

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**Pré-tratamentos organossolve e hidrotérmico do bagaço e palha de cana-de-açúcar e
hidrólise enzimática do licor hemicelulósico visando a produção de bioetanol**

Marlon da Silva Alves

Uberlândia - MG
Junho / 2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Pré-tratamentos organossolve e hidrotérmico do bagaço e palha de cana-de-açúcar e hidrólise enzimática do licor hemicelulósico visando a produção de bioetanol

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Biotecnologia, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Pasquini

Coorientadora: Dra. Patrícia de Oliveira Rodrigues

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**Pré-tratamentos organossolve e hidrotérmico do bagaço e palha de cana-de-açúcar e
hidrólise enzimática do licor hemicelulósico visando a produção de bioetanol**

Marlon da Silva Alves

Prof. Dr. Daniel Pasquini

Instituto de Química

Dra. Patrícia de Oliveira Rodrigues

Instituto de Química

Homologado pela Coordenação do Curso de
Biotecnologia em ___/___/_____.

Prof. Dr. Nilson Nicolau Júnior

**Uberlândia - MG
Junho / 2023**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**Pré-tratamentos organossolve e hidrotérmico do bagaço e palha de cana-de-açúcar e
hidrólise enzimática do licor hemicelulósico visando a produção de bioetanol**

Marlon da Silva Alves

Aprovado pela Banca Examinadora em: __/__/____. Nota:

Prof. Dr. Daniel Pasquini

Dra. Patrícia de Oliveira Rodrigues

Doutoranda Gabriela Ciribelli Santos Pompeu

Profa. Dra. Miriam Maria de Resende

Uberlândia, 26 de junho de 2023.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Curso de Graduação em Biotecnologia - Uberlândia
 Av. Pará, 1720, Bloco 2E, Sala 205 - Bairro Umarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: (34)3225-8441 - www.ibtec.ufu.br - cbiotec@ibtec.ufu.br



ATA DE DEFESA - GRADUAÇÃO

Curso de Graduação em:	Biotecnologia				
Defesa de:	Trabalho de conclusão de curso II - GBT094				
Data:	26/06/2023	Hora de início:	14:00	Hora de encerramento:	16:30
Matrícula do Discente:	12011BTC005				
Nome do Discente:	Marlon da Silva Alves				
Título do Trabalho:	Pré-tratamentos organossolve e hidrotérmico do bagaço e palha de cana-de açúcar e hidrólise enzimática do licor hemicelulósico visando a produção de bioetanol				
A carga horária curricular foi cumprida integralmente?	<input checked="" type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não				

Reuniu-se no Anfiteatro/Sala 212, bloco 5R A, Campus Santa Mônica, da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Curso de Graduação em Biotecnologia, assim composta: Gabriela Ciribelli Santos Pompeu; Profa. Dra. Miriam Maria de Resende - FEQ/UFU; Prof. Dr. Daniel Pasquini - IQ/UFU, orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos, o(a) presidente da mesa, Dr(a). Daniel Pasquini, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao discente a palavra, para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do curso.

A seguir o(a) senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

(X) Aprovado(a) Nota [90]

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Daniel Pasquini, Professor(a) do Magistério Superior**, em 26/06/2023, às 16:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Miriam Maria de Resende, Professor(a) do Magistério Superior**, em 26/06/2023, às 16:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gabriela Ciribelli Santos Pompêu, Usuário Externo**, em 26/06/2023, às 16:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4543252** e o código CRC **E7DDCD20**.

Referência: Processo nº 23117.038494/2023-98

SEI nº 4543252

DEDICATÓRIA

Dedico este Trabalho de Conclusão de Curso a todos aqueles que me apoiaram e incentivaram nessa jornada.

Aos meus pais, Maria Dalvina da Silva Alves e Donizete Francisco Alves, que deram todo o amor, apoio e estrutura para que eu pudesse chegar até aqui.

Ao meu irmão, Maycon José da Silva Alves, por todo carinho e momentos de companheirismo.

A minha segunda mãe, Iraci Kakoi Félix, pela consideração, amor e conselhos em qualquer situação, que contribuíram muito para ser quem sou.

A minha família, pelo incentivo e interesse em saber sobre meu curso e minha carreira.

Aos meus amigos que fizeram parte da minha trajetória e me ajudaram nessa caminhada.

A todos os professores que conheci durante a minha formação acadêmica. Agradeço por toda a dedicação e direcionamento do conhecimento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Daniel Pasquini pela orientação, confiança e suporte durante todo o período em que desenvolvi atividades no laboratório e por todos os conselhos para a minha carreira. À Dra. Patrícia de Oliveira Rodrigues pela coorientação, paciência e todos os conhecimentos transmitidos.

Agradeço aos professores que compõem a Banca Examinadora, Doutoranda Gabriela Ciribelli Santos Pompeu e a Profa. Dra. Miriam Maria de Resende, por aceitarem o meu convite e proporcionarem o meu crescimento.

Agradeço aos laboratórios: Laboratório de Reciclagem de Polímeros (LABREPOL – IQ/UFU) e o Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMIC - ICIAG/UFU) por terem proporcionado toda a estrutura para a realização das atividades. Ainda assim, estendo o agradecimento ao Núcleo de Processos Biotecnológicos (NUCBIO – FEQ/UFU) e ao Laboratório Multiusuário do Instituto de Química (LAMIQ – IQ/UFU) pela disponibilidade de equipamentos para análises relacionadas a pesquisa.

Agradeço a todos os discentes do LABREPOL e LAMIC, em especial Anderson, Arthur e Gabriela, que sempre se dispuseram a ajudar.

Agradeço a todos os meus amigos dentro e fora do curso que acompanharam essa jornada e participaram da minha vida.

Agradeço, por fim, ao Instituto de Biotecnologia por proporcionar minha graduação de uma maneira incrível e engrandecedora. Além disso, à Universidade Federal de Uberlândia prover os auxílios estudantis, acesso a atividades extracurriculares e eventos científicos e de cultura que foram fundamentais para a minha conclusão de curso.

RESUMO

A demanda pelo desenvolvimento de tecnologias para produção de biocombustíveis tem o intuito de apresentar uma alternativa sustentável em comparação aos combustíveis fósseis, proporcionando uma redução da emissão de poluentes e promover o uso de fontes energéticas limpas e renováveis. Com isso, temos a produção de etanol de segunda geração (etanol 2G), que é um biocombustível obtido por processos fermentativos de açúcares provenientes da biomassa lignocelulósica, que podem ser obtidos, portanto, utilizando como matérias-primas resíduos da agroindústria. Para a otimização na produção de bioetanol é necessário realizar um pré-tratamento eficaz e econômico da biomassa lignocelulósica para tornar os polissacarídeos mais acessíveis à hidrólise enzimática. Entre os pré-tratamentos existentes, podemos destacar o organossolve e o hidrotérmico, que aplicados à biomassa, resultam na separação da polpa de celulose (fração sólida) e do licor rico em hemiceluloses e lignina (fração líquida). Este estudo buscou avaliar a eficiência dos pré-tratamentos organossolve e hidrotérmico do bagaço e palha de cana-de-açúcar e obtenção do licor hemicelulósico. Após análises e caracterização das biomassas brutas e pré-tratadas, foi demonstrado o aumento da proporção de celulose em relação ao conteúdo de lignina e hemiceluloses, indicando que a deslignificação ocorreu de maneira efetiva. Os licores hemicelulósicos resultantes dos pré-tratamentos foram submetidos a precipitação da lignina para obter um licor rico em hemiceluloses para a etapa de hidrólise enzimática com coquetel comercial Cellic CTec3. Então, os licores foram caracterizados antes e após a hidrólise enzimática quanto ao teor de açúcares redutores totais (ART) em que foi verificado um aumento na concentração de ART dos licores do bagaço de cana organossolve ($11,144 \pm 0,530$ para $13,440 \pm 0,081$ g.L⁻¹), bagaço hidrotérmico ($16,507 \pm 1,679$ para $22,492 \pm 0,074$ g.L⁻¹), palha de cana organossolve ($8,560 \pm 0,237$ para $9,478 \pm 0,687$ g.L⁻¹) e palha de cana hidrotérmico ($14,164 \pm 0,478$ para $22,830 \pm 0,781$ g.L⁻¹). Além disso, os dados foram confrontados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), que apesar da formação de compostos inibidores, também apresentaram aumento na concentração de açúcares, principalmente a xilose. Com isso, temos que a utilização do licor hemicelulósico apresenta potencial para aplicação em processos fermentativos com leveduras específicas para pentoses resultando na produção de bioetanol e assim, agregar valor aos resíduos agroindustriais aplicados a um contexto de uma biorrefinaria.

Palavras-chave: biomassa lignocelulósica, pré-tratamento organossolve, pré-tratamento hidrotérmico, licor hemicelulósico, hidrólise enzimática.

ABSTRACT

The demand for the development of technologies to produce biofuels is intended to present a sustainable alternative compared to fossil fuels, providing a reduction in the emission of pollutants, and promoting the use of clean and renewable energy sources. With this, we have the production of second-generation ethanol (2G ethanol), which is a biofuel obtained through fermentation processes of sugars from lignocellulosic biomass, which can therefore be obtained using agro-industry residues as raw material. To optimize the production of bioethanol, it is necessary to carry out an effective and economical pre-treatment of the lignocellulosic biomass to make the polysaccharides more accessible to enzymatic hydrolysis. Among the existing pre-treatments, we can highlight organosolv and hydrothermal, which, applied to the biomass, result in the separation of the cellulose pulp (solid fraction) and the liquor rich in hemicelluloses and lignin (liquid fraction). This study aimed to evaluate the efficiency of the organosolv and hydrothermal pre-treatments of sugarcane bagasse and straw and to obtain the hemicellulosic liquor. After analysis and characterization of the raw and pre-treated biomass, an increase in the proportion of cellulose in relation to the lignin and hemicellulose content was demonstrated, indicating that the delignification occurred effectively. The hemicellulose liquors resulting from the pretreatments were subjected to lignin precipitation to obtain a liquor rich in hemicelluloses for the enzymatic hydrolysis step with the commercial cocktail Cellic CTec3. Then, the liqueurs were characterized before and after the enzymatic hydrolysis regarding the total reducing sugars (ART) content, in which an increase in the ART concentration of the organosolv sugar cane bagasse liqueurs was verified (11.144 ± 0.530 to 13.440 ± 0.081 g.L⁻¹), hydrothermal bagasse (16.507 ± 1.679 to 22.492 ± 0.074 g.L⁻¹), organosolv sugarcane straw (8.560 ± 0.237 to 9.478 ± 0.687 g.L⁻¹) and hydrothermal sugarcane straw ($14,164 \pm 0.478$ to 22.830 ± 0.781 g.L⁻¹). In addition, the data were compared by high performance liquid chromatography (HPLC), which, despite the formation of inhibitory compounds, also showed an increase in the concentration of sugars, mainly xylose. So, we have that the use of hemicellulosic liquor has potential for application in fermentation processes with specific yeasts for pentoses resulting in the production of bioethanol and thus, adding value to agro-industrial residues applied to a context of a biorefinery.

Keywords: lignocellulosic biomass, organosolv pretreatment, hydrothermal pretreatment, hemicellulosic liquor, enzymatic hydrolysis.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Exemplos de fontes de biomassa lignocelulósica por setores.....	5
Tabela 2: Caracterização das biomassas brutas.....	25
Tabela 3: Teor de sólidos totais nos licores.....	30
Tabela 4: Dosagem de açúcares redutores totais (ART) nos licores dos pré-tratamentos e hidrolisados.....	31
Tabela 5: Composição química dos licores hemicelulósicos e hidrolisados.....	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura da biomassa lignocelulósica.....	6
Figura 2: Celobiose, unidade básica da celulose.....	7
Figura 3: Estrutura geral das xilanas com possíveis grupos substituintes.....	8
Figura 4: Álcoois que dão origem as subunidades guaiacila (G), siringila (S) e p-hidroxifenila (H) na macromolécula da lignina.....	9
Figura 5: Bagaço (a) e palha (b) de cana-de-açúcar brutos triturados.....	14
Figura 6: Reator de alta pressão.....	15
Figura 7: Processo de obtenção de holocelulose.....	17
Figura 8: Processo de obtenção de alfacelulose.....	18
Figura 9: Sistema de refluxo no método de lignina Klason.....	19
Figura 10: Espectrofotômetro.....	20
Figura 11: Curva de calibração de glicose.....	23
Figura 12: Comparação das alterações de composição das amostras brutas e pré-tratados do bagaço de cana.....	26
Figura 13: Comparação das alterações de composição das amostras brutas e pré-tratados da palha de cana.....	27
Figura 14: Microscopia eletrônica de varredura das amostras de bagaço de cana bruto (a), organossolve (b) e hidrotérmico (c).....	28
Figura 15: Microscopia eletrônica de varredura das amostras de palha de cana bruta (a), organossolve (b) e hidrotérmico (c).....	29
Figura 16: Difrátogramas comparativos entre biomassas brutas e pré-tratadas.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HMF	5-hidroximetilfurfural
ANP	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
ART	Açúcares Redutores Totais
BC	Bagaço de cana-de-açúcar
BCH	Bagaço de cana pré-tratamento hidrotérmico
BCO	Bagaço de cana pré-tratamento organossolve
C5	Pentoses
C6	Hexoses
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DNS	Ácido-dinitrosalissílico
DRX	Difração de Raios-X
FPU	Unidade de papel de filtro
Ic	Índice de Cristalinidade
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MME	Ministério de Minas e Energia
PC	Palha de cana-de-açúcar
PCH	Palha de cana pré-tratamento hidrotérmico
PCO	Palha de cana pré-tratamento organossolve
TAPPI	Associação Técnica de Celulose e Papel

