 95% - bagaço de cana) aos obtidos nesses trabalho, possivelmente devido a maior severidade dos tratamentos e/ou devido a condições operacionais dos reatores, como por exemplo, a injeção direta de vapor na biomassa.

Figura 15 - Solubilização de celulose, hemiceluloses e lignina após o pré-tratamento de explosão a vapor seguido de deslignificação alcalina.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A remoção da celulose no pré-tratamento de explosão a vapor com água e ácido cítrico ocorreu devido à hidrólise ácida das ligações glicosídicas da cadeia de celulose, a qual acontece em três etapas. Na primeira etapa o próton do ácido interage rapidamente com o oxigênio glicosídico que une as unidades de D-β-anidroglicopiranose formando um ácido conjugado. A segunda caracteriza-se pela clivagem da ligação C-O do ácido conjugado e formação de um carbocátion cíclico. Na terceira etapa a adição rápida de uma molécula de água promove a formação de uma unidade D-β-anidroglicopiranose e liberação de um próton (FENGEL; WEGENER; 1989; XIANG et al., 2003). Já a despolimerização da celulose no meio alcalino, pode envolver um mecanismo de eliminação- β que ocorre na extremidade não redutora da cadeia de celulose (PAULA, 2009).

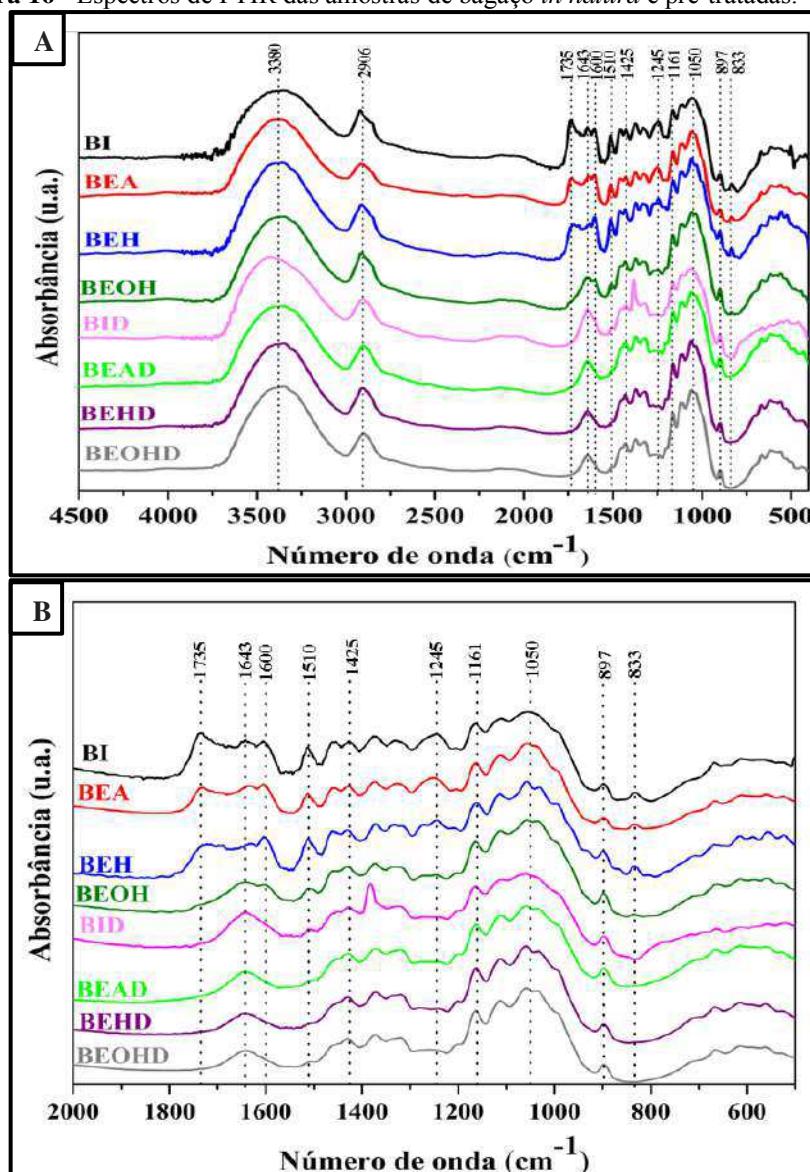
A hidrólise da lignina em meio alcalino, geralmente, inicia-se pela desprotonação de um OH fenólico formando estruturas do tipo estilbeno por eliminação do carbono gama ou estruturas de metil quinona por clivagem do carbono alfa (OLIVEIRA, 2015).

5.2 Análise de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Nas Figuras 16A e 16B encontram-se representados os espectros de FTIR do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e após os pré-tratamentos de explosão a vapor (água, ácido cítrico e NaOH) e de deslignificação alcalina, os quais apresentam as bandas típicas dos componentes majoritários de biomassa lignocelulósica.

Os espectros de FTIR do BI e BEA apresentaram perfil muito semelhante, corroborando assim com a caracterização química, a qual evidencia que o pré-tratamento de explosão a vapor com água não promoveu uma elevada remoção dos componentes recalcitrantes do bagaço de cana-de-açúcar.

Figura 16 - Espectros de FTIR das amostras de bagaço *in natura* e pré-tratadas.



Fonte: Elaborada pelo autor. **A** – Espectros na região de 500 a 4500 cm^{-1} . **B** - Ampliação do espectro na região de 600 a 2000 cm^{-1} .

Os picos na região de 3380 e 2906 cm^{-1} representam, respectivamente, os estiramentos – OH e C-H (YANG et al., 2012) presentes nas estruturas nucleares da celulose e hemiceluloses (JU et al., 2011), enquanto que o observado em 897 cm^{-1} indica o estiramento C-O-C das ligações β -glicosídicas entre as unidades de açúcares da celulose e hemiceluloses (ZHANG et al., 2011; XIAO, et al., 2014). O sinal em 1161 cm^{-1} é atribuído à vibração C-O-C do anel de piranose (OYANG et al., 2015; NAKASONE; IKEMATSU; KOBAYASHI, 2016).

Nota-se que no BEH, BEOH e em todas as amostras deslignificadas ocorreu o aumento da intensidade na região 3380 cm^{-1} provavelmente pela maior exposição das hidroxilas da celulose, hemiceluloses e da lignina remanescente, após a realização dos pré-tratamentos. Observa-se também uma maior intensidade na região de 897 cm^{-1} no BEOH (explosão a vapor) e nos espectros de todas as amostras após o processo de deslignificação alcalina (BID, BEAD, BEHD e BEOHD), podendo esta ser atribuída a exposição das ligações $\beta(1\rightarrow4)$ após a solubilização de grande parte da lignina, favorecendo assim o processo de hidrólise desses carboidratos.

As bandas com absorção em 1600 cm^{-1} , 1510 cm^{-1} e 1425 cm^{-1} são características da vibração do anel aromático da lignina (GARCÍA et al., 2012), já a região de 833 cm^{-1} representa a vibração C-H fora do plano das unidades de *p*-Hidroxifenil, o qual é um dos percussores da lignina (HOAREAU et al., 2004). Analisando os espectros nota-se uma drástica redução das bandas 1600 cm^{-1} , 1510 cm^{-1} e 833 cm^{-1} no BEOH, fato que comprova a remoção de 65% da lignina após a explosão a vapor com NaOH. Nos espectros do BID, BEAD, BEHD e BEOHD nota-se o desaparecimento do sinal em 833 cm^{-1} e em 1610 cm^{-1} , e uma maior redução do pico em 1510 cm^{-1} quando comparado ao tratamento de explosão a vapor com NaOH, confirmando assim a elevada solubilização da lignina (85 – 90%) descrita na caracterização química, após o tratamento de deslignificação alcalina.

O em pico em 1643 cm^{-1} corresponde à deformação angular O-H das moléculas de água presente na biomassa (CHUNG; LEE; CHOE, 2004; DRAMAN et al., 2014), podendo sua intensidade ser proporcional à quantidade de água na amostra (MASCHIOA; PEREIRA, SILVA, 2012).