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
1.1.	Biocombustíveis	1
1.2.	Bioetanol.....	3
1.3.	Biomassa lignocelulósica.....	4
1.4.	Pré-tratamentos	9
1.4.1.	Pré-tratamento organossolve	10
1.4.2.	Pré-tratamento hidrotérmico.....	11
1.5.	Hidrólise enzimática das hemiceluloses.....	12
2.	OBJETIVOS.....	13
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1.	Preparo das amostras.....	14
3.2.	Pré-tratamentos	14
3.2.1.	Pré-tratamento organossolve	14
3.2.2.	Pré-tratamento hidrotérmico.....	15
3.3.	Teor de umidade e cálculo do rendimento em massa	16
3.4.	Caracterização da biomassa e das polpas pré-tratadas.....	16
3.4.1.	Obtenção da holocelulose.....	16
3.4.2.	Teor de alfa-celulose	17
3.4.3.	Teor de hemiceluloses	18
3.4.4.	Teor de lignina insolúvel pelo método Klason.....	18
3.4.5.	Teor de lignina solúvel pelo método Klason.....	19
3.4.6.	Deslignificação da biomassa	20
3.5.	Teor de cinzas	21
3.6.	Análise das fibras por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	21
3.7.	Determinação do índice de cristalinidade por Difração de Raios-X (DRX) ...	21
3.8.	Caracterização dos licores hemicelulósicos.....	22

3.8.1.	Teor de sólidos nos licores	22
3.8.2.	Quantificação de açúcares redutores totais (ART)	22
3.8.3.	Composição química por CLAE.....	23
3.9.	Hidrólise enzimática.....	24
3.10.	Caracterização dos licores hidrolisados	24
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1.	Caracterização das biomassas brutas e pré-tratadas	24
4.1.1.	Análise das fibras por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	27
4.1.2.	Determinação do índice de cristalinidade por Difração de Raios-X (DRX)	29
4.2.	Caracterização dos licores hemicelulósicos antes e após a hidrólise enzimática	30
4.2.1.	Teor de sólidos totais nos licores.....	30
4.2.2.	Quantificação de açúcares redutores totais (ART)	30
4.2.3.	Composição química por CLAE.....	32
5.	CONCLUSÃO.....	34
6.	REFERÊNCIAS	35

1. INTRODUÇÃO

A agricultura brasileira dispõe de uma extensa área cultivada e é considerada uma das maiores do mundo referente a produção de biomassa (CONAB, 2023). Essas matérias-primas podem ser utilizadas como fonte de energia renovável em razão da demanda por combustíveis alternativos ao uso do petróleo pela adoção de uma política estratégica para implementação dos biocombustíveis na matriz energética com o intuito de reduzir a emissão de gases poluentes e promover o crescimento econômico. O etanol de segunda geração é produzido através da biomassa lignocelulósica, com destaque para os resíduos agroindustriais, que podem ser empregados em biorrefinarias para o aproveitamento total da biomassa. Entretanto, ainda são necessárias pesquisas para que esse processo se torne viável em escala industrial (CHANDEL *et al.*, 2021).

Uma das maiores problemáticas envolvendo a agroindústria é a quantidade de resíduos gerados no processamento da matéria-prima e que permanecem no campo, podendo se acumular no ambiente. O acúmulo de resíduos pode dificultar a absorção de nutrientes no solo, com potencial risco de contaminação dos solos e ambientes aquáticos. Além disso, dentro da indústria, essa biomassa é normalmente incinerada para geração de energia, porém a economia do país perde por não aproveitar o potencial econômico dessas matérias-primas de baixo custo com aplicabilidade em processos biotecnológicos, como a geração de biocombustíveis e produtos químicos. Nesse contexto, o reaproveitamento de resíduos, como bagaço e palha de cana-de-açúcar, palha e sabugo de milho, pode contribuir com a matriz energética e com a diminuição de problemas ambientais tais como, o desmatamento florestal e a utilização de novas áreas de plantio (BAËTA *et al.*, 2016).

1.1. Biocombustíveis

Os combustíveis derivados de fontes fósseis consistem em substâncias de carbono não renováveis e sua queima produz gases que, ao se acumularem na atmosfera, contribuem para o fenômeno do aquecimento global (REIS; GONÇALVES; FREITAS, 2022). O aumento da demanda energética e os efeitos do aquecimento global e das mudanças climáticas têm impulsionado a pesquisa e o desenvolvimento de opções energéticas renováveis (MAIA; BOZELLI, 2022). Matérias-primas renováveis, como biomassas lignocelulósicas, são consideradas promissoras fontes de energia alternativas ao petróleo.

No Brasil, é reconhecido que o país possui uma significativa capacidade de aproveitar fontes renováveis como matéria-prima para fins energéticos. Essas fontes representam 45 % do suprimento total de energia e 18 % dos combustíveis líquidos consumidos no país, de acordo com a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP, 2020). O governo brasileiro tem incentivado o uso de biocombustíveis por meio de programas nacionais, como o Pró-álcool, que foi estabelecido na década de 1970 (LORENZI; ANDRADE, 2019).

No contexto brasileiro, a indústria sucroalcooleira desempenha um papel importante na economia do país. Além de ser um dos maiores exportadores de açúcar, o caldo de cana-de-açúcar é utilizado para produzir bioetanol, também conhecido como etanol de primeira geração (1G) (JUNIOR *et al.*, 2021). O Brasil é o segundo maior produtor mundial de etanol, contando com 386 usinas de cana-de-açúcar. Dessas, 63 % (245) são usinas mistas, que produzem etanol e açúcar, 31 % (121) são usinas que produzem apenas etanol e 5 % (20) são usinas que produzem apenas açúcar (RAJ *et al.*, 2022).

A introdução da Política Nacional de Biocombustíveis (RenovaBio) em 2017 tem impulsionado ainda mais o setor no Brasil (LORENZI; ANDRADE, 2019). Os principais objetivos desse programa são aumentar a produção de biocombustíveis, garantir um mercado para esses biocombustíveis no setor de transporte brasileiro e reduzir as emissões de gases de efeito estufa (GEE) em 43% em relação às emissões de 2005 (GRASSI; PEREIRA, 2019). Para alcançar esses objetivos, o Ministério de Minas e Energia (MME) sugere aumentar a produção de etanol dos atuais 28 bilhões de litros, produzidos em 2017, para 54 bilhões de litros até 2030 (LORENZI; ANDRADE, 2019).

Apesar do Brasil ser um dos principais produtores de bioetanol, o desenvolvimento do bioetanol de segunda geração (2G) ainda está em estágio inicial no país, representando menos de 1 % do volume total de etanol produzido. Atualmente, apenas duas empresas brasileiras estão envolvidas na produção desse tipo de etanol: uma localizada em São Miguel dos Campos, no estado de Alagoas (Bioflex 1, da GranBio), e outra no município de Piracicaba, no estado de São Paulo (Raízen). Ambas utilizam o bagaço de cana-de-açúcar como matéria-prima para a produção do bioetanol 2G (ABUD, 2019). Considerando que o bioetanol 2G pode ser obtido a partir de várias biomassas residuais amplamente disponíveis no mercado, é necessário realizar estudos adicionais nessa área visando aprimorar a implementação dessa tecnologia no Brasil.

1.2. Bioetanol

A crescente preocupação com as mudanças climáticas e a diminuição dos recursos fósseis impulsionaram a busca por fontes alternativas de energia. O bioetanol, um biocombustível líquido obtido principalmente a partir de matérias-primas vegetais, está consolidado como um substituto da gasolina em motores de combustão interna. O principal benefício do bioetanol é sua origem renovável, pois é produzido a partir de biomassa, como culturas energéticas, resíduos agrícolas e resíduos florestais (AYODELE; ALSAFFAR; MUSTAPA, 2020).

A produção de bioetanol pode ser dividida em quatro gerações, sendo que as duas principais são: 1G, que utiliza matérias-primas açucaradas ou amiláceas (essa sendo necessária hidrólise), como a cana-de-açúcar e o milho respectivamente; e 2G que utiliza a biomassa lignocelulósica, que envolve a degradação enzimática para liberar açúcares fermentáveis. A rota da celulose apresenta potencial, pois permite o uso de uma variedade de matérias-primas não alimentares e resíduos agrícolas, reduzindo a competição com a produção de alimentos (ELIAS *et al.*, 2021).

A biomassa lignocelulósica passa por uma série de etapas, incluindo a pré-tratamento, hidrólise enzimática, fermentação e destilação para a produção de bioetanol. O pré-tratamento é essencial para tornar a biomassa mais suscetível à ação das enzimas, enquanto a hidrólise enzimática converte a celulose em açúcares fermentáveis, como a glicose. Em seguida, ocorre a fermentação, na qual microrganismos, como leveduras, convertem os açúcares em etanol. Por fim, o etanol é purificado por destilação para obter um biocombustível de alta pureza (ZHAO *et al.*, 2022).

O bioetanol pode ser usado como combustível para veículos automotores, substituindo parcialmente ou completamente a gasolina. Ele pode ser misturado em diferentes proporções com a gasolina, como o E10 (10 % de etanol) e o E85 (85 % de etanol), sendo que no Brasil, a legislação vigente em 2023 estipula um valor de 27% de etanol anidro na mistura com gasolina, justificado pela melhoria nas características como octanagem e resistência a compressão. Além disso, o bioetanol pode ser usado como matéria-prima na indústria química para a produção de produtos químicos e plásticos, substituindo produtos derivados do petróleo (SAKTHIVEL; SUBRAMANIAN; MATHAI, 2020).

Em termos de benefícios ambientais, o bioetanol tem potencial para reduzir as emissões de gases de efeito estufa, uma vez que a biomassa utilizada em sua produção absorve dióxido

de carbono (CO₂) durante o seu crescimento. Embora a utilização de bioetanol também gere emissões, o saldo total de CO₂ é balanceado entre a liberação na combustão e a captura pelas plantas cultivadas, geralmente menor do que aquela resultante da queima de combustíveis fósseis (WIETSCHEL *et al.*, 2020).

A produção em larga escala de bioetanol ainda enfrenta alguns desafios tecnológicos e econômicos. Um dos principais desafios é o desenvolvimento de processos eficientes de pré-tratamento e hidrólise enzimática, visando melhorar a conversão da biomassa em açúcares fermentáveis. Além disso, a seleção de microrganismos resistentes a inibidores presentes na biomassa lignocelulósica é fundamental para melhorar a eficiência da fermentação. Avanços tecnológicos têm sido alcançados na otimização de enzimas, no desenvolvimento de microrganismos geneticamente modificados e na melhoria dos processos de separação e purificação. Além disso, a pesquisa continua em busca de matérias-primas mais eficientes e sustentáveis, bem como de estratégias para reduzir o consumo de água e energia durante o processo produtivo (SHARMA; LARROCHE; DUSSAP, 2020).

A produção de bioetanol a partir de biomassa lignocelulósica oferece vantagens em termos de sustentabilidade, ao utilizar resíduos agrícolas e matérias-primas não alimentares. No entanto, são necessários investimentos contínuos em pesquisa e desenvolvimento para superar os desafios técnicos e econômicos e viabilizar a produção em larga escala de bioetanol celulósico (DEVI *et al.*, 2022).

1.3. Biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica é denominada como materiais de origem vegetal que possuem celulose, hemiceluloses e lignina em sua composição química. As fontes de matérias-primas desses recursos estão disponíveis em setores como agricultura, florestal, indústria e urbano. Na Tabela 1, estão listados diferentes tipos de fontes de biomassa lignocelulósica, acompanhados de alguns exemplos. Os resíduos agrícolas e florestais são especialmente promissores para o desenvolvimento de novos produtos e processos de maior valor agregado devido à sua abundância e baixo custo relativo, principalmente quando se trata de países em desenvolvimento. No entanto, seu uso tradicional tem sido restrito à queima, o que acarreta impactos negativos no meio ambiente, como degradação do solo, desertificação e emissão de gases (CAI *et al.*, 2017).

Tabela 1: Exemplos de fontes de biomassa lignocelulósica por setores.

Setor	Fonte	Exemplos
Agrícola	Plantações	Cana-de-açúcar e milho
	Resíduos da colheita	Palha de arroz, trigo e milho
	Produção de açúcar e álcool	Plantações herbáceas
	Produção de energia a partir de biomassa	
Florestal	Árvores de ciclo longo	Eucalipto, pinheiro,
	Resíduos florestais	salgueiro.
		Cascas, lascas e blocos de madeira.
Indústria	Resíduos agroindustriais	Bagaço de cana, sabugo de
	Resíduos da indústria madeireira	milho, cascas de arroz.
		Serragem e outras partes da madeira.
Urbano	Materiais processados a partir da lignocelulose	Embalagens, jornais e papéis.

Fonte: Cai *et al.*, 2017.