A região vibracional de 1735 cm^{-1} está relacionada com alongamento da carbonila (C=O) em hemiceluloses (XIAO et al., 2014; CHEN et al., 2016) e/ou ao estiramento da ligação carbonil éster da unidade monomérica de ácido *p*-cumarico presente na lignina (NAZIR et al., 2013). Já o pico em 1245 cm^{-1} é descrito como alongamento C-O do grupo acetil presente na cadeia de hemiceluloses (LI et al., 2012), bem como das vibrações das

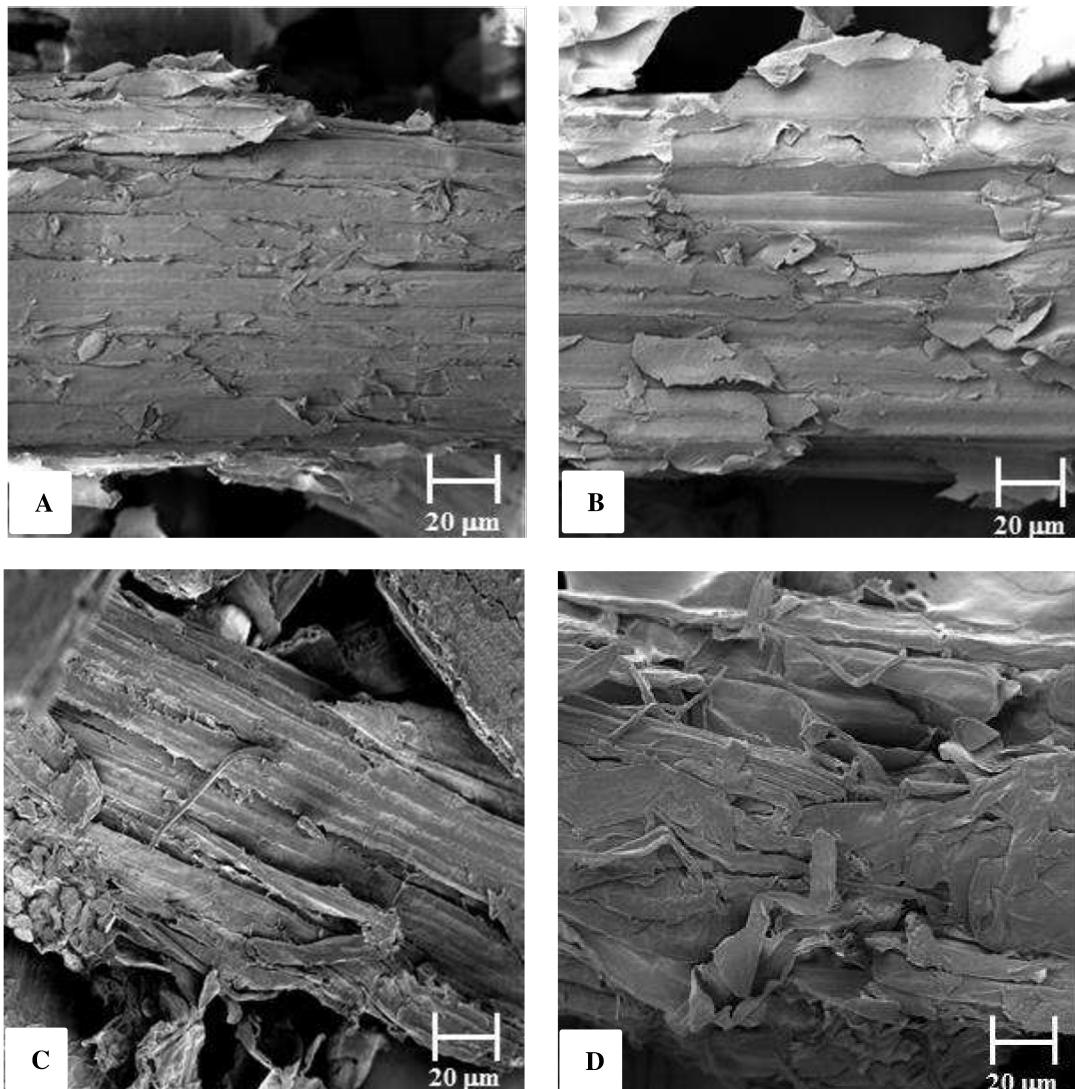
unidades siringil e guaiacil da lignina (ERNESTO et al., 2009). O pico 1050 é caracterizado por vibrações C-O-C na região anomérica das hemiceluloses (xilanas) (JU et al., 2011; HARIPRIYA et al., 2014). Observa-se no espectro do BEH a redução da intensidade das bandas em 1735cm^{-1} e 1245 cm^{-1} , sendo estas associadas a remoção de hemiceluloses da biomassa (DING et al., 2016), no entanto no BEOH a fração hemicelulósica manteve-se preservada, e o pico de 1735 cm^{-1} não é observado e o de 1245 cm^{-1} apresenta redução da intensidade.

A ausência do sinal do pico de 1735 cm^{-1} observada pode ser atribuída a quebra da ligação carbonil éster entre hemiceluloses e lignina promovida pela deslignificação da biomassa ou conforme descrito por Perrone (2015), o qual elucida que em amostras tratadas com soluções alcalinas esta banda pode não ser observada, possivelmente devido à formação de ácidos fracos, inibidores da fermentação. Já a redução ocorrida em 1245cm^{-1} pode ser atribuída a remoção de lignina da biomassa ou apenas a clivagem dos grupos acetil das hemiceluloses, visto que Xiao et al.(2014) afirma que a redução desta pode ser resultado da remoção e/ou desacetilação das hemiceluloses durante o pré-tratamento.

5.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As micrografias eletrônicas de varredura do bagaço de cana *in natura* e pré-tratado apresentadas na Figura 17, evidenciam a estrutura compacta do material lignocelulósico antes do pré-tratamento (Figura 17A), bem como as alterações estruturais que ocorreram na superfície das fibras após a realização dos pré-tratamento de explosão a vapor com água (Figura 17B), ácido cítrico (Figura 17C) e NaOH (Figura 17D).

Figura 17 - Microscopia eletrônica de varredura do bagaço sem tratamento e pré-tratado por explosão a vapor.