Para a produção de biocombustíveis, os materiais lignocelulósicos, principalmente os resíduos agroindustriais, resíduos florestais, gramíneas e materiais lenhosos, apresentam características que podem contribuir na cadeia produtiva do etanol. Uma vez que, a biomassa lignocelulósica geralmente é composta por aproximadamente 10 % a 25 % (m/m) de lignina, 20 % a 30 % (m/m) de hemiceluloses e 35 % a 50 % (m/m) de celulose (WOICIECHOWSKI *et al.*, 2020). Essa composição da biomassa lignocelulósica pode variar de acordo com o cultivo, o clima e a fontes, cujas fontes principais são classificadas como madeiras de folhosas (*hardwood*), madeiras de coníferas (*softwood*) e plantas de ciclo anual ou gramíneas (RAJENDRAN *et al.*, 2018). Nessas, a estrutura da biomassa consiste em uma associação entre a celulose, hemiceluloses, lignina, outros carboidratos, proteínas, minerais e outros metabólitos secundários das plantas (KRASZNAI *et al.*, 2018). Levando em consideração essa composição, aproximadamente 90 % da matéria seca consiste em polímeros complexos dispostos em uma matriz tridimensional não uniforme, sendo a celulose, hemiceluloses e lignina, como ilustrado na Figura 1. Os 10 % restantes da biomassa seca são compostos por extrativos e minerais

(LAMOUNIER *et al.*, 2020). Então, as hemiceluloses e a celulose são polissacarídeos que podem ser hidrolisados, e podem ser empregados em processos fermentativos para a produção de bioetanol (ALMEIDA; NASCIMENTO, 2021).

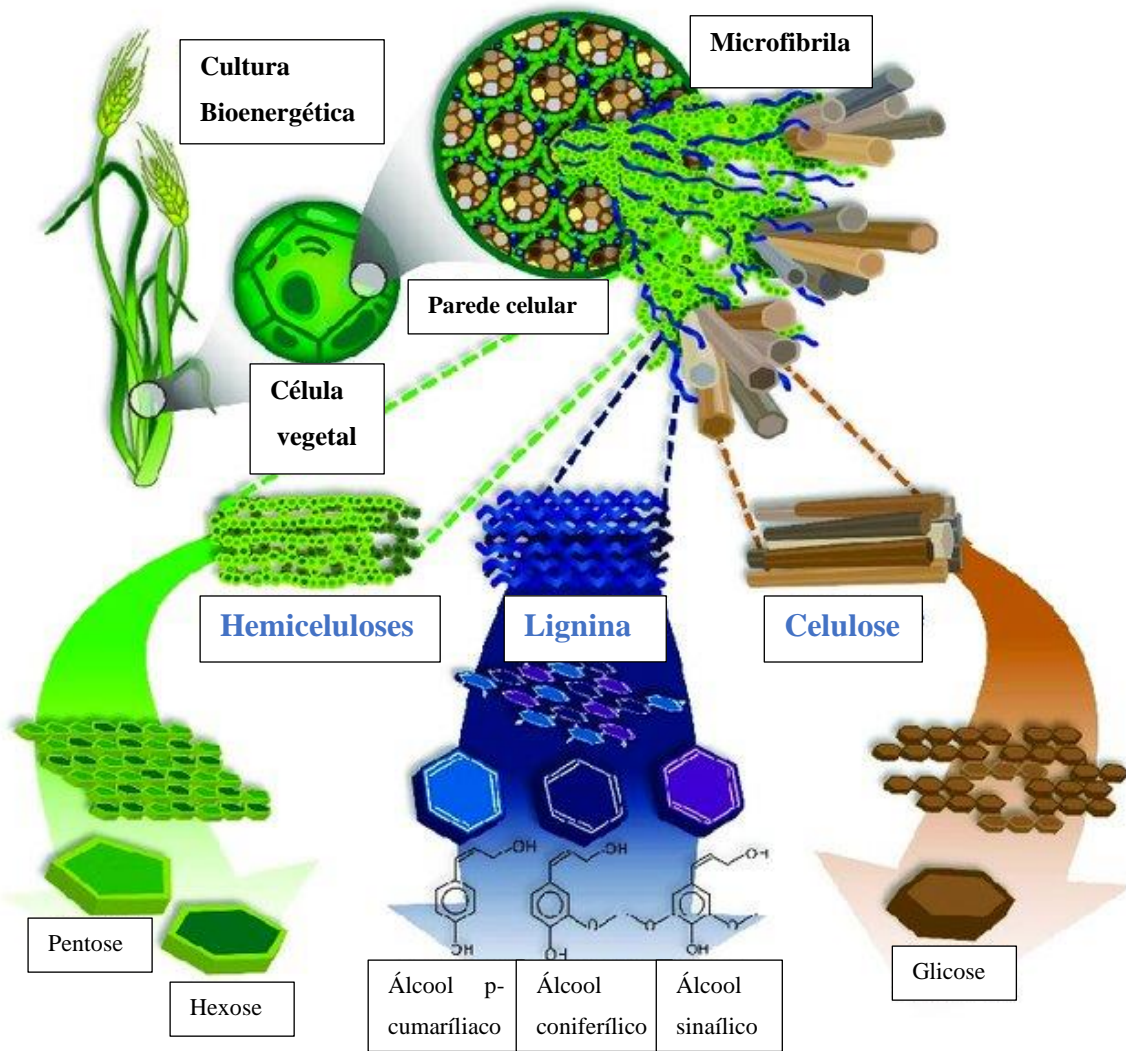


Figura 1: Estrutura da biomassa lignocelulósica. Fonte: Adaptada de Hernández-Beltrán *et al.*, 2019.

A celulose representa a maior parte da lignocelulose, que constitui entre 35 % e 50 % desses materiais. Trata-se de um homopolissacarídeo linear composto por unidades repetitivas de celobiose, em que os monômeros de glicose são ligados por meio de ligações glicosídicas β -1-4, representados na Figura 2 (BAJPAI, 2018). As ligações β glicosídicas nos carbonos anoméricos resultam em uma cadeia esticada, em que as cadeias são unidas por ligações de hidrogênio em folhas planas. Essa se difere do amido, que apesar de também apresentar monômeros de glicose, possui ligações α glicosídicas, o que confere uma conformação

helicoidal. A conformação linear da celulose permite o empacotamento de várias cadeias, formando fibras cristalinas (YOUSUF; PIROZZI; SANNINO, 2019).

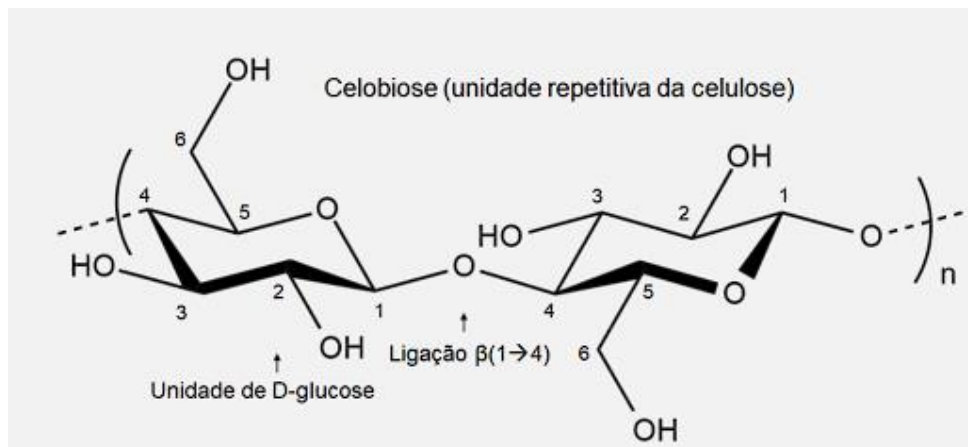


Figura 2: Celobiose, unidade básica da celulose. Fonte: Veiga, 2020.

No processo de biossíntese da celulose ocorrem três ligações de hidrogênio por unidade de glicosil: duas ligações intramoleculares e uma ligação intermolecular com uma molécula de celulose vizinha. As folhas interagem por meio de interações de van der Waals e ligações de hidrogênio, o que contribui significativamente para a estabilidade das fibras de celulose. Embora o monômero da celulose e os pequenos oligômeros sejam solúveis em água, a celulose em si não é solúvel devido ao alto peso molecular e à baixa flexibilidade relativa das cadeias poliméricas de celulose (POLKO; KIEBER, 2019).

As hemiceluloses são um grupo de heteropolissacarídeos que compõem aproximadamente de 20 % a 30 % da biomassa lignocelulósica. Elas são compostas por pentoses e hexoses, como xilose, arabinose, glicose, manose e galactose e possuem um peso molecular mais baixo em comparação à celulose. Os polímeros de hemiceluloses podem apresentar ramificações e possuir grupos funcionais como acetil, metil, ácidos cinâmicos, glucorônicos e galacturônicos. (YOUSUF; PIROZZI; SANNINO, 2019). As hemiceluloses conferem um caráter não covalente às fibras celulósicas, atuando como uma matriz amorfa que conferem uma rigidez às fibras de celulose e conectando-as com a lignina. A xilana, representada na Figura 3, é a hemicelulose mais comum em angiospermas e *hardwood*, enquanto a manana é mais abundante em *softwood*. Devido a estrutura não cristalina, as hemiceluloses são mais suscetíveis à despolimerização do que a celulose, principalmente em meios ácidos, e essa propriedade é explorada em diversas estratégias de hidrólise das biomassas lignocelulósicas (YOUSUF; PIROZZI; SANNINO, 2019).

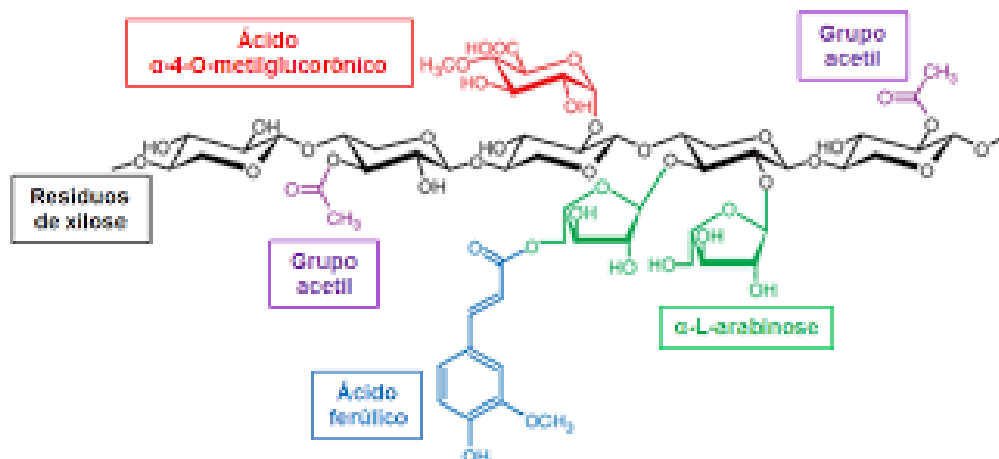


Figura 3: Estrutura geral das xilanas com possíveis grupos substituintes. Fonte: Carli, 2016.

A lignina é uma macromolécula amorfa insolúvel em água que possui as funções de proporcionar impermeabilidade, rigidez, resistência mecânica e microbiológica às paredes celulares dos tecidos vegetais associadas aos polissacarídeos. A lignina é sintetizada a partir de três monômeros derivados dos álcoois coniferílico, sinapílico e *p*-cumarílico. Uma vez incorporadas ao polímero de lignina, as subunidades são identificadas pela estrutura do anel aromático e são chamadas de guaiacila, siringila e *p*-hidroxifenila, respectivamente, como mostrado na Figura 4 (RALPH; LAPIERRE; BOERJAN, 2019). A composição da lignina varia entre madeiras de coníferas, folhosas e gramíneas. A madeira de coníferas contém um maior número de unidades de siringila, enquanto as gramíneas também possuem pequenas quantidades de grupos de *p*-hidroxifenila. Essas diferenças na composição têm um grande efeito na química da deslignificação e subsequente desconstrução da biomassa. A unidade de guaiacila tende a formar ligações cruzadas na posição do carbono 5 do anel, tanto durante o processo de lignificação quanto de deslignificação. A posição C5 é substituída na unidade de siringila, o que impede sua participação em reações de substituição sequenciais. As ligações cruzadas C-C não podem ser hidrolisadas por ácido ou base, o que torna a deslignificação em madeiras de coníferas menos facilitada em comparação com madeiras folhosas ou gramíneas.

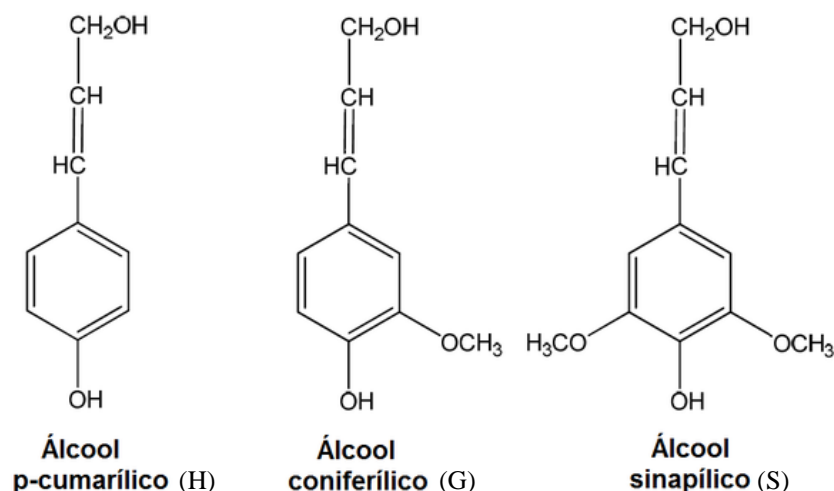


Figura 4: Álcoois que dão origem as subunidades guaiacila (G), siringila (S) e *p*-hidroxifenila (H) na macromolécula da lignina. Fonte: Novo, 2012.

A lignina apresenta uma variedade de interligações, sendo a mais comum o éter β -O-4, representando cerca de 50 % de todas as ligações inter-subunidade desse tipo. Essa interligação contribui para a elongação linear da macromolécula. Outras interligações, como C-O e C-C, estão presentes em menor abundância, e ramificações ocorrem quando a lignificação está avançada (YOUSUF; PIROZZI; SANNINO, 2019).

1.4. Pré-tratamentos

A estrutura complexa da biomassa lignocelulósica dificulta a degradação da biomassa em seus componentes básicos e, conseqüentemente, limita a eficiência dos processos de sacarificação. Visto isso, os processos de pré-tratamento são necessários para melhorar a eficácia das próximas etapas, e esses podem ser físicos, químicos ou biológicos (MANKAR *et al.*, 2021).

Os pré-tratamentos físicos têm como objetivo principal alterar a estrutura da biomassa utilizando processos mecânicos, térmicos ou uma combinação de ambos. A moagem, por exemplo, pode reduzir o tamanho das partículas e aumentar a área superficial, facilitando a ação dos agentes químicos no próximo estágio. A aplicação de calor por técnicas como vaporização, irradiação ou aquecimento a seco pode promover a ruptura das ligações químicas e a despolimerização da lignina, tornando a biomassa mais acessível à hidrólise enzimática (FERNANDES *et al.*, 2020).

Os pré-tratamentos químicos envolvem a utilização de reagentes químicos para desestruturar e modificar a composição da biomassa. O tratamento com ácidos diluídos, como ácido sulfúrico ou ácido clorídrico, pode solubilizar a lignina e remover parte das hemiceluloses, aumentando a acessibilidade da celulose. Além disso, os agentes alcalinos, como hidróxido de sódio ou hidróxido de amônio, podem promover a quebra das ligações químicas da lignina e a remoção de grupos ácidos, melhorando a qualidade da biomassa para a conversão (GUNDUPALLI; SRIARIYANUN, 2023).

Os pré-tratamentos biológicos utilizam microrganismos, como fungos ou bactérias, para degradar a estrutura da biomassa. Os microrganismos produzem enzimas, como celulases, hemicelulases e enzimas modificadoras de lignina, que são capazes de quebrar as ligações químicas da biomassa. Essa abordagem é conhecida como pré-tratamento biológico assistido por microrganismos (MBAP), e pode ser combinada com outros pré-tratamentos para aumentar a eficiência da conversão (SINDHU; BINOD; PANDEY, 2016).

1.4.1. Pré-tratamento organossolve

O pré-tratamento organossolve é baseado no uso de uma mistura de solventes orgânicos para dissolver os componentes da biomassa, permitindo uma extração mais eficiente dos seus constituintes. Os solventes organossolve mais comumente utilizados incluem etanol, metanol, ácido acético e água, em diferentes proporções. A combinação desses solventes facilita a solubilização da lignina e a desintegração da estrutura da parede celular, melhorando a acessibilidade aos polissacarídeos (FERREIRA; TAHERZADEH, 2020).

O pré-tratamento organossolve apresenta várias vantagens em relação a outras técnicas de pré-tratamento. Primeiramente, o uso de solventes orgânicos evita a formação de subprodutos tóxicos, comuns em pré-tratamentos que utilizam ácidos ou bases fortes. Além disso, a solubilização da lignina durante o pré-tratamento organossolve permite uma maior pureza dos polissacarídeos obtidos, facilitando a sua conversão subsequente em produtos de valor agregado. Ele também é conhecido por ser eficaz em uma ampla gama de biomassas, incluindo materiais lignocelulósicos recalcitrantes (MENG *et al.*, 2020).

Apesar das vantagens do pré-tratamento organossolve, alguns desafios ainda precisam ser superados. A seleção adequada dos solventes e suas proporções, assim como as condições operacionais, são fatores críticos que afetam a eficiência do processo. Além disso, a recuperação dos solventes utilizados pode ser um desafio econômico. Pesquisas adicionais são necessárias

para otimizar os parâmetros de pré-tratamento, desenvolver sistemas de recuperação de solventes eficientes e avaliar o impacto ambiental do processo em escala industrial.

1.4.2. Pré-tratamento hidrotérmico

O pré-tratamento hidrotérmico envolve a exposição da biomassa a água em condições de temperatura e pressão elevadas. Durante esse processo, ocorrem vários mecanismos que contribuem para a desestruturação da biomassa. A hidrólise ácida, causada pela formação de ácidos orgânicos a partir da degradação das hemiceluloses, leva à solubilização de polissacarídeos. A ação mecânica da água sob alta pressão resulta na fragmentação da estrutura da biomassa, aumentando sua superfície específica e facilitando a penetração de enzimas (YUE *et al.*, 2022).

O mecanismo de ação induz várias modificações na biomassa lignocelulósica que melhoram sua suscetibilidade à degradação enzimática. A remoção parcial da lignina reduz a formação de produtos de inibição, permitindo uma melhor ação das enzimas. Além disso, a despolimerização e solubilização das hemiceluloses promovem a liberação de açúcares fermentáveis, que podem ser convertidos em bioetanol ou outros produtos químicos. A celulose, após o pré-tratamento hidrotérmico, permanece em maior grau na polpa pré-tratada e torna-se mais acessível às enzimas celulolíticas, aumentando a eficiência da hidrólise enzimática (SUN *et al.*, 2021).

A eficácia do processo depende da seleção adequada de parâmetros, como temperatura, pressão, tempo de residência e relação sólido/líquido. Altas temperaturas e pressões podem aumentar a eficiência do pré-tratamento, mas também podem resultar na degradação excessiva de açúcares e formação de subprodutos indesejáveis. Portanto, é crucial encontrar um equilíbrio entre a eficiência de conversão e a formação de produtos indesejáveis (ILANIDIS *et al.*, 2021).

O pré-tratamento hidrotérmico tem sido amplamente estudado e demonstrou ser uma etapa essencial para a conversão eficiente da biomassa lignocelulósica em biocombustíveis e produtos químicos renováveis. Além disso, a técnica também pode ser aplicada na produção de materiais lignocelulósicos de alto valor, como bioplásticos e materiais de construção sustentáveis. No entanto, desafios adicionais, como o desenvolvimento de catalisadores eficientes e a otimização dos parâmetros de pré-tratamento, devem ser abordados para melhorar ainda mais a eficiência e a viabilidade econômica dessa tecnologia (RUIZ *et al.*, 2020).

1.5. Hidrólise enzimática das hemiceluloses

As hemiceluloses são polímeros heterogêneos de açúcares, sendo compostas principalmente por xilose, arabinose, glicose, manose e galactose, ligados por ligações glicosídicas variadas. Suas estruturas complexas e sua associação com a celulose e a lignina dificultam sua degradação e aproveitamento industrial. Então, a hidrólise enzimática é uma abordagem eficiente e sustentável para a quebra da hemicelulose em açúcares fermentáveis, sendo um processo chave na conversão dessa biomassa em produtos de interesse, como etanol, xilitol, ácido xílico e outros compostos (RAO *et al.*, 2023).

A hidrólise enzimática das hemiceluloses é catalisada por um conjunto de enzimas hidrolíticas, denominadas hemicelulases. Essas enzimas incluem xilanases, arabinofuranosidases, mananases, galactanases, entre outras. Cada tipo de hemicelulase atua na hidrólise de ligações glicosídicas específicas, promovendo a quebra das hemiceluloses em oligossacarídeos e, posteriormente, em monossacarídeos (CHADHA; RAI; MAHAJAN, 2019).

As hemicelulases podem agir por diferentes modos de ação durante a hidrólise enzimática das hemiceluloses. Os principais modos de ação incluem ação endo-hidrolítica, exo-hidrolítica e de desramificação. As hemicelulases endo-hidrolíticas, como as xilanases, promovem a clivagem interna das hemiceluloses, rompendo as ligações glicosídicas em locais aleatórios ao longo da cadeia polimérica. Isso resulta na formação de oligossacarídeos de diferentes tamanhos e estruturas. As hemicelulases exo-hidrolíticas, como as arabinofuranosidases e mananases, atuam na extremidade da cadeia polimérica, liberando monossacarídeos um a um. Essas enzimas são essenciais para a completa hidrólise das hemiceluloses, convertendo os oligossacarídeos em monossacarídeos fermentáveis. Algumas hemicelulases são responsáveis pela desramificação das hemiceluloses, quebrando as ligações glicosídicas que conectam as ramificações laterais à cadeia principal. Isso facilita o acesso de outras enzimas à estrutura das hemiceluloses, aumentando a eficiência da hidrólise enzimática (HOUFANI *et al.*, 2020).

Como mencionado, as enzimas utilizadas são altamente específicas para os diferentes tipos de ligações glicosídicas presentes nas hemiceluloses e esta ação sinérgica de diferentes enzimas é necessária para quebrar a estrutura complexa das hemiceluloses em açúcares fermentáveis. Além disso, fatores como temperatura, pH e concentração de enzimas influenciam significativamente a velocidade e a eficiência da hidrólise enzimática (CHANDRA; MADAKKA, 2019).

A hidrólise enzimática das hemiceluloses possui diversas aplicações práticas na indústria de bioprocessamento, com destaque para a aplicação na produção de etanol de segunda geração a partir de resíduos lignocelulósicos, como palha de trigo, bagaço de cana-de-açúcar e sabugo de milho. Em que, a conversão das hemiceluloses em açúcares fermentáveis é um passo crucial nesse processo, permitindo a fermentação subsequente por leveduras específicas para a produção de etanol a partir de pentoses e hexoses. O avanço nessa área tem o potencial de impulsionar a bioeconomia e contribuir para a transição para uma sociedade mais sustentável (QASEEM; SHAHEEN; WU, 2021).

2. OBJETIVOS

O trabalho teve como objetivo empregar o bagaço (BC) e a palha (PC) de cana-de-açúcar em pré-tratamentos organossolve e hidrotérmico, para obtenção do licor rico em hemiceluloses e realizar a sacarificação enzimática visando a produção de bioetanol a partir do licor hemicelulósico posteriormente.

Os objetivos específicos desse projeto foram:

1. Avaliar os pré-tratamentos organossolve e hidrotérmico do bagaço e palha de cana;
2. Caracterizar as biomassas pré-tratadas e determinar os rendimentos;
3. Analisar os efeitos dos pré-tratamentos na estrutura das biomassas através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), índice de cristalinidade e da composição química;
4. Remover a lignina do licor por precipitação utilizando ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado;
5. Analisar a composição dos licores por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e dosagem de açúcares redutores;
6. Hidrolisar os licores ricos em hemiceluloses com coquetel enzimático comercial;
7. Analisar a composição dos hidrolisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e dosagem de açúcares redutores;

3. MATERIAL E MÉTODOS

As atividades experimentais foram realizadas no Laboratório de Reciclagem de Polímeros (LABREPOL) do Instituto de Química (IQ) e no Laboratório de Microbiologia

Ambiental (LAMIC) do Instituto de Ciências Agrárias (ICIAG) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), cujos laboratórios dispõem de todos os equipamentos, materiais e reagentes necessários para o desenvolvimento das atividades. Para as análises cromatográficas, foi realizada uma parceria com o Núcleo de Processos Biotecnológicos (NUCBIO) da Faculdade de Engenharia Química (FEQ), também da UFU.

3.1. Preparo das amostras

As amostras de bagaço e palha de cana-de-açúcar foram cedidas pela empresa Bionergética Aroeira S/A localizada em Rodovia BR-452, Tupaciguara – MG. Depois de secas, passaram por um pré-tratamento físico utilizando um moinho de facas, em que foram trituradas (Figura 5) e, posteriormente, peneiradas até atingirem dimensões inferiores a 4mm com o intuito de melhorar a eficiência dos pré-tratamentos aumentando a área superficial da biomassa, e aumentando o contato dos solventes com as células vegetais da biomassa.

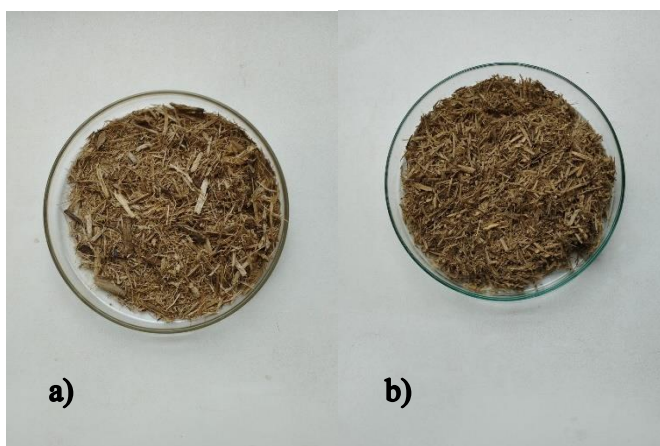


Figura 5: Bagaço (a) e palha (b) de cana-de-açúcar brutos triturados. Fonte: Autoria própria.