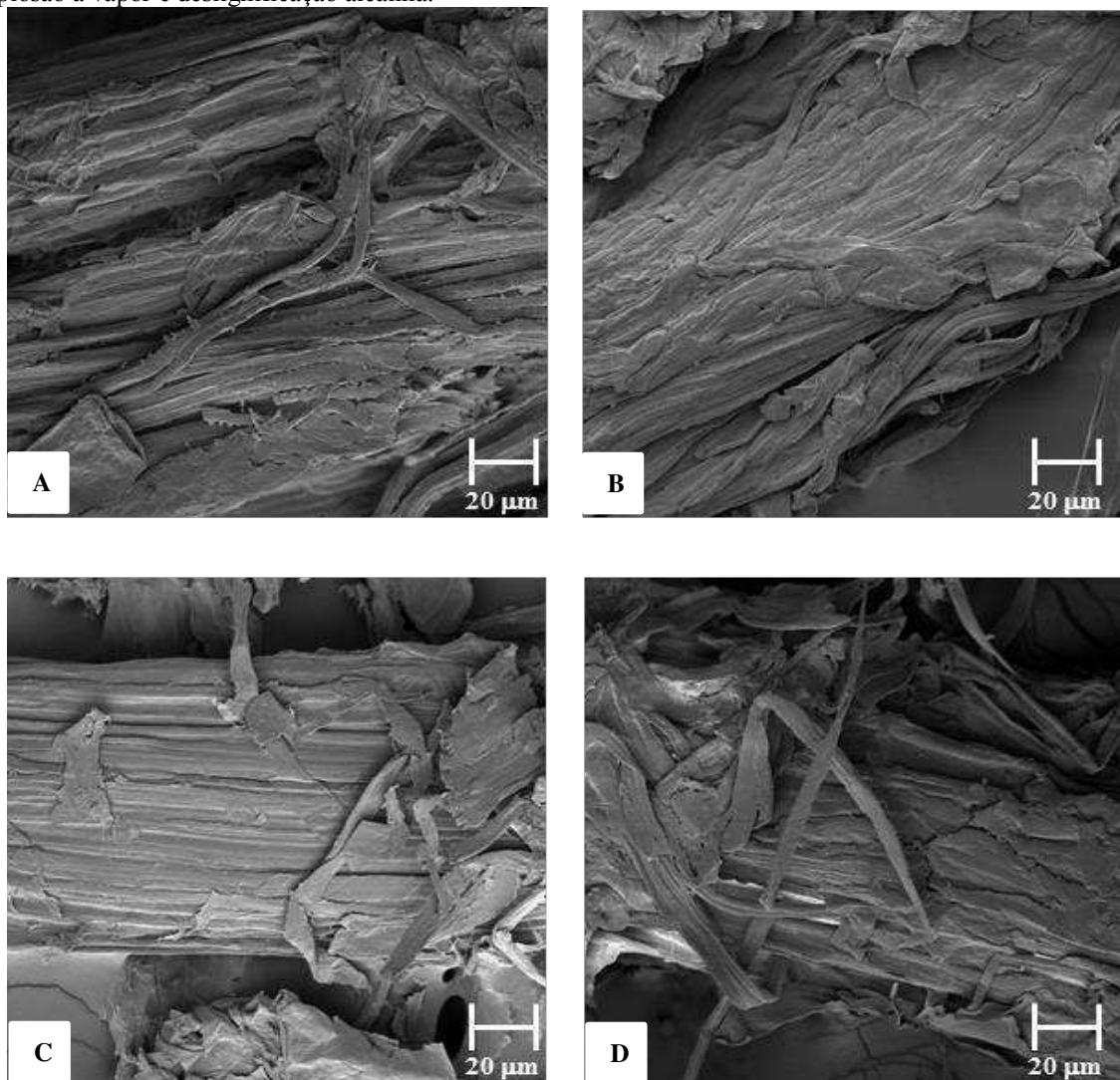


Fonte: Elaborada pelo autor. A- Bagaço de cana-de-açúcar *in natura*; B- Bagaço pré-tratado por explosão a vapor com água, C- Bagaço pré-tratado por explosão a vapor com ácido cítrico; D- pré-tratado por explosão a vapor com NaOH.

Observa-se que o pré-tratamento de explosão a vapor sem utilização de catalizador (Figura 17B) provocou uma menor desestruturação da fibra quando comparado aos demais. O mesmo ocasionou apenas a descamação da superfície do material, podendo esta ser relacionada com a remoção parcial de lignina e hemiceluloses. O tratamento com ácido cítrico (Figura 17C) promoveu a formação de sulcos superficiais no material, os quais provavelmente foram formados devido à remoção parcial da lignina e a elevada remoção de hemiceluloses (41,5%). Já o pré-tratamento catalisado por NaOH (Figura 17D) foi o mais eficaz no que refere-se a completa desestruturação da fibra lignocelulósica, podendo esta ser atribuída a remoção de 65% da lignina presente na biomassa.

As micrografias do bagaço de cana-de-açúcar após a realização dos pré-tratamentos de explosão a vapor seguido da deslignificação alcalina estão apresentadas na Figura 18. A Figura 18A apresenta as modificações ocorridas na fibra *in natura* após o processo de deslignificação, enquanto que as Figuras 18B, 18C e 18D representam as modificações estruturais ocorridas no bagaço pré-tratado por explosão a vapor com água, ácido cítrico e NaOH seguido do processo de deslignificação alcalina.

Figura 18 - Microscopia eletrônica de varredura do bagaço sem tratamento deslignificado e do bagaço após a explosão a vapor e deslignificação alcalina.



Fonte: Elaborada pelo autor. **A**- Bagaço *in natura* deslignificado; **B**- Bagaço pré-tratado por explosão a vapor com água e deslignificado; **C**- Bagaço pré-tratado por explosão a vapor com ácido cítrico e deslignificado; **D**- Bagaço pré-tratado por explosão a vapor com NaOH e deslignificado.

As maiores modificações estruturais das fibras lignocelulósicas após o processo deslignificação alcalina, são observadas no bagaço sem tratamento (Figura 18A) e nos pré-

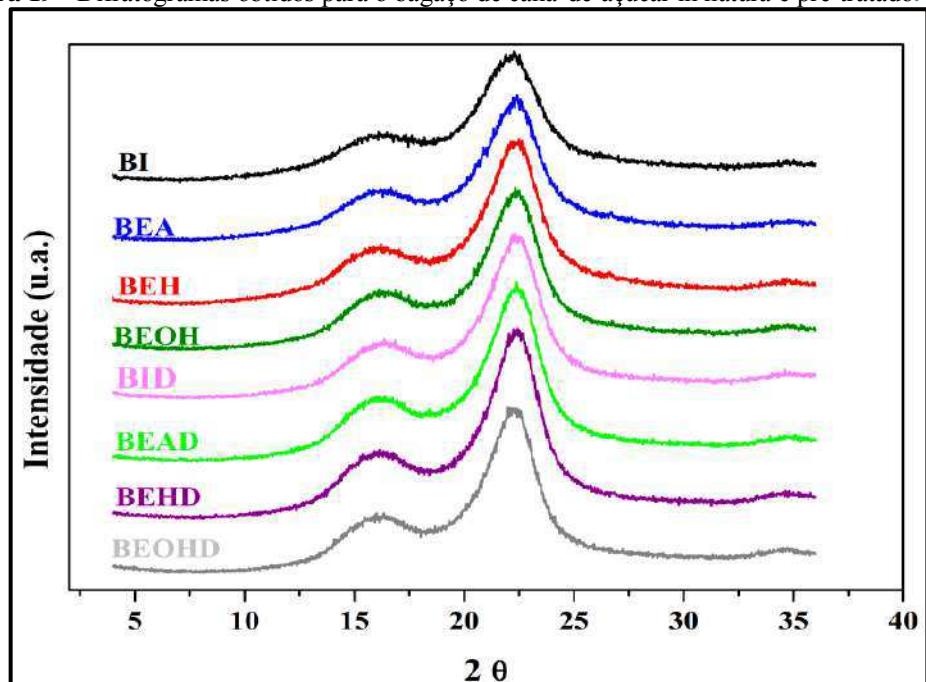
tratados por explosão a vapor sem adição de catalisador (água) (Figura 18B) e com adição de ácido cítrico (Figura 18C). Nota-se que nessas amostras ocorreu à desestruturação da matriz lignocelulósica, podendo esta ser atribuída pela ruptura das ligações entre o complexo lignina-carboidratos, visto que solubilizou-se em média 88% da lignina presente na biomassa.

Já no bagaço obtido após explosão a vapor com NaOH (Figura 18D) as mudanças estruturais não ficaram tão evidentes após o processo de deslignificação, possivelmente porque no pré-tratamento de explosão a vapor já havia ocorrido a desestruturação completa da fibra, resultado da remoção de 65% de lignina. Tais modificações ocorridas após ambos pré-tratamentos, provocaram a ruptura da estrutura recalcitrante da parede celular das fibras vegetais, podendo assim melhorar a acessibilidade de enzimas ao complexo de carboidratos e, consequentemente, favorecer o aumento no rendimento do processo de hidrólise enzimática.

5.4 Análise de Difração de Raio-X (DRX)

Os difratogramas obtidos para a biomassa sem tratamento e após a realização dos pré-tratamentos de explosão a vapor e deslignificação alcalina (Figura 3) são característicos de materiais semicristalinos, apresentando um alo amorfo e picos cristalinos característicos de celulose tipo I, a qual apresenta domínios cristalinos em $2\theta = 15^\circ$ (plano 101), 17° (plano 101^-) e 22.7° (plano 200) (BORYSIAK; GARBARCZYK, 2003).

Figura 19 - Difratogramas obtidos para o bagaço de cana-de-açúcar in natura e pré-tratado.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os valores dos índices de cristalinidade calculados para o bagaço de cana *in natura* e após os pré-tratamento de explosão a vapor e deslignificação alcalina, estão descritos na Tabela 9.

Tabela 9 - Índice de cristalinidade do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratado.

AMOSTRA	ICr (%)
BI	68,50
BEA	71,11
BEH	72,50
BEOH	71,10
BID	74,91
BEAD	73,33
BEHD	74,86
BEOHD	75,10

Fonte: Elaborado pelo autor.

Analizando a Tabela 9, nota-se que o aumento índice de cristalinidade na biomassa pré-tratada por explosão a vapor entre 2 e 4% e na deslignificada entre 4,8 e 6,6%. O aumento da cristalinidade da biomassa após diferentes pré-tratamento vem sendo relatado na literatura, como nos trabalho de Corrales et al. (2012); Guilherme et al. (2015) e Asada et al. (2015), os quais elucidam que esse aumento ocorre devido a solubilização de componentes amorfos, como a lignina e as hemiceluloses, e também pela remoção da fração amorfa da celulose. Segundo Perrone et al., (2016) esse aumento da cristalinidade em materiais lignocelulósicos pré-tratados não necessariamente indica que ocorreu alterações na estrutura cristalina da celulose.

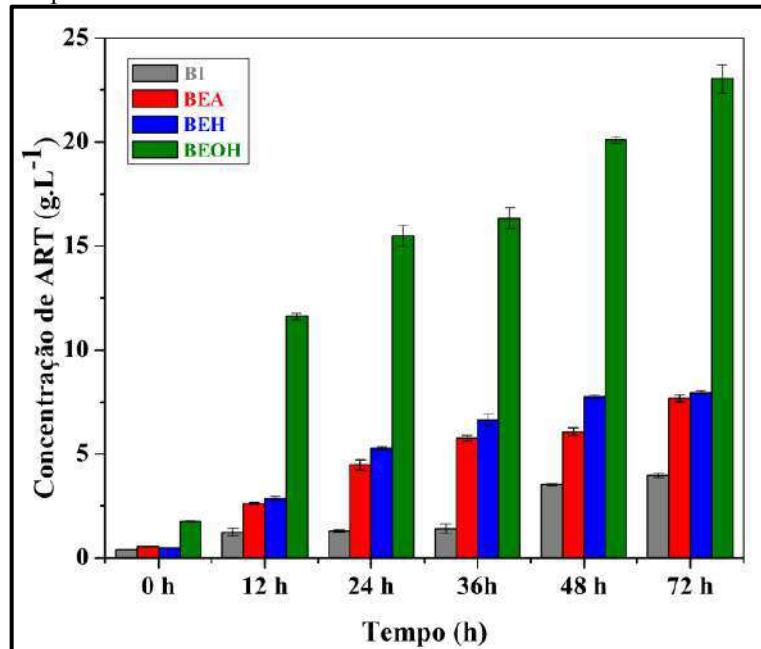
5.5 Hidrólise Enzimática

A figura 20 representa a concentração de açúcares redutores (ART) obtidas para o BI, BEA, BEH e BEOH após a hidrólise enzimática (72h) utilizando 10 FPU do preparado enzimático de celulases e hemicelulases, Cellic CeTec3 (Novozymes).

A concentração de ART para a biomassa sem tratamento atingiu o máximo de 3,96 g.L⁻¹ após 72 h de hidrólise, enquanto que para o BEA foi de 7,68 g.L⁻¹, BEH de 7,96 g.L⁻¹ e BEOH de 23,05 g.L⁻¹. O percentual de sacarificação para o bagaço sem tratamento foi de 11,88%, enquanto que para o BEA, BEH e BEOH o mesmo correspondeu, respectivamente, a 23,04%, 23,88% e 69,15%. A maior produção de ART obtida após a hidrólise do BEOH pode ser atribuída à elevada remoção da lignina e também a maior

desestruturação da fibra que ocorreu no pré-tratamento em questão, tornando assim as cadeias de celulose mais acessíveis ao ataque enzimático.

Figura 20 - Concentração de açúcares redutores totais obtidos para o bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratado por explosão a vapor.



Fonte: Elaborada pelo autor.

No trabalho de Cui et al. (2012), utilizou-se celulase comercial (25 FPU/g substrato) para a hidrólise de palha de trigo pré-tratada por explosão a vapor (220°C e tempo de retenção de 3 min) e obteve-se um máximo de 5,12 g.L⁻¹ de ART. Dessa forma, pode-se afirmar que os pré-tratamentos de explosão a vapor com água, ácido cítrico e NaOH, foram mais eficientes, visto que a produção de ART foi aproximadamente 1,5 (BEA); 1,6 (BEH) e 4,5(BEOH) vezes maior.

A proximidade entre as concentrações de ART obtidas na hidrólise do BEA e BEH podem ser justificadas pela proximidade entre o conteúdo de lignina em ambas as biomassas, visto que a porcentagem mássica de lignina apresentou correlação forte e negativa ($r = -0,99$ $p < 0,05$) sobre a produção de ART, indicando assim que quanto maior o teor de lignina no substrato menor é a eficiência do coquetel enzimático utilizado. Nesse contexto, cabe destacar que o índice de cristalinidade não pode ser considerado um fator limitante do processo de hidrólise nesse trabalho, visto que este apresentou uma correlação fraca e positiva ($r = 0,32$ $p < 0,05$) sobre a produção de ART.

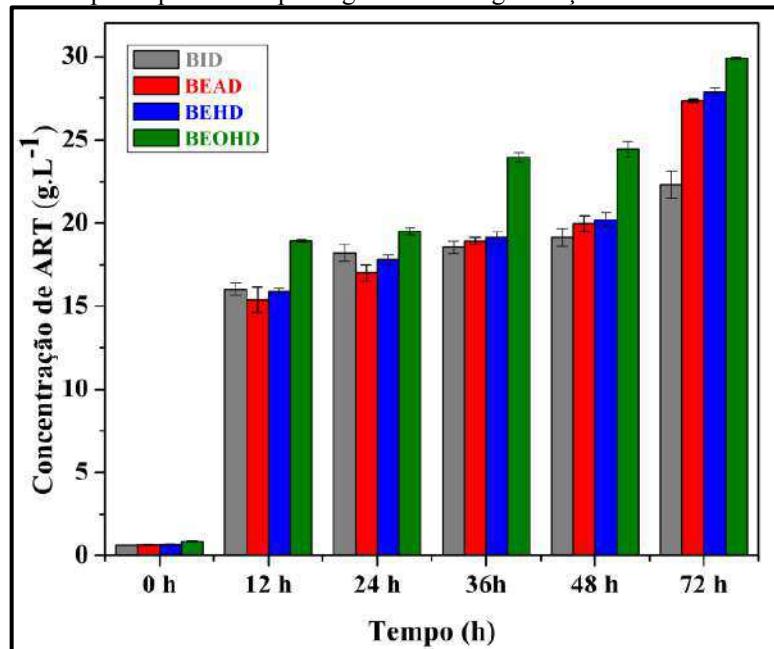
A correlação identificada pode ser explicada por Kumar et al. (2009), o qual afirma que a lignina atua como barreira protetora aos carboidratos (hemiceluloses e celulose)

que devem ser hidrolisados em seus respectivos monômeros, os quais posteriormente são metabolizados por microrganismos e convertidos em combustíveis, como o etanol celulósico.

No trabalho de Siqueira et al. (2013) reporta-se que em amostras de bagaço de cana-de-açúcar com menor teor de lignina foram mais facilmente hidrolisadas, evidenciando que a presença de lignina é um fator limitante para a eficiência do processo de hidrólise enzimática.

A concentração de açúcares redutores (ART) para o bagaço de cana *in natura* deslignificado e pré-tratado por explosão a vapor seguido da deslignificação alcalina, encontra-se representada na Figura 21.