3.2. Pré-tratamentos

3.2.1. Pré-tratamento organossolve

O bagaço e a palha de cana-de-açúcar foram submetidos ao pré-tratamento organossolve utilizando 10 g de biomassa seca, acrescidas de 100 mL solução de etanol:água (1:1, v/v) em reator de alta pressão com capacidade volumétrica de 300 mL (Figura 6). A reação foi mantida

em processo batelada por 120 minutos após atingir 180 °C e pressão de 200 psi ou 1,38 MPa (ZHONG *et al.*, 2018).



Figura 6: Reator de alta pressão. Fonte: A autoria própria.

Após o pré-tratamento, a polpa (fração sólida) foi separada do licor (fração líquida) por filtração e em seguida lavada com água destilada e novamente filtrada para remoção do excesso de água. Posteriormente, foi utilizada nas etapas de caracterização e cálculo do rendimento do pré-tratamento por secagem e aferição gravimétrica. O licor obtido (fração líquida) foi submetido a um processo de evaporação utilizando um rotaevaporador, a fim de remover o excesso de etanol usado com solvente. Na sequência, a solução resultante foi encaminhada para a etapa de precipitação da lignina utilizando ácido sulfúrico. Então, o licor com teor de lignina reduzido foi caracterizado e utilizado na etapa de hidrólise enzimática.

3.2.2. Pré-tratamento hidrotérmico

O pré-tratamento hidrotérmico foi realizado empregando uma quantidade de 15 g das matérias-primas e 63 mL de água destilada em um reator de alta pressão (Figura 6) em batelada por 45 minutos a 180 °C, que após o processo, foi resfriado e despressurizado lentamente. Após o pré-tratamento, foi adicionado 50 mL de água destilada e a polpa levada para uma prensa hidráulica com o propósito de extrair a fração líquida da biomassa (DE OLIVEIRA RODRIGUES *et al.*, 2022). Então, seguindo para os próximos processos de extração da lignina, caracterização e cálculo de rendimento conforme o pré-tratamento descrito no item 3.2.1.

3.3. Teor de umidade e cálculo do rendimento em massa

As biomassas brutas (*in natura*) e as polpas resultantes dos pré-tratamentos organossolve e hidrotérmico, filtradas à vácuo, foram empregadas em um processo de secagem em estufa para determinação do teor de umidade e cálculo do rendimento em massa.

O teor de umidade foi determinado de acordo com a norma TAPPI T264 OM-88, utilizando cerca de 2 g de biomassa em placas de petri previamente pesadas e inseridas em estufa a aproximadamente 105 °C por 12 horas até massa constante, seguido de resfriamento em dessecador até a temperatura ambiente e pesadas. O teor de umidade foi determinado a partir da diferença do percentual entre a massa de amostra inicial e a massa após a secagem. Com o resultado do teor de umidade, calculou-se a quantidade de massa seca presentes no bagaço e palha de cana-de-açúcar brutas e polpas pré-tratadas, levando em conta o valor de massa empregado em cada pré-tratamento para, enfim, realizar o cálculo do rendimento em massa dos pré-tratamentos aplicando a Equação 1.

$$R (\%) = \frac{m_f}{m_i} \cdot 100 \quad (1)$$

Onde R é o rendimento mássico em porcentagem, m_f é a massa final seca da polpa pré-tratada, m_i é a massa inicial seca da biomassa bruta (*in natura*).

3.4. Caracterização da biomassa e das polpas pré-tratadas

A determinação da composição química das amostras *in natura* e pré-tratadas ocorreu conforme os procedimentos da National Renewable Energy Laboratory (NREL) (SLUITER *et al.*, 2012). Os experimentos foram realizados em triplicatas.

3.4.1. Obtenção da holocelulose

Para as etapas de caracterização, fez-se necessário a obtenção da holocelulose pelo protocolo, no qual foram adicionadas 5,0 g de biomassa em um erlenmeyer com 250 mL de água destilada. O frasco foi colocado em banho-maria a 75 °C e acrescidos de 2,0 mL de ácido acético (CH_3COOH) e 3,0 g de clorito de sódio (NaClO_2). O processo é apresentado na Figura 7 e após 1 hora, foi realizada uma nova adição de CH_3COOH e NaClO_2 com os mesmos

volumes citados, que então, esse processo foi repetido por mais duas vezes e a mistura foi resfriada em banho de gelo e filtrada. Posteriormente, a holocelulose resultante foi lavada com água destilada até que o resíduo fibroso apresentasse coloração esbranquiçada e o pH do eluido apresentasse valor igual ao da água de lavagem. Em seguida, o resíduo fibroso foi seco em estufa a 105 ± 3 °C por 6 horas, resfriado e pesado para quantificar holocelulose conforme a Equação 2.

$$TH (\%) = \frac{m_h}{m_i} \cdot 100 \quad (2)$$

Onde TH é o teor de holocelulose, m_h é a massa final seca de holocelulose e m_i é a massa inicial seca da amostra.



Figura 7: Processo de obtenção de holocelulose. Fonte: Autoria própria.

3.4.2. Teor de alfa-celulose

Utilizando a holocelulose obtida na etapa anterior (item 3.4.1), 3,0 g de holocelulose secas foram solubilizadas em 10 mL de hidróxido de potássio (KOH) 5 % (m/v). O frasco foi vedado e mantido em agitação por 2 horas conforme mostrado na Figura 8. O preparado foi filtrado e lavado com 50 mL de KOH 5 % (m/v) e em seguida, com 100 mL de água destilada. O mesmo procedimento de agitação, filtração e lavagem foi aplicado ao material, porém utilizando uma solução de KOH 24 % (m/v). Então, o resíduo fibroso retido no funil foi lavado com 25 mL de solução KOH 24 % (m/v), 50 mL de água destilada, 25 mL de CH₃COOH 10 % (v/v) e 100 mL de água destilada, sequencialmente. Após a extração dos componentes solúveis

em KOH, o resíduo fibroso foi novamente lavado com 50 mL de acetona P.A., seco a 105 ± 3 °C por 6 horas e pesado. O conteúdo de alfa-celulose foi determinado pela Equação 3.

$$TA (\%) = \frac{m_a}{m_i} \cdot 100 \quad (3)$$

Sendo que TA é a porcentagem de alfa-celulose, m_a é a massa final seca de alfa-celulose e m_i é a massa inicial seca da amostra de holocelulose.



Figura 8: Processo de obtenção de alfacelulose. Fonte: Autoria própria.

3.4.3. Teor de hemiceluloses

O conteúdo de hemiceluloses foi determinado como a diferença entre os teores de holocelulose e alfa-celulose conforme a Equação 4.

$$The (\%) = TH - TA \quad (4)$$

Onde, The é a porcentagem de hemiceluloses e TH e TA, já apresentados anteriormente, são os teores de holocelulose e alfa-celulose respectivamente.

3.4.4. Teor de lignina insolúvel pelo método Klason

Os ensaios para verificar o teor de lignina Klason insolúvel decorreram de acordo com a norma TAPPI T13M-54 com modificações e adaptações, utilizando aproximadamente 1 grama de amostra e 15,0 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) a 72 % (v/v), seguido de maceração

por 2 horas à temperatura ambiente. A mistura foi diluída em 575 mL de água destilada para a obtenção da concentração de H₂SO₄ de 3 % (v/v) e aquecida por 4 horas contadas após a fervura em um sistema de refluxo conforme mostrado na Figura 9. Após o resfriamento, a solução passou por filtração a vácuo utilizando um funil sinterizado n°4 e o resíduo foi colocado em estufa a 105 °C por 12 horas. Simultaneamente, houve a coleta dos hidrolisados para análise do teor de lignina Klason solúvel. A massa de lignina Klason insolúvel seca foi obtida pela subtração da massa do funil seco da massa final seca do funil com lignina. Então, abstendo a massa do funil, o teor de lignina insolúvel pode ser determinado pela equação 5.

$$TLI(\%) = \frac{m_{li}}{m_i} \cdot 100 \quad (5)$$

Sendo que TLI é o teor de lignina insolúvel em porcentagem, m_{li} é a massa de lignina insolúvel seca já desconsiderando a massa do funil e m_i é a massa inicial seca da biomassa ou polpa pré-tratada utilizada no método Klason.



Figura 9: Sistema de refluxo no método de lignina Klason. Fonte: Autoria própria

3.4.5. Teor de lignina solúvel pelo método Klason

A quantidade de lignina solúvel foi analisada por espectrofotometria UV/VIS utilizando um espectrofotômetro Kasvi modelo K37-UVVIS (Figura 10), em que as soluções para análise foram preparadas usando o hidrolisado filtrado retirado da etapa anterior. A absorvância das amostras foi aferida nos comprimentos de onda de 215 nm e 280 nm, então pôde-se determinar a concentração em g.L⁻¹ de lignina solúvel por meio da Equação 6.

$$CLS = \frac{(4,53 \cdot A_{215}) - A_{280}}{300} \quad (6)$$

Em que, CLS é a concentração de lignina solúvel em g.L^{-1} , A_{215} é o valor da absorbância das amostras em 215 nm e A_{280} é o valor da absorbância em 280nm.

Com os dados da concentração de lignina solúvel obtidos pela Equação 6, foi necessário realizar o cálculo da massa efetiva presente no volume de 575 mL que foi empregado no método Klason. Com os resultados dos valores de massa, foi então determinada a porcentagem de lignina solúvel presentes nas amostras biomassas utilizando a Equação 7 e o teor ajustado para as biomassas.

$$TLS(\%) = \frac{m_{ls}}{m_i} \cdot 100 \quad (7)$$

Onde TLS é o teor de lignina solúvel em porcentagem, m_{ls} é a massa de lignina solúvel e m_i é a massa inicial seca da biomassa ou polpa pré-tratada utilizada no método Klason.



Figura 10: Espectrofotômetro. Fonte: Autoria própria.

3.4.6. Deslignificação da biomassa

Após as análises dos rendimentos em massa dos pré-tratamentos e a determinação dos conteúdos de lignina solúvel e insolúvel, a porcentagem de deslignificação em relação a biomassa bruta é calculada pela Equação 8 (ALAM *et al.*, 2020).

$$Deslignificação(\%) = 1 - \frac{lig_p}{lig_b} \cdot 100 \quad (8)$$

Em que, lig_p é a massa de lignina total na polpa pré-tratada e lig_b é a massa de lignina total na biomassa bruta.

3.5. Teor de cinzas

O teor de cinzas foi avaliado conforme a norma TAPPI T211 OM-93. Cerca de 1,0 g de biomassa bruta e pré-tratada foi adicionada a um cadinho de porcelana e levados a mufla a 800 °C por 2 horas. Posteriormente, o sistema foi resfriado até a temperatura ambiente e as amostras foram pesadas. O teor de cinzas foi determinado considerando a percentagem de massa do resíduo (após calcinação) com relação à massa inicial de amostra seca conforme a Equação 9.

$$Cinzas (\%) = \frac{m_{cinzas}}{m_b} \cdot 100 \quad (9)$$

Onde, Cinzas (%) é o teor de cinzas em porcentagem, m_{cinzas} é a massa final de cinzas já desconsiderando a massa do cadinho e m_b é a massa inicial da biomassa ou polpa pré-tratada.

3.6. Análise das fibras por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As amostras de biomassas *in natura* e após os pré-tratamentos foram afixadas em fita carbono em suporte de alumínio e cobertas com ouro. As fotomicrografias de MEV foram determinadas em um microscópio de baixo vácuo da marca Tescan, modelo VEGA 3 LMU.

3.7. Determinação do índice de cristalinidade por Difração de Raios-X (DRX)

Os índices de cristalinidade das amostras de biomassas *in natura* e após os pré-tratamentos foram mensurados utilizando os difratogramas obtidos por análises de DRX, pelo método Segal (SEGAL *et al.*, 1959) conforme equação 10.

$$I_c = \frac{(I_{200} - I_{am})}{I_{200}} \cdot 100 \quad (10)$$

Em que, I_c é o índice de cristalinidade, I_{200} é a intensidade de difração máxima em unidades arbitrárias do plano 200, representando regiões cristalinas e amorfas em 2θ aproximadamente 22,5°, e I_{am} é a intensidade de difração em $2\theta = 18^\circ$, representada somente pela região amorfa.

Para a aplicação desse método, as amostras passaram por secagem a 50 °C durante 12 horas em estufa e analisadas utilizando um difratômetro Shimadzu LabX XRD-6000, com potência de 40 KV / 30 mA e $\lambda(\text{Cu K}\alpha) = 1,5406 \text{ \AA}$, com intervalo de 2θ de 5 a 40°, velocidade de varredura $2^\circ \cdot \text{min}^{-1}$ e resolução de $0,02^\circ$. Nesse procedimento para determinação do índice de cristalinidade, os difratogramas foram comparados entre as amostras brutas e cada pré-tratamento e os dados foram dispostos em gráfico para verificação da diferença.

3.8. Caracterização dos licores hemicelulósicos

3.8.1. Teor de sólidos nos licores

Com o intuito de estimar a quantidade de compostos solubilizados e concentração de enzimas que seriam utilizadas na etapa de hidrólise, foi realizado um processo de secagem de uma alíquota dos licores para verificar o teor de sólidos presentes. Amostras de 5,0 mL dos licores foram pesadas em um béquer e colocadas em estufa a 105°C por 12 horas até a evaporação de todo conteúdo líquido e pesadas novamente. Com isso, o teor de sólidos foi obtido pela equação 11.

$$\text{Sólidos (\%)} = \frac{m_s}{m_l} \cdot 100 \quad (11)$$

Onde, Sólidos (%) é o teor de sólidos nos licores em porcentagem, m_s é a massa final seca de sólidos e m_l é a massa das amostras de licor.

3.8.2. Quantificação de açúcares redutores totais (ART)

Os açúcares redutores totais presentes nos licores foram quantificados pelo método do ácido 3,5 dinitrosalissílico - DNS (MILLER, 1959). As reações foram realizadas com 100 μL de amostra de licor e 100 μL de DNS, enquanto o branco analítico foi feito com 100 μL de água destilada e 100 μL de DNS e então, colocadas em banho-maria em ebulição por 10 minutos. Após esse período, a reação foi resfriada em banho de gelo e adicionado 800 μL de água destilada e lidas no espectrofotômetro a 540nm. Então, as concentrações de açúcares foram obtidas com parâmetro em uma curva de calibração de glicose conforme a Figura 11.

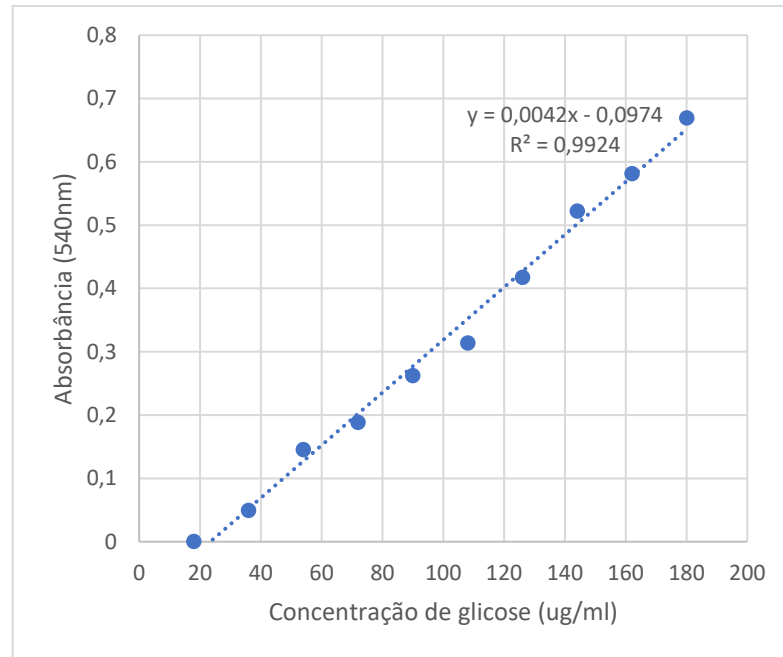


Figura 11: Curva de calibração de glicose. Fonte: Autoria própria.

3.8.3. Composição química por CLAE

As quantificações de sacarídeos (celobiose, glicose, xilose e arabinose) e inibidores fermentativos (ácido fórmico, ácido acético, furfural (FF), 5-hidroximetilfurfural (HMF)) foram realizadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). As amostras foram diluídas com a fase móvel (solução 0,1 % (v/v) de ácido fosfórico (H₃PO₄)) com fator de diluição igual a 3, filtradas em membrana de 0,20 µm (Chromafil® Xtra CA-20/25) e injetadas no sistema cromatográfico (Shimadzu TM model LC-20A Prominence), utilizando coluna Supelcogel TM C-610H, equipada com detectores ultravioleta e de índice de refração. O detector UV foi utilizado para detectar HMF e FF no comprimento de onda de 274 nm e o índice de refração para detectar ácidos orgânicos e açúcares. As análises foram realizadas empregando H₃PO₄ 0,1 % (v/v) como fase móvel, com taxa de fluxo da bomba a 0,5 mL.min⁻¹ a 32 °C. Após esse processo, foram verificados os picos de detecção conforme o tempo de retenção específico e padronizado para cada composto, seguido da quantificação das áreas dos picos e comparação com as curvas de calibração estabelecidas com o propósito de encontrar as concentrações de cada molécula e, então a caracterização do licor (MOREIRA *et al.*, 2017).

3.9. Hidrólise enzimática

As hidrólises enzimáticas dos licores hemicelulósicos foram realizadas com coquetel comercial Cellic CTec3 (Novozymes) com a presença de celulases e hemicelulases. Os ensaios foram conduzidos em frascos erlenmeyer de 250 mL. Os licores hemicelulósicos com volume amostral da reação de 30 mL tiveram seus valores de pH ajustados com tampão citrato de sódio 0,05 M para próximo de 5,0 devido ao pH ótimo de atividade do coquetel Cellic CTec3 e aplicada uma carga enzimática de 18 FPU/g de sólidos nos licores contida em 63 µl da solução com as enzimas (MEIGHAN *et al.*, 2017). Os experimentos foram realizados em triplicatas e encubados a 150 rpm e 50°C por 30 horas.

3.10. Caracterização dos licores hidrolisados

Após a hidrólise enzimática, os licores foram submetidos novamente aos processos de caracterização com as análises da dosagem de ART e composição química por CLAE, conforme citadas nos itens 3.8.2 e 3.8.3, respectivamente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização das biomassas brutas e pré-tratadas

Com o objetivo de avaliar a eficácia do pré-tratamento na quebra da estrutura lignocelulose nas biomassas analisadas, procedeu-se à caracterização dos materiais brutos e pré-tratados. Assim, foram realizadas determinações das quantidades de lignina, hemiceluloses, celulose e cinzas para cada uma das amostras de biomassa de bagaço e palha de cana brutas (BB e PB, respectivamente), bem como as polpas obtidas após o pré-tratamento organossolve do bagaço (BCO) e palha (PCO) e pré-tratamento hidrotérmico (BCH e PCH, respectivamente). Com isso, também foi avaliado o rendimento (Rend.) e o percentual de deslignificação (Deslig.) dos materiais com os resultados dispostos na Tabela 2.

Tabela 2: Caracterização das biomassas brutas e pré-tratadas.

Biomassa	Celulose (%)	Hemicelulos es (%)	Lignina total (%)	Cinzas (%)	Rend . (%)	Desli g. (%)	Balanco de massa (%)
BB	41,25 ± 4,60	29,30 ± 2,97	27,03 ± 1,14	2,87 ± 0,59	-	-	100,45 ± 5,62
BCO	56,12 ± 4,07	12,86 ± 1,07	21,06 ± 4,07	-	61,55	56,65	90,04 ± 5,85
BCH	54,87 ± 2,32	6,64 ± 1,91	33,63 ± 6,28	0,97 ± 0,59	91,21	39,16	96,11 ± 6,99
PB	38,31 ± 0,80	28,86 ± 3,53	25,74 ± 3,04	3,42 ± 1,37	-	-	96,33 ± 4,92
PCO	51,23 ± 6,12	18,31 ± 6,21	22,42 ± 4,75	-	50,39	60,07	91,96 ± 9,93
PCH	53,71 ± 0,37	9,64 ± 0,94	27,67 ± 3,21	0,46 ± 0,14	78,26	56,85	91,48 ± 3,37

Fonte: Autoria própria.

Ao analisar os dados apresentados na Tabela 2, podemos observar que a biomassa com o maior teor de celulose foi o bagaço de cana-de-açúcar, com uma porcentagem de celulose de 41,25 %. Esse valor é semelhante aos resultados relatados por Costa *et al.* (2021), que mencionaram teores de celulose entre 32 % e 48 %. A palha de cana-de-açúcar apresentou um teor de celulose de 38,31 %, valor bastante semelhante aos valores mencionados por Costa *et al.* (2021), que relataram teores de celulose entre 40 % e 44 %. Esses dados indicam que essas matérias-primas têm um grande potencial para a produção de etanol de segunda geração, que é produzido a partir de materiais lignocelulósicos.

Como foco principal deste estudo, o teor de hemiceluloses em cada uma das biomassas apresentou valores de 29,30 % para o bagaço de cana e 28,86 % para a palha. Ainda em comparação com Costa *et al.* (2021), foram relatados valores entre 19 % e 24 % para o bagaço, enquanto para a palha foram apresentados valores entre 30 % e 32 %. No presente estudo, os resultados obtidos de hemiceluloses mostraram-se com certo desvio em relação a referência, porém pode haver diferenças relacionadas com as condições de cultivo e características da matéria-prima. As hemiceluloses, assim como a celulose e a lignina, também podem ser aproveitadas e gerar uma série de produtos. Quando fracionadas, liberam monossacarídeos, principalmente xilose e arabinose, manose, galactose e glicose em menor quantidade, que podem ser convertidos em açúcares, biocombustíveis, produtos químicos, entre outros (CHANDEL *et al.*, 2018).

Comparando os materiais gerados pela cana-de-açúcar, o bagaço de cana apresentou uma quantidade ligeiramente maior de lignina em sua composição em relação a palha de cana, cerca de 27,03 % e 25,74 % respectivamente, valor semelhante ao encontrado por Yu *et al.*

(2015), que foi de 26,4 % para a palha de cana-de-açúcar. Esses dados mostram que essas biomassas requerem um pré-tratamento mais eficiente para separar a lignina da celulose, a fim de obter uma hidrólise mais eficaz.

A análise do teor de cinzas no bagaço e na palha de cana-de-açúcar está de acordo com os valores relatados na literatura por Fredericci *et al.* (2012) e por Cordeiro *et al.* (2018). O teor de cinzas é um dado relevante, pois esses componentes podem interferir no processo de fermentação, uma vez que baixos índices de cinzas favorecem a condição importante da matéria-prima e parcialmente neutralizam catalisadores ácidos (MOREIRA *et al.*, 2015).

A partir dos rendimentos obtidos após os pré-tratamentos, temos que, houve uma perda de massa de 38,45 % no BCO, 8,79 % no BCH, 49,6 % na PCO e 21,74 % na PCH. Para verificar os mecanismos de ação dos pré-tratamentos e o potencial de extração dos componentes da lignocelulose, a Tabela 2 apresenta os valores de caracterização de cada uma das biomassas após os pré-tratamentos organossolve e hidrotérmico.

A eficiência dos pré-tratamentos é verificada quando há a separação da maior quantidade possível de celulose das outras frações presentes nos materiais lignocelulósicos. Portanto, é importante realizar uma comparação entre as biomassas do bagaço de cana (Figura 12) e palha de cana (Figura 13) antes e após o pré-tratamento para avaliar as alterações nos conteúdos de celulose, hemiceluloses e lignina presentes na polpa e, conseqüentemente, o grau de extração dos componentes nos licores.

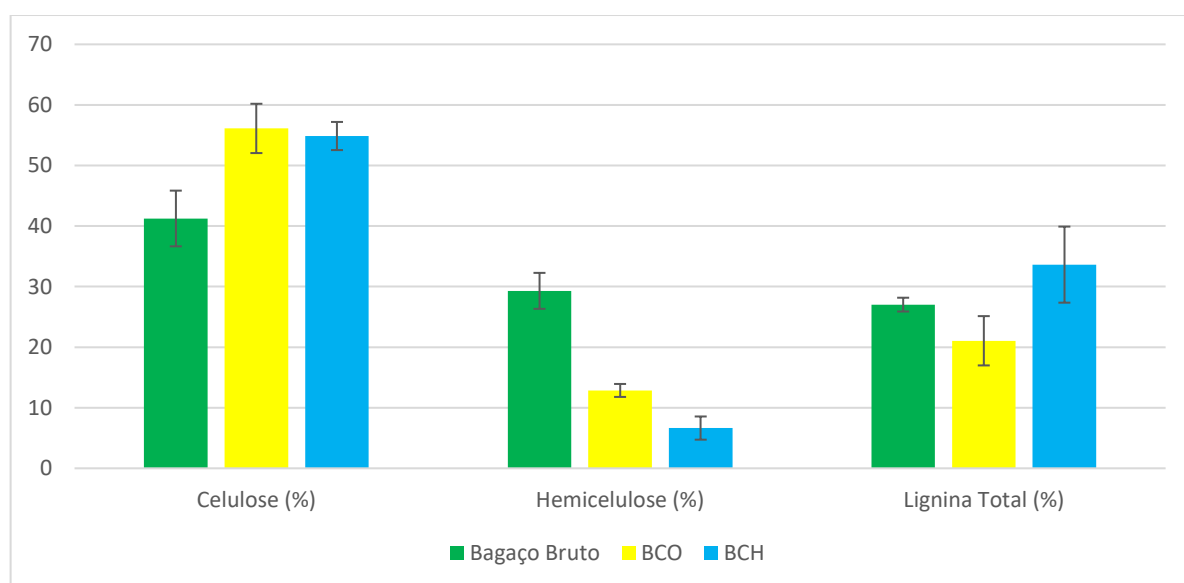


Figura 12: Comparação das alterações de composição das amostras brutas e pré-tratadas do bagaço de cana.

Fonte: Autoria própria.