Figura 21 - Concentração de açúcares redutores totais obtidos para o bagaço de cana-de-açúcar *in natura* deslignificado e pré-tratado por explosão a vapor seguido de deslignificação alcalina.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A produção de ART para o BID, BEAD, BEHD e BOHD, apresentou valores superiores quando comparados à biomassa *in natura* e pré-tratada por explosão a vapor. Após a hidrólise do BID obteve-se $22,29 \text{ g.L}^{-1}$ de ART correspondendo a um percentual de sacarificação igual a 66,87%. Já para a biomassa pré-tratada por explosão e deslignificada, a concentração de ART e o percentual de sacarificação, foram para o BEAD de $27,35 \text{ g.L}^{-1}$ (82,05% de sacarificação), BEHD de $27,89 \text{ g.L}^{-1}$ (83,67% de sacarificação) e BEOHD de $29,92 \text{ g.L}^{-1}$ (89,76% de sacarificação).

Os resultados corroboram com a correlação ($r = -0,99$) obtida anteriormente ao processo de deslignificação, a qual evidenciava que o teor de lignina e a concentração de ART

são variáveis inversamente proporcionais, visto que após o processo de deslignificação a produção de ART para o BI foi 5,6 vezes maior, enquanto que para o BEAD, BEHD e BEOHD esta correspondeu, respectivamente a 3,6, 3,5 e 1,3 vezes.

No trabalho de Durso; Sarrouh (2016) a produção de açúcares redutores a partir da casca de café pré-tratada com ácido seguida de deslignificação alcalina com 50 FPU de enzima resultou em um máximo de $20,88 \text{ g.L}^{-1}$, valor inferior aos obtidas após a deslignificação do bagaço sem tratamento e pré-tratado por explosão a vapor.

No estudo de Chadel et al. (2013) obtiveram $28,43 \text{ g.L}^{-1}$ de ART para o bagaço de cana pré-tratado com solução concentrada de amônia e hidrolisado com 15 FPU de Celluclast 1,5 L e 17,5 unidades de Novozym 188.

Geng; Xin; Ip (2012) realizaram a hidrólise de resíduos de horticultura pré-tratados pelo método organossolve seguido de tratamento com peróxido de hidrogênio utilizando 20 FPU de Celluclast 1,5 L e 80 unidades de Novozym 188, e alcançaram uma concentração máxima de $26,9 \text{ g.L}^{-1}$ de ART.

Em todos os estudos apresentados observa-se uma proximidade dos valores de ART com os obtidos neste trabalho, no entanto os mesmos utilizaram maiores dosagens enzimáticas. A utilização de uma maior quantidade de enzima pode ser justificada pela composição química da biomassa após a etapa de pré-tratamento, uma vez que quando mais recalcitrante se apresentar a estrutura lignocelulósica maior será a dosagem enzimática necessária para promover maiores conversões dos carboidratos em açúcares fermentescíveis. Nesse contexto, vale ressaltar que diante dos elevados custos das enzimas hidrolíticas, a utilização de maiores quantidades destas no processo de hidrólise oneraria ainda mais a produção do etanol de 2^a geração.

6 CONCLUSÕES

Diante dos resultados elucidados na caracterização química, FTIR, MEV e DRX, pode-se afirmar que os pré-tratamentos de explosão a vapor, assim como o pré-tratamento de deslignificação alcalina, promoveram o aumento do índice de cristalinidade da biomassa devido à remoção de lignina e hemiceluloses. A explosão a vapor utilizando água promoveu apenas a descamação superficial da fibra lignocelulósica, podendo esta ser atribuída a solubilização de apenas 12,86% da lignina e 14,89% das hemiceluloses, no entanto neste tratamento a fração celulósica foi preservada em 97,5%. Já explosão a vapor com ácido cítrico ocasionou a formação de fissuras na superfície da fibra e promoveu a maior solubilização da fração hemicelulósica (41,5%), porém removeu apenas 14,3% da lignina. O pré-tratamento catalisado por NaOH realizou a desestruturação completa da fibra e solubilizou aproximadamente 65% da lignina.

Após submeter à biomassa *in natura* e pré-tratada por explosão a vapor ao processo de deslignificação alcalina notou-se desestruturação completa da matriz lignocelulósica em todas as amostras, sendo esta proveniente da elevada remoção de lignina (85 – 90%) obtida nesse tratamento.

Diante da elevada solubilização de hemiceluloses no tratamento de explosão a vapor com ácido cítrico, cabe destacar que a fração líquida obtida após o pré-tratamento poderia ser utilizada para conversão em bioproductos de valor agregado, como o xilitol, arabinol, sorbitol, manitol, ácido acético, derivados furânicos, entre outros. Já a fração sólida seria destinada para produção de etanol de 2^a geração pela rota de fermentação de açúcares C₆.

Nos pré-tratamentos de explosão a vapor com NaOH e de deslignificação alcalina a fração líquida (licor negro) rica em lignina poderia ser destinada a fabricação de vanilina, fenol, resinas fenólicas, gás de síntese, etc. Diante da composição química da biomassa após os referidos pré-tratamentos, a ideal destinação para fração sólida seria a de fermentação simultânea de açúcares C₅ e C₆.

No que concerne à concentração de açúcares redutores totais obtidos após o processo de hidrolise enzimática, observa-se que o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor com NaOH gerou a maior concentração de ART (23,05 g.L⁻¹), principalmente devido a remoção de maior parte da fração de lignina, a qual permitiu as enzimas uma maior acessibilidade aos carboidratos presentes na biomassa. Tal afirmativa é pautada na correlação forte e negativa ($r = -0,99$) calculada entre o teor de lignina e a

concentração de ART. Enquanto que o índice de cristalinidade apresentou correlação fraca e positiva ($r=0,32$) sobre a produção de ART, indicando nesse trabalho que seu aumento não afetou significativamente a variável resposta (ART).

No entanto, após o processo de deslignificação alcalina obteve-se o aumento da concentração de ART para biomassa *in natura* em $18,33 \text{ g.L}^{-1}$ e para a pré-tratada por explosão com água, ácido cítrico e NaOH o aumento correspondeu a $19,67 \text{ g.L}^{-1}$, $19,93 \text{ g.L}^{-1}$ e $6,87 \text{ g.L}^{-1}$. Diante da produção de ART após deslignificação nota-se que o percentual de sacarificação para a biomassa sem tratamento elevou-se de 11,88% para 66,87%, enquanto que para o bagaço após de explosão a vapor e deslignificação este percentual ficou entre 82,05% - 89,79%.

Por fim, cabe ressaltar que na biomassa previamente pré-tratada por explosão a vapor catalisada com NaOH a solubilização de lignina após a deslignificação alcalina teve um acréscimo de apenas 20% e a concentração de ART de $6,87 \text{ g.L}^{-1}$, valores estes considerados pequenos quando comparados aos efeitos do segundo pré-tratamento sobre o BI, BEA e BEH. Dessa forma, acredita-se que ao aumentar a concentração da solução de NaOH para realizar a explosão a vapor poderia-se não necessitar da realização da etapa de deslignificação alcalina, reduzindo assim os custos do processo produtivo, uma vez que remoção de lignina ocorreria simultaneamente ao processo de desestruturação da parede celular da biomassa lignocelulósica ocorrida durante o pré-tratamento de explosão a vapor.

REFERÊNCIAS

- AFDC. ALTERNATIVE FUELS DATA CENTER. **Global ethanol production. 2015.** Disponível em: < <http://www.afdc.energy.gov/data/10331> >. Acesso em: 29 nov. 2016.
- AGBOR, V. B. et al. Biomass pretreatment: fundamentals toward application. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 675–685, 2011.
- AKHTAR, N. et al. Recent advances in pretreatment technologies for efficient hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, v. 35, n. 2, p. 489-511, 2015.
- ALVIRA, P. et al. Steam explosion for wheat straw pretreatment for sugars production. **Bioethanol**, v.2. p. 66–75, 2016.
- AMARASEKARA, A. S. Feedstocks for cellulosic ethanol. In: _____. **Handbook of cellulosic ethanol**. Hoboken: Jhon Wiley & Sons, Salem: Scrivener Publishing LLC, 2014a. ch.3, p. 44-129.
- _____. Challenges in aqueous-phase biomass hydrolysis route: recalcitrance. In: _____. **Handbook of cellulosic ethanol**. Hoboken: Jhon Wiley & Sons, Salem: Scrivener Publishing LLC, 2014b. ch.4, p. 133-45.
- _____. Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: _____. **Handbook of cellulosic ethanol**. Hoboken: Jhon Wiley & Sons, Salem: Scrivener Publishing LLC, 2014c. ch.5, p. 147-215.
- _____. Enzymatic hydrolysis of cellulose and hemicellulose. In: _____. **Handbook of cellulosic ethanol**. Hoboken: Jhon Wiley & Sons, Salem: Scrivener Publishing LLC, 2014d. ch.6, p. 219-246.
- AMORES, I. et al. Ethanol Production from Sugarcane Bagasse Pretreated by Steam Explosion. **Electronic Journal of Energy & Environment**, v. 1, n. 1, p. 25-36, 2013.
- ASADA, C. et al. Chemical characteristics and enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass treated using high-temperature saturated steam: comparison of softwood and hardwood. **Bioresource Technology**, v. 182, p. 245-250, 2015.

BAJPAI, P. Structure of lignocellulosic biomass. In: **Pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuel production**. Singapore: Springer Singapore, 2016. ch.2, p. 7 -12.

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

BINOD, P.; PANDEY, A. Intoduction. In: PANDEY, A.; NEGI, S.; BINOD, P.; LARROCHE, C. **Pretreatment of Biomass**: processes and technologies. Elsevier: Amsterdam, 2015. ch. 1, p. 3-6.

BONDESSON, P.-M. et al. Optimizing ethanol and methane production from steam – pretreated, phosphoric acid-impregnated corn stover. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, n. 3, p. 1371-1388, 2015.

BORYSIAK. S.; GARBARCZYK, J. Applying the WAXS method to estimate the supermolecular structure of cellulose fibres after mercerisation. **Fibres & Textiles in Eastern Europe**, v. 11, n. 5, p. 104-106, 2003.

BHASKAR, T. et al. Thermochemical conversion of biomass to biofuels. In: PANDEY, A.; LARROCHE, C.; RICKE, S. C.; DUSSAP, C. G.; GNANSOUNOU, E. **Biofuels**: alternative feedstocks and conversion processes. United States of America: Elsevier Inc., 2011. ch. 3, p. 51-77.

BHATIA, L.;JOHRI, S.; AHMAD, R. An economic and ecological perspective of ethanol production from renewable agro waste: a Review. **AMB Express**, v. 2, n. 65, p. 1-19, 2012.

BRAGATTO, J. de. **Avaliação do potencial da casca Eucalyptus spp. para a produção de bioetanol**. 2010. 154p. Tese (Doutorado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

BRODEUR, G. et al. Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: a review. **Enzyme Research**, v.2011, p.1-17, 2011.

BROWNING, B.L. **Methods of Wood Chemistry**. New York: Interscience Publishing, 1967. 384p.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECEIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**, v.3, n.2, Brasília: Conab, 2016. 72p. Disponível em: <www.conab.gov.br>. Acesso em: 03 set. 2016.

CORRALES, R. C. N. R. et al. Structural evaluation of sugar cane bagasse steam pretreated in the presence of CO₂ and SO₂. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 36, p. 1-8, 2012.

COSTA, S. S. et al. Estudo Prospectivo sobre a obtenção e incorporação de nanocristais de celulose em filmes biodegradáveis. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 4, p. 1104-1114, 2016.

CUI, L. et al. Influence of steam explosion pretreatment on the composition and structure of wheat straw. **BioResources**, v. 7, n.3, p. 4202-4213, 2012.

CURRELI, N. et al. A complete and efficient enzymic hydrolysis of pretreated wheat straw. **Process Biochemistry**, v.37, n.9, p. 937-941, 2002.

CHANDEL, A. K. et al. Unraveling the structure of sugarcane bagasse after soaking in concentrated aqueous ammonia (SCAA) and ethanol production by *Scheffersomyces* (*Pichia*) *stipites*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 102, 2013.

CHATURVEDI, V.; VERMA, P. An overview of key pretreatment processes employed for bioconversion of lignocellulosic biomass into biofuels and value added products. **3 Biotech**, v.3, n.5, p. 415-431, 2013.

CLAUSER, N. M. et al. Small-sized biorefineries as strategy to add value to sugarcane bagasse. **Chemical Engineering Research and Design**, v.107, p. 137-146, 2016.

CHEN, L. et al. Integrated chemical and multi-scale structural analyses for the processes of acid pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover. **Carbohydrate Polymers**, v. 141, n. 5, p. 1-9, 2016.

CHUNG, C.; LEE, M.; CHOE, E. K.; Characterization of cotton fabric scouring by FT-IR ATR spectroscopy. **Carbohydrate Polymers**, v. 58, n. 4, p. 417-420, 2004.

DING, D. et al. How Does Hemicelluloses Removal Alter Plant Cell Wall Nanoscale Architecture and Correlate with Enzymatic Digestibility?. **BioEnergy Research**, v. 9, n.2, p.601-609, 2016.

DEL RÍO, J. C. et al. A. Structural characterization of wheat straw lignin as revealed by analytical pyrolysis, 2D-NMR, and reductive cleavage methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 23, p. 5922-5935, 2012.

DUQUE, A. et al. Steam explosion as lignocellulosic biomass pretreatment. In: MUSSATO, S. I. **Biomass fractionation technologies for a lignocellulosic feedstock based biorefinery**. Amsterdam: Elsevier, 2016.ch. 15, p. 349-368.

DURSO, T. de F. A.; SAROUH, B. Otimização da hidrólise enzimática da casca de café visando à obtenção de açúcares fermentescíveis. In: Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, XII, 2016, Caxias do Sul. **Anais...** Caxias do Sul: UCS, 2016.

DRAMAN, S. F. S. et al. Characterization and thermal decomposition kinetics of kapok (*Ceiba pentandra* L.) – based cellulose. **BioResources**, v. 9, n.1, p. 8-23, 2014.

EMONS, A. M. C.; SCHEL, J. H. N.; MULDER, B. M. The geometrical model for microfibril deposition and the influence of the cell wall matrix. **Plant Biology**, v. 4, n. 1, p. 22-26, 2002.

ERNESTO, V. A. R. T. et al. Thermal characterization of lignocellulosic residue from different sugarcanes. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v. 97, n. 2, p. 653-656, 2009.

FARINAS, C.S. **A parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação**. São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2011.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin; New York: Water de Gruyter, 1989.

FERNANDES, M. C. et al. Enzymatic saccharification and bioethanol production from *Cynara cardunculus* pretreated by steam explosion. **Bioresource Technology**, v. 186, p. 309-315, 2015.

GARCÍA, A. et al. Lignin as natural radical scavenger. Effect of the obtaining and purification processes on the antioxidant behaviour of lignin. **Biochemical Engineering Journal**, v.67, n.15, p.173-185, 2012.

GENG, A.; XIN, F.; IP, J.-Y. Ethanol production from horticultural waste treated by a modified organosolv method. **Bioresource Technology**, v.104, p. 715-721, 2012.

GUILHERME, A. A. et al. evaluation of composition,characterization and enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 32, n. 01, p. 23 - 33, 2015.

GUTIÉRREZ-RIVERA, B. et al. Bioethanol production from hydrolyzed sugarcane bagasse supplemented with molasses "B" in a mixed yeast culture. **Renewable Energy**, v. 74, p. 399-405, 2015.

GRIMALDI, M. P. et al. Evaluation of lime and hydrothermal pretreatments for efficient enzymatic hydrolysis of raw sugarcane bagasse. **Biotechnology for Biofuels**, v.8, p. 1-14, 2015.

GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v.59, p.257-268, 1987.

HARIPRIYA, R. et al. Pretreatment of cellulosic waste materials. **European Journal of Biotechnology and Bioscience**, v.2, n.4, p.04-13, 2014.