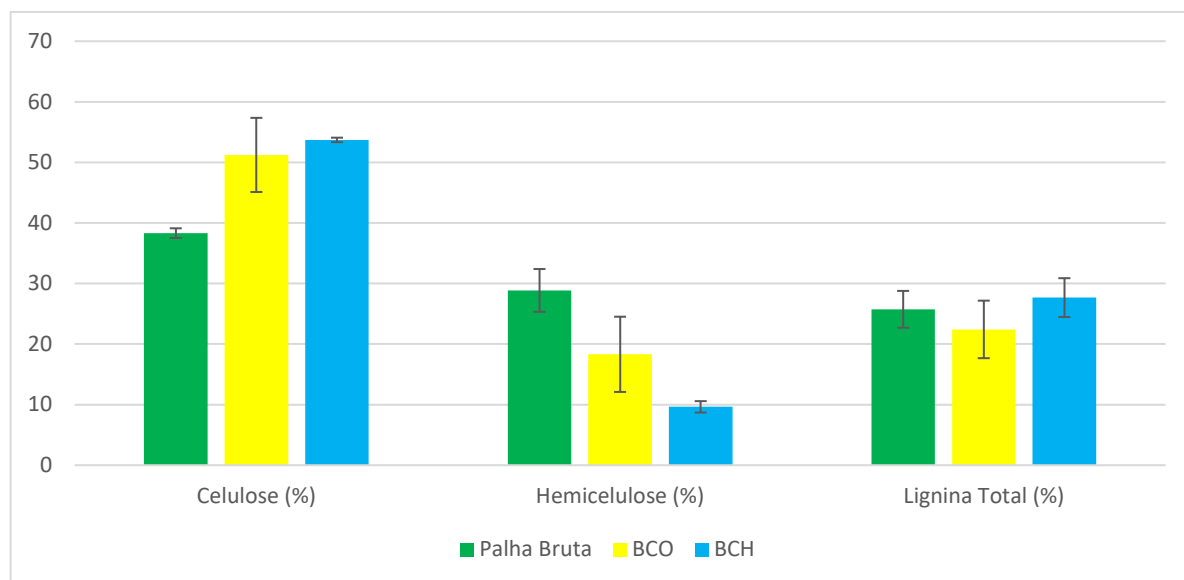


Figura 13: Comparação das alterações de composição das amostras brutas e pré-tratadas da palha de cana.

Fonte: Autoria própria.

De forma geral, foi observado um aumento e composição percentual semelhante nos teores de celulose em todas as biomassas analisadas após os pré-tratamentos organossolve e hidrotérmico. Esse aumento ocorre devido à remoção dos outros componentes durante o pré-tratamento, principalmente relacionado com o teor de hemiceluloses que realmente são suscetíveis a solubilização na fração líquida empregada nos pré-tratamentos ácidos conforme a configuração do organossolve e do hidrotérmico. Ainda assim, verificamos que o percentual de deslignificação foi efetivo para os pré-tratamentos BCO, PCO e PCH, com valores de 56,65 %, 60,07 % e 56,85 % respectivamente, enquanto para o pré-tratamento BCH obteve-se uma extração de 39,16% da lignina total. Apesar que em algumas amostras a porcentagem relativa ao teor de lignina apresentou um aumento de valor, isso se deu pelo alto grau de extração de hemiceluloses. Com isso, ao comparar os resultados do teor de lignina avaliando a perda de massa, temos que, houve um processo de deslignificação embora ainda haja uma quantidade maior presente nas polpas do pré-tratamento hidrotérmico, o que se faz interessante para a proposta deste estudo, em utilizar o licor hemicelulósico com baixo teor de lignina.

4.1.1. Análise das fibras por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise das fibras das amostras de bagaço e palha de cana brutas e pré-tratadas realizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) demonstrou as alterações estruturais nas fibras das biomassas em diferentes níveis, porém, poderá auxiliar na redução da

recalcitrância dos materiais com o propósito de aumentar a eficiência da hidrólise enzimática, representadas pelas Figuras 14 e 15. O bagaço de cana bruto (Figura 14a) e a palha de cana bruta (Figura 15a) demonstram a estrutura natural das fibras da biomassa lignocelulósica, onde são dispostas em camadas uniformes em que podemos verificar a rigidez, suavidade e compactação na superfície do material. Com relação ao bagaço de cana, o pré-tratamento organossolve (Figura 14b) apresentou uma destruição da estrutura primária e aumento significativo da porosidade das fibras, enquanto o pré-tratamento hidrotérmico (Figura 14c) ainda foi possível observar a estrutura dos feixes com degradações e com alguns pontos de desestruturação. Na palha de cana, o processo organossolve (Figura 15b) ocorreu com mecanismo distinto ao do bagaço de cana, proporcionando a superfície da biomassa um aspecto mais liso e com separação das microfibrilas, em contrapartida no processo hidrotérmico (Figura 15c) a conformação das fibras ainda se encontra presente e podemos notar uma distribuição de poros ao longo das fibras. Tais conformações são verificadas conforme estudos com pré-tratamentos realizados em condições semelhantes, como abordado por Chen *et al.* (2021).

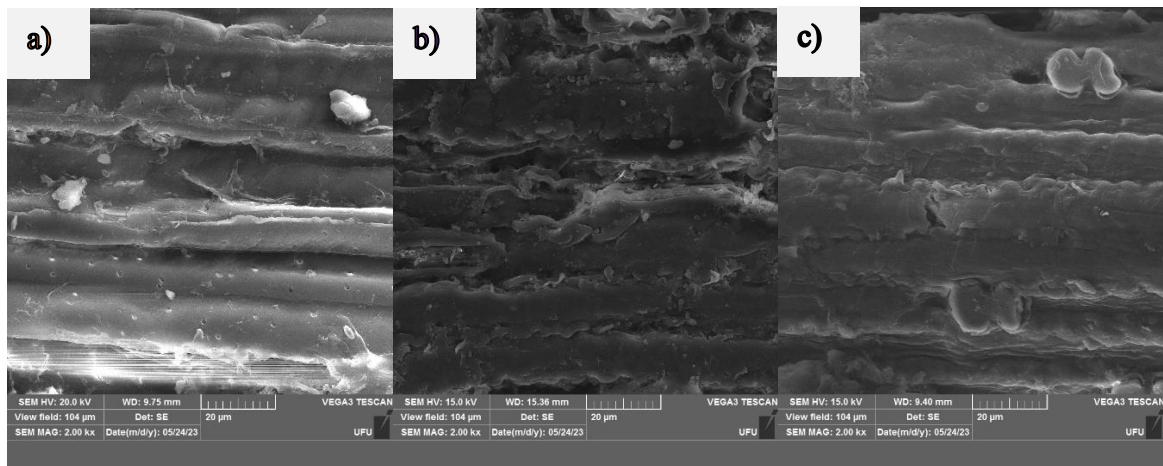


Figura 14: Microscopia eletrônica de varredura das amostras de bagaço de cana bruto (a), organossolve (b) e hidrotérmico (c). Fonte: Autoria própria.

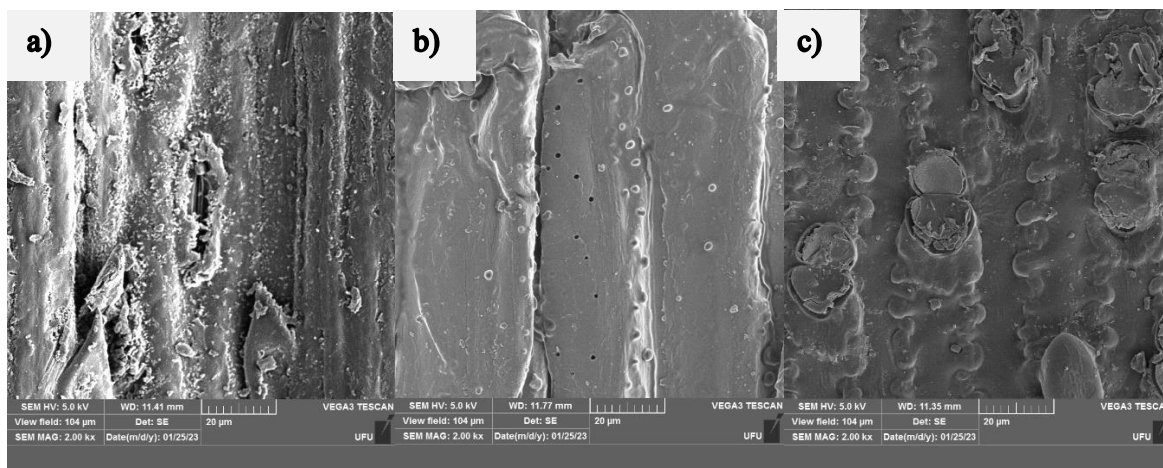


Figura 15: Microscopia eletrônica de varredura das amostras de palha de cana bruta (a), organossolve (b) e hidrotérmico (c). Fonte: Autoria própria.

4.1.2. Determinação do índice de cristalinidade por Difração de Raios-X (DRX)

Na determinação do índice de cristalinidade, foi efetuada a análise dos difratogramas obtidos por difração de raios-X conforme representados na Figura 16.

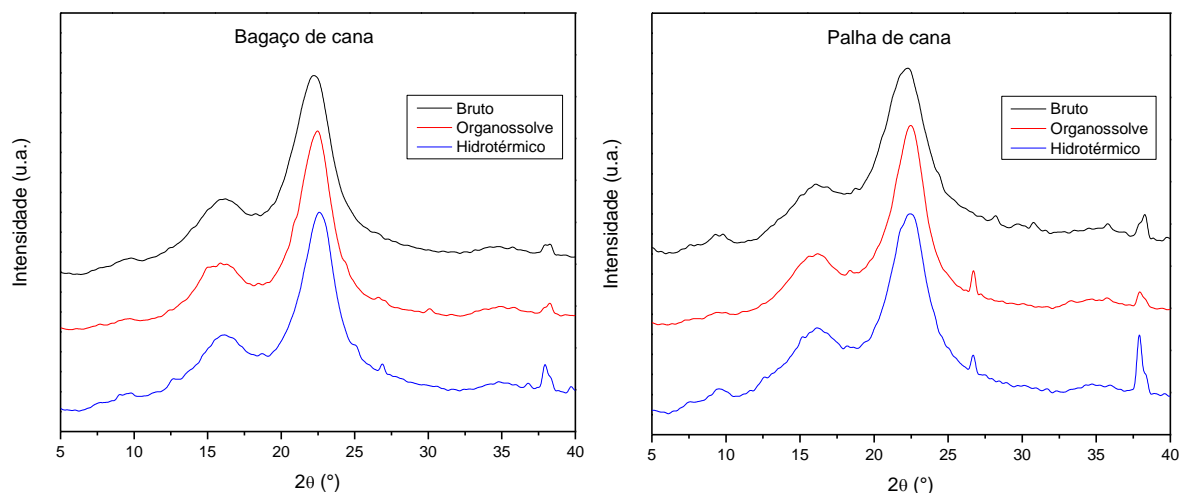


Figura 16: Difratogramas comparativos entre biomassas brutas e pré-tratadas. Fonte: Autoria própria.

Obteve-se o valor do índice de cristalinidade das amostras em que para o bagaço de cana foram obtidos valores de aproximadamente 72 %, 79 % e 73 % para a biomassa bruta, pré-tratada por organossolve e hidrotérmico respectivamente, enquanto para a palha de cana, os resultados foram de 69 %, 77 % e 68 %. O aumento da cristalinidade com a aplicação dos pré-tratamentos é condizente com o processo de deslignificação, onde a lignina e algumas regiões

da celulose apresentam uma estrutura amorfa e os polissacarídeos da biomassa possuem predominantemente estruturas mais cristalinas. Porém, na amostra de PCH houve um desvio com valor de índice de cristalinidade menor que o valor encontrado para a palha bruta, mas esse valor pode ser explicado pela análise dos resultados de caracterização e análise das fibras em que, a redução do Ic pode ser consequência da desorganização ou quebra das estruturas cristalinas. Portanto, no geral, o cálculo do índice de cristalinidade demonstrou uma predominância de moléculas com características estruturais mais cristalinas, o que indica que os pré-tratamentos obtiveram êxito em realizar a deslignificação e enriquecer a polpa com celulose.

4.2. Caracterização dos licores hemicelulósicos antes e após a hidrólise enzimática

4.2.1. Teor de sólidos totais nos licores

Para identificação do teor de sólidos totais presentes nos licores hemicelulósicos e com o intuito de determinar a concentração de enzimas a serem empregadas no processo de hidrólise, foi retirada uma alíquota dos licores e pesadas em um béquer, que foram colocadas em estufa à 105°C e tiveram sua massa aferida. Então, o teor de sólidos totais foi calculado e os dados dispostos na Tabela 3.

Tabela 3: Teor de sólidos totais nos licores.

Licor	Teor de sólidos (%)
BCO	1,420 ± 0,012
BCH	1,397 ± 0,101
PCO	2,203 ± 0,012
PCH	1,873 ± 0,006

Fonte: Aatoria própria.

4.2.2. Quantificação de açúcares redutores totais (ART)

Neste estudo, os licores hemicelulósicos foram analisados antes e depois da hidrólise enzimática quanto a quantidade de açúcares redutores totais presentes. Que inclusive, a

concentração de enzimas inseridas no meio foi determinada com base no teor de sólidos presentes nos licores, conforme citado anteriormente, submetidas a hidrólise enzimática com coquetel Cellic Ctec3 por um período de 30 horas.

Ao verificar e comparar as amostras, em geral, verificamos um aumento na concentração de açúcares redutores nos licores hidrolisados em relação aos licores do pré-tratamentos (Tabela 4).

Tabela 4: Dosagem de açúcares redutores totais (ART) nos licores dos pré-tratamentos e hidrolisados

Licor	ART (g.L⁻¹)	Licor	ART (g.L⁻¹)
BCO	11,144 ± 0,530	PCO	8,560 ± 0,273
BCO Hidrolisado	13,440 ± 0,081	PCO Hidrolisado	9,478 ± 0,687
BCH	16,507 ± 1,679	PCH	14,164 ± 0,478
BCH Hidrolisado	22,492 ± 0,074	PCH Hidrolisado	22,830 ± 0,781

Fonte: Autoria própria.