HARMSEN P. F. H. et al. **Literature review of physical and chemical pretreatment processes for lignocellulosic biomass**. Wageningen: Food & Biobased Research, 2010.

HASETH, J. K. **Decrystallization of lignocellulosic biomass using ionic liquids**. 2012. 85f. Thesis (Master in Science) - Department of Chemical Engineering, University of Science and Technology, Norway, 2012.

HOAREAU, W. et al. Sugarcane bagasse and curaua lignins oxidized by chlorine dioxide and reacted with furfuryl alcohol: characterization and stability. **Polymer Degradation and Stability**, v. 86, p. 567-576, 2004.

JACQUET, N. et al. Application of the steam explosion as pretreatment on the lignocellulosic material: a review. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 54, n.10, p. 2593-2598, 2015.

JU, Y. et al. Analysis of soluble and insoluble fractions of alkali and subcritical water treated sugarcane bagasse. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 591-599, 2011.

KARP, S. G. et al. Pretreatment strategies for delignification of sugarcane bagasse: a review. **Brazilian archives of biology and technology**, v.56, n.4, p. 679-689, 2013.

KUMAR, P. et al. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**. v.48, n. 8. p. 3713–3729, 2009.

LAUREANO-PEREZ, L. et al. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass - characterization of pretreated corn stover. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121-124, p. 1081-1099, 2005.

LANGAN, P. et al. Common processes drive the thermochemical pretreatment of lignocellulosic biomass. **Green Chemistry**, v. 16, n.1, p. 63-68, 2014.

LI, F.H. et al. Structure and Saccharification of Rice Straw Pretreated with Microwave-Assisted Dilute Lye. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.51, n.17, p. 6270-6274, 2012.

LIU, Z.H.; CHEN, H.Z. Simultaneous saccharification and co-fermentation for improving the xylose utilization of steam exploded corn stover at high solid loading. **Bioresource Technology**, v. 201, p. 15-26, 2016.

LIMA, M. T. **Análise funcional de um consórcio microbiano de solo e prospecção de genes envolvidos na desconstrução da biomassa**. 2014. 53f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de ciências agrárias e veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2014.

LÓPEZ-LINARES, J. C. et al. Optimization of uncatalyzed steam explosion pretreatment of rapeseed straw for biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 190, p. 97-105, 2015.

MANDELS, M.; STERNBERG, D. Recent advances in cellulose technology. **Journal of Fermentation Technology**, v.54, n.4, p.267-286, 1976.

MARTÍNEZ, A. T. et al. Monolignol acylation and lignin structure in some nonwoody plants: A 2D NMR study. **Phytochemistry**, v.69, n.16, p. 2831–2843, 2008.

MASCHIOA, L. J.; PEREIRA, P. H. F.; SILVA, M. L. C. da. Preparation and characterization of cellulose/hydrous niobium oxide hybrid. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 3. p. 992-996, 2012.

MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, n. 96, v.6, p. 673–86, 2005.

MILLER G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n.3, p. 426-428, 1959.

MME. MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. **Resenha Energética Brasileira**. 2016. Disponível em: <<http://www.mme.gov.br>>. Acesso em: 02 set. 2016.

MOOD, S. H. et al. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 77-93, 2013.

MODENBACH, A. A.; NOKES, S. E. Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings - A review. **Biomass & Bioenergy**, v. 5 6, p. 526-544, 2013.

MOHAN, D.; PITTMAN, C. U.; STEELE, P. H. Pyrolysis of wood/biomass for bio-oil: a Critical Review. **Energy & Fuels**, v. 20, n. 3, p. 848-889, 2006.

MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A.; MELO, D. C. Análise da madeira de *Pinus oocarpa* parte i: Estudo dos constituintes macromoleculares e extractivos voláteis. **Árvore**, v. 29, n. 03, p. 461-470, 2005.

MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G. M. Biomass pretreatment, biorefineries, and potential products for a bioeconomy development. In: MUSSATTO, S. I. **Biomass fractionation technologies for a lignocellulosic feedstock based biorefinery**. Amsterdam: Elsevier, 2016.ch. 1, p.1-20.

NANDA, S. et al. A. An assessment on the sustainability of lignocellulosic biomass for biorefining. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 50, p. 925 -941, 2015.

NAKASONE, K.; IKEMATSU, S.; KOBAYASHI, T. Biocompatibility evaluation of cellulose hydrogel film regenerated from sugarcane bagasse waste and its in vivo behavior in mice. **Industrial Engineering Chemistry Research**, v. 5, n. 1, p. 30-37, 2016.

NAZIR, M. S. et al. Eco-friendly extraction and characterization of cellulose from oil palm empty fruit bunches. **BioResources**, v. 8, n.2, p. 2161-2172, 2013.

NEVES, P. V.; PITARELO, A. P.; RAMOS, L. P. Production of cellulosic ethanol from sugarcane bagasse by steam explosion: effect of extractives content, acid catalysis and different fermentation technologies. **Bioresource Technology**, v. 208, p. 184-194, 2016.

NOVOZYMES. **Novozymes Cellic® CTec3 : secure your plant's lowest total cost.** 2012. Disponível em: <http://s3.amazonaws.com/zanran_storage/bioenergy.novozymes.com/ContentPages/2546502386.pdf>. Acesso em: 10 set. 2016.

NUNES, R. de M. et al. Resíduos agroindustriais: potencial de produção do etanol de segunda geração no Brasil. **Revista Liberato**, v. 14, n. 22, p. 113-238, 2013

OUYANG, X. et al. Improvement of lignin yield and purity from corncob in the presence of steam explosion and liquid hot pressured alcohol. **RSC Advances**, v. 76, n.5, p. 61650-61656, 2015.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010.

ÖHGREN, K. et al. A comparison between simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation using steam-pretreated corn stover. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 834-839, 2007.

OLIVEIRA, F. M. V. **Avaliação de diferentes pré-tratamentos e deslignificação alcalina na sacarificação da celulose de palha de cana.** 2010. 101f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2010.

OLIVEIRA, L. R. M. **Estudo de alternativa de pré-tratamento e hidrólise do bagaço e palha de cana-de-açúcar para obtenção de etanol a partir de celulose.** 2012. 123f. Tese(Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2012.

OLIVEIRA, F. M. V. et al. M. Industrial-scale steam explosion pretreatment of sugarcane straw for enzymatic hydrolysis of cellulose for production of second generation ethanol and value-added products. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 168-173, 2013.

OLIVEIRA, F. de C. **Oxidação de lignina proveniente de resíduos lignocelulósicos agroindustriais para obtenção de compostos químicos aromáticos de maior valor agregado.** 2015. 199f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2015.

PACHECO, T. F. **Produção de Etanol:** primeira ou segunda Geração?. Brasília: Embrapa, 2011. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/886571/1/CITE04.pdf>>. Acesso em: 17 dez. 2016.

PAL, S. et al. Effect of mixed acid catalysis on pretreatment and enzymatic digestibility of sugarcane bagasse. **Energy Fuels**, v. 30, n. 9, p. 7310-7318, 2016.

PARK, J.-Y. et al. Enhancement of enzymatic digestibility of *Eucalyptus grandis* pretreated by NaOH catalyzed steam explosion. **Bioresource Technology**, v. 123, p. 707-712, 2012.

PERRONE, O. M. **Avaliação térmica e estrutural do bagaço de cana de açúcar pré-tratado com ozônio, ultrassom e micro-ondas para produção de etanol celulósico por hidrólise enzimática**. 2015. 65f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2015.

PERRONE, O. M. et al. Ozonolysis combined with ultrasound as a pretreatment of sugarcane bagasse: Effect on the enzymatic saccharification and the physical and chemical characteristics of the substrate. **Bioresource Technology**, v. 218, p. 69-76, 2016.

POLIZELI, M.L.T.M. et al. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n.5, p. 577-591, 2005.

PU, Y. et al. Assessing the molecular structure basis for biomass recalcitrance during dilute acid and hydrothermal pretreatments. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, p. 1-13, 2013.

PHITSUWAN, P. et al. Evaluation of fuel ethanol production from aqueous ammonia-treated rice straw via simultaneous saccharification and fermentation. **Biomass and Bioenergy**, v. 93, p. 150-157, 2016.

QUIROZ-CASTAÑEDA, R. S.; FOLCH- MALLÓ, J. Hydrolysis of biomass mediated by cellulases for the production of sugars. In: CHANDEL, A. K., SILVA, S.S. **Sustainable degradation of lignocellulosic biomass: techniques, applications and commercialization**. Croatia: InTech, 2013. ch. 6, p.119-155.

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

REDDY, M. M. et al. Biobased plastics and bionanocomposites: current status and future opportunities. **Progress in Polymer Science**, v. 38, n. 10-11, p. 1653– 1689, 2013.

RIZK, M.; ANTRANIKIAN, G.; ELLEUCHE, S. End-to-end gene fusions and their impact on the production of multifunctional biomass degrading enzymes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 428, n.1, p. 1-5, 2012.

ROCHA, G. J. M. et al. Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 35, p. 274-279, 2012a.

ROCHA, G. J. M. et al. Mass balance of pilot-scale pretreatment of sugarcane bagasse by steam explosion followed by alkaline delignification. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 447-452, 2012b.

ROCHA, G. J. M. et al. Pilot scale steam explosion and diluted sulfuric acid pretreatments: comparative study aiming the sugarcane bagasse saccharification. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 810-816, 2015.

RUBIN, E. M. Genomics of cellulosic biofuels. **Nature**, v. 454, N.7206, p. 841-845, 2008.

RFA. RENEWABLE FUELS ASSOCIATION. **World Fuel Ethanol Production**. 2015. Disponível em: < <http://ethanolrfa.org/resources/industry/statistics/#1454099788442-e48b2782-ea53>>. Acesso em: 29 nov. 2016.

SAHA, B. C. et al. Pilot scale conversion of wheat straw to ethanol via simultaneous saccharification and fermentation. **Bioresource Technology**, v.175, p.17-22, 2015.

SATTLER, S.; FUNNELL-HARIS, D. Modifying lignin to improve bioenergy feedstocks: strengthening the barrier against pathogens?. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 1-8, 2013.

SARKAR, N. et al. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**, v. 37, n.1, p. 19-27, 2012.

SEGAL, L. et al. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. **Textile Research Journal**, v.29, n.10, p.786-794, 1959.

SIMS, R. et al. **From 1st- to 2nd-generation biofuel technologies:** An overview of current industry and RD&D activities. France: OECD/IEA, 2008. 124p.

SINGH, R. et al. A review on delignification of lignocellulosic biomass for enhancement of ethanol production potential. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 32, p. 713–728, 2014.

SINDHU, R. ; PANDEY, A.; BINOD, P. Alkaline Treatment. . In: PANDEY, A.; NEGI, S.; BINOD, P.; LARROCHE, C. **Pretreatment of Biomass: processes and technologies**. Elsevier: Amsterdam, 2015. ch. 4, p. 51-60.

SINDHU, R.; BINOD, P.; PANDEY, A. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass – An overview. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 76-82, 2016.

SUDDHODANA. et al. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic residues. In: MUSSATO, S. I. **Biomass fractionation technologies for a lignocellulosic feedstock based biorefinery**. Amsterdam: Elsevier, 2016.ch. 23, p.543-560.

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

SIQUEIRA, G. et al. Enhancement of cellulose hydrolysis in sugarcane bagasse by the selective removal of lignin with sodium chlorite. **Applied Energy**, v. 102, p. 399–402, 2013.

SCHOLL, A. L. et al. Ethanol production from sugars obtained during enzymatic hydrolysis of elephant grass (*Pennisetum purpureum*, Schum.) pretreated by steam explosion. **Bioresource Technology**, v.192, p. 228-237, 2015.

SHAFIEI, M.; KUMAR, R.; KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: KARIMI, K. **Lignocellulose: based bioproducts**. Switzerland: Springer International Publishing, 2015. ch. 3, p. 85-154.

SHARMA, S. et al. Pilot scale study on steam explosion and mass balance for higher sugar recovery from rice straw. **Bioresource Technology**, v. 175, p. 350-357, 2015.

TEODORO, F. S. **Adsorção de metais e corantes em celulose modificada com anidrido trimelítico**. 2015. 111f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2015.

TOMAS-PEJÓ, E. et al. Pretreatment technologies for lignocellulose to bioethanol conversion. In: PANDEY, A.; LARROCHE, C.; RICKE, S. C.; DUSSAP, C. G.; GNANSOUNOU, E. **Biofuels: alternative feedstocks and conversion processes**. United States of America: Elsevier Inc., 2011. ch. 7, p.149-176.

TOMÉ, J. A. T. R. **Desenvolvimento do pré-tratamento por explosão com vapor da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda geração via hidrólise enzimática.** 2014. 140f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade de Campinas, Campinas, 2014.

TURUMTAY, H. Cell wall engineering by heterologous expression of cell wall-degrading enzymes for better conversion of lignocellulosic biomass into biofuels. **BioEnergy Research**, v. 8, n.4, p. 1574-1588, 2015.

VANHOLME, R. et al. Lignin biosynthesis and structure. **Plant Physiology**, v.153, n. 3, p. 895–905, 2010.

VERARDI, A. et al. Steam pretreatment of *Saccharum officinarum* L. bagasse by adding of impregnating agents for advanced bioethanol Production. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 134, p. 293-300, 2015.

WANG, K. Et al. Steam explosion. In: PANDEY, A.; NEGI, S.; BINOD, P.; LARROCHE, C. **Pretreatment of Biomass: processes and technologies**. Elsevier: Amsterdam, 2015. ch.6 , p. 75-104.

XIANG, Q. et al. Heterogeneous aspects of acid hydrolysis of α -cellulose. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 107, n. 1, p. 505-514, 2003.

XIAO, X. et al. Enhanced enzymatic hydrolysis of bamboo (*Dendrocalamus giganteus* Munro) culm by hydrothermal pretreatment. **Bioresource Technology**, v.159, p.41–47, 2014.

XU, J.-K.; SUN, R.-C. Recent advances in alkaline pretreatment of lignocellulosic biomass. In: MUSSATO, S. I. **Biomass fractionation technologies for a lignocellulosic feedstock based biorefinery**. Amsterdam: Elsevier, 2016. ch. 19, p.431-459.

YANG, B. et al. Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. **Biofuels**, v.2, n. 4, p.421-450,2011.

YANG, H.Y. et al. Enhanced enzymatic hydrolysis of triploid poplar following stepwise acidic pretreatment and alkaline fractionation. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 619–625, 2012.

ZHAO, X.-O. et al. Bioethanol from lignocellulosic biomass. In: BAI, F.-W., LIU, C.-G., HUANG, H., TSAO, G.T. **Biotechnology in China III: biofuels and bioenergy**. Berlin: Springer, 2012. ch. 2, p. 25-51.

ZHAO, X.; ZHANG, L. LIU, D. Biomass recalcitrance. Part II: Fundamentals of different pre-treatments to increase the enzymatic digestibility of lignocellulose. **Biofuel, Bioproducts & Biorefining**, v.6, n.5, p. 561-579, 2012.

ZHANG, M. et al. Enhanced Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulose by Optimizing Enzyme Complexes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n.5, p. 1407–1414, 2010.

ZHANG, J. et al. The effects of four different pretreatments on enzymatic hydrolysis of sweet sorghum bagasse, **Bioresource Technology**, v.102, p. 4585-4589, 2011.

ZHENG, Y.; PAN, Z.; ZHANG, R. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. **International Journal of Agricultural and Biological Engineering**, v.2, n.3, p. 51-68, 2009.

ZHENG, Y. et al. Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 42, p. 35-53, 2014.

ZHU, S. et al. Pretreatment of rice straw for ethanol production by a two-step process using dilute sulfuric acid and sulfomethylation reagent. **Applied Energy**, v. 154, p. 190-196, 2015.