As concentrações iniciais nos licores relacionados com o pré-tratamento hidrotérmico do bagaço (BCH) e palha (PCH) já apresentaram valores maiores do que os encontrados para o pré-tratamento organossolve (BCO e PCO). Então, após a realização da hidrólise enzimática, os hidrolisados foram submetidos a nova dosagem de ART, na qual verificou-se um pequeno aumento nas concentrações de açúcares dos licores do processo organossolve do bagaço de cana, sendo de 11,114 g.L⁻¹ para 13,440 g.L⁻¹, sendo que para a palha de cana obteve-se um incremento na concentração de 8,560 g.L⁻¹ para 9,478 g.L⁻¹. Já os hidrolisados dos licores do bagaço e palha de cana que passaram por pré-tratamento hidrotérmico, apresentaram um aumento considerável em relação ao organossolve com valores de 16,507 g.L⁻¹ para 22,492 g.L⁻¹ referentes ao bagaço de cana e de 14,164 g.L⁻¹ para 22,830 g.L⁻¹ sobre o licor da palha de cana, inclusive representando o resultado de maior concentração e aumento relativo.

Com isso, apesar da alta solubilidade das hemiceluloses ao licor do pré-tratamento, a hidrólise enzimática das hemiceluloses é um processo bioquímico que envolve a quebra das hemiceluloses, um componente complexo da biomassa lignocelulósica, em unidades menores de açúcares simples. As hemiceluloses são polissacarídeos amorfos e heterogêneos, compostas por diferentes monossacarídeos, como xilose, arabinose, manose, entre outros. No entanto, assim como na hidrólise enzimática da celulose, a eficiência da hidrólise enzimática das

hemiceluloses também enfrenta desafios. As hemiceluloses apresentam uma estrutura química mais complexa e heterogênea em comparação com a celulose, o que torna o processo de hidrólise mais complexo. Além disso, a presença de substâncias inibidoras, como lignina e produtos derivados da degradação da biomassa, podem afetar negativamente a atividade enzimática, bem como as variáveis envolvendo a reação bioquímica, como o tempo de reação e a concentração da enzima em relação a concentração de substrato.

4.2.3. Composição química por CLAE

As análises cromatográficas realizadas antes e após a hidrólise enzimática dos licores hemicelulósicos (Tabela 5) demonstraram sobre os açúcares C5, de maneira geral, uma predominância e aumento na concentração de xilose enquanto a arabinose foi aparentemente consumida para a formação de outros compostos. Com relação aos sacarídeos compostos de C6, foram identificadas baixas concentrações em relação aos açúcares C5 que podem ser oriundas da estrutura heterogênea das hemiceluloses, ainda assim, as concentrações de glicose e celobiose também apresentaram incremento após a hidrólise enzimática. Os teores dos compostos inibidores da fermentação também foram verificados, sendo eles: ácido acético, ácido fórmico, 5-hidroxi metilfurfural (5-HMF) e furfural. As concentrações dos inibidores denotaram um crescimento relativamente elevado que pode ser demonstrado por reações químicas envolvendo principalmente as pentoses para formação de furfural, as hemiceluloses para ácido acético e no presente estudo, uma menor quantidade da transformação de hexoses para 5-HMF, que podem ser utilizadas para formação de ácido fórmico (SJULANDER, 2020). Ao comparar os resultados com a literatura em processos semelhantes como a hidrólise ácida do bagaço de sisal, apresentado por Bezerra *et al.* (2015), temos que foram verificadas variações nas concentrações dos componentes ao realizar mudanças no processo de pré-tratamento, sendo que na melhor condição, concentração de xilose foi de 6,24 g.L⁻¹, semelhante aos resultados obtidos nesse estudo. Ainda assim, no estudo com bagaço de sisal foram denotadas maiores concentrações de celobiose (9,89 g.L⁻¹), glicose (3,37 g.L⁻¹) e arabinose (1,63 g.L⁻¹), enquanto houve uma menor formação de produtos inibidores em relação ao estudo de Bezerra *et al.* (2015), que podem ser verificadas pela diferença da biomassa e dos pré-tratamentos.

Tabela 5: Composição química dos licores hemicelulósicos e hidrolisados

Licor	Compostos	Concentração no licor (g.L ⁻¹)	Concentração no hidrolisado (g.L ⁻¹)
BCO	Celobiose	0,000 ± 0,000	0,268 ± 0,045
	Glicose	0,501 ± 0,037	0,204 ± 0,001
	Xilose	2,030 ± 0,162	2,740 ± 0,092
	Arabinose	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
	Ácido fórmico	0,442 ± 0,033	0,278 ± 0,020
	Ácido acético	1,061 ± 0,024	0,880 ± 0,048
	5-HMF	0,164 ± 0,015	0,095 ± 0,003
	Furfural	20,714 ± 0,270	12,927 ± 0,601
BCH	Celobiose	0,000 ± 0,000	0,301 ± 0,048
	Glicose	0,185 ± 0,262	0,400 ± 0,050
	Xilose	3,006 ± 0,197	6,886 ± 0,755
	Arabinose	0,362 ± 0,062	0,000 ± 0,000
	Ácido fórmico	0,355 ± 0,062	0,173 ± 0,176
	Ácido acético	0,339 ± 0,089	0,560 ± 0,599
	5-HMF	0,000 ± 0,000	0,035 ± 0,028
	Furfural	0,000 ± 0,000	1,692 ± 0,518
PCO	Celobiose	0,000 ± 0,000	0,304 ± 0,003
	Glicose	0,473 ± 0,009	0,374 ± 0,012
	Xilose	0,000 ± 0,000	6,060 ± 1,120
	Arabinose	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
	Ácido fórmico	0,488 ± 0,049	0,400 ± 0,007
	Ácido acético	0,000 ± 0,000	0,888 ± 0,080
	5-HMF	1,092 ± 0,022	0,183 ± 0,012
	Furfural	3,284 ± 0,204	1,526 ± 0,839
PCH	Celobiose	0,139 ± 0,001	0,000 ± 0,000
	Glicose	2,623 ± 0,057	1,983 ± 0,171
	Xilose	2,728 ± 0,170	4,183 ± 0,389
	Arabinose	1,496 ± 0,076	0,573 ± 0,008
	Ácido fórmico	4,003 ± 0,275	2,565 ± 0,180
	Ácido acético	0,772 ± 0,087	1,077 ± 0,031
	5-HMF	0,000 ± 0,000	0,159 ± 0,032
	Furfural	0,000 ± 0,000	7,409 ± 3,296

Fonte: Autoria própria.

Enfim, foi possível demonstrar que a hidrólise enzimática representou uma importante etapa para a liberação de monossacarídeos fermentescíveis, em que as concentrações desses

componentes apresentaram um aumento após o processo, porém as condições do licor hemicelulósico ou do processo de hidrólise podem ter contribuído para a formação de compostos inibidores do processo fermentativo.

5. CONCLUSÃO

As análises e caracterizações das biomassas investigadas revelaram que todas elas apresentam um promissor potencial para a produção de etanol de segunda geração. Isso se deve ao fato de todas as biomassas possuírem uma quantidade significativa de polissacarídeos com resultados de 41,25 % de celulose e 29,30 % de hemiceluloses para o bagaço de cana e 38,31 % de celulose e 28,86 % de hemiceluloses para a palha de cana, esses podendo ser convertidos em açúcares fermentáveis. Sendo que, a etapa de pré-tratamento utilizando processo organossolve foi capaz de extrair o conteúdo centesimal de hemiceluloses restando na polpa 12,86 % no BCO e 18,31 % na PCO, enquanto no pré-tratamento hidrotérmico apresentou valores de 6,64 % para BCH e 9,64 % para PCH, e ao mesmo tempo, removeu parte da lignina. Com a separação da lignina do licor hemicelulósico, o acesso das enzimas ao substrato foi facilitado, maximizando o processo de hidrólise.

Para obtenção do licor rico em hemiceluloses, o pré-tratamento hidrotérmico demonstrou uma eficácia maior em relação ao processo organossolve por realizar uma separação significativa da fração de hemiceluloses da biomassa lignocelulósica, preservando a celulose e uma certa quantidade de lignina na polpa. Além disso, ao compararmos os resultados obtidos nas concentrações de açúcares presentes nos licores hemicelulósicos, pelo método ART e pela CLAE, concluímos que o pré-tratamento hidrotérmico apresentou maiores concentrações desses açúcares, tanto C5 quanto C6, denotando valores semelhantes para o bagaço e a palha de cana. Após a hidrólise enzimática, o conteúdo geral de açúcares fermentescíveis apresentou um aumento nos licores, apesar da produção e identificação de substâncias inibidoras dos processos fermentativos.

Contudo, algumas etapas do processo estudadas podem ser otimizadas quanto a melhoria da eficiência da hidrólise enzimática e a redução da formação de compostos inibidores. No entanto, apesar dos desafios, os pré-tratamentos organossolve e hidrotérmico demonstraram-se eficientes para separação da matriz lignocelulósica e obtenção dos licores ricos em hemiceluloses. Isso pode impulsionar a produção de etanol de segunda geração a partir de biomassa lignocelulósica, especificamente da fração hemicelulósica com a utilização de

microrganismos específicos fermentadores de pentoses, contribuindo para o reaproveitamento dos resíduos agroindustriais, a redução da dependência de combustíveis fósseis e mitigação dos impactos ambientais.

6. REFERÊNCIAS

ABUD, A. K. S; SILVA, C. E. F. Bioethanol in Brazil: Status, Challenges and Perspectives to Improve the Production. **Bioethanol Production From Food Crops**, p. 417-443, 2019.

ALAM, A. *et al.* Modeling of optimal green liquor pretreatment for enhanced biomass saccharification and delignification by distinct alteration of wall polymer features and biomass porosity in Miscanthus. **Renewable Energy**, v. 159, p. 1128-1138, 2020.

ALMEIDA, S. C.; NASCIMENTO, D. D. DO R. Revisão: leveduras utilizadas na produção de etanol de segunda geração. **Bioenergia em revista: diálogos**, v. 11, n. 1, p. 99–119, 2021.

ANP. **RenovaBio**. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/producao-debiocombustiveis/renovabio>>. Acesso em: 18 de maio de 2023.

AYODELE, B. V.; ALSAFFAR, M. A.; MUSTAPA, S. I. An overview of integration opportunities for sustainable bioethanol production from first- and second-generation sugar-based feedstocks. **Journal of Cleaner Production**, v. 245, n. 118857, 2020.

BAÊTA, B. E. L. *et al.* Evaluation of hydrogen and methane production from sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysates by two-stage anaerobic digestion process. **Bioresource Technology**, v. 218, p. 436-446, 2016.

BAJPAI, P. Biermann's Handbook of Pulp and Paper (Third Edition), **Elsevier**, p. 187-205, 2018.

BEZERRA *et al.* Avaliação do bagaço de sisal submetido a tratamento ácido. **XX Simpósio Nacional de Bioprocessos**: Fortaleza-CE, 2015.

CAI, J. *et al.* Review of physicochemical properties and analytical characterization of lignocellulosic biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [S.L.], v. 76, p. 309-322, 2017.

CARLI, S. Purificação, caracterização bioquímica e potencial de aplicação biotecnológica de uma xylanase halotolerante e termoestável de *Colletotrichum graminicola*. Dissertação (Mestrado em Química), **Universidade de São Paulo: Ribeirão Preto-SP**, p. 47, 2016.

CHADHA, B. S.; RAI, R.; MAHAJAN, C. Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes for the Production of Liquid and Gaseous Biofuels (Second Edition). **Biomass, Biofuels, Biochemicals**, 2019. 867p.

CHANDEL, Anuj K.; ANTUNES, Felipe A.F.; TERÁN-HILARES, Ruly; COTA, Junio; ELLILÄ, Simo; SILVEIRA, Marcos H.L.; SANTOS, Júlio C. dos; SILVA, Silvio S. da. Bioconversion of Hemicellulose Into Ethanol and Value-Added Products. **Advances In Sugarcane Biorefinery**, [S.L.], p. 97-134, 2018.

CHANDRA, M. R. G. S.; MADAKKA. M. Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry. **Academic Press**, 2019. 376p.

CHEN, H.; LI, X.; YU, S.; QIN, Y.; QU, Y.; ZHAO, J. Potassium permanganate assisted organosolv pretreatment enhances enzymatic hydrolysis of corn stover. **GCB-Bioenergy**. v. 13, n. 4, 2021.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Cana-de-Açúcar**. 1º Levantamento Safra 2023/2024. Abril, 2023. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana>. Acesso em: 18 de maio de 2023.

CORDEIRO, G. C., BARROSO, T. R., TOLEDO FILHO, R. D. "Enhancement the properties of sugar cane bagasse ash with high carbon content by a controlled re-calcination process", **KSCE Journal of Civil Engineering**, v. 22, n. 4, p. 1250-1257, 2018.

COSTA, B. E. B. *et al.* Comparison Between Chemical and Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass for Bioethanol Production: a review. **Revista Virtual de Química**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 242-259, 2021.

DE OLIVEIRA RODRIGUES, P. *et al.* On-site Produced Enzyme Cocktails for Saccharification and Ethanol Production from Sugarcane Bagasse Fractionated by Hydrothermal and Alkaline Pretreatments. **Waste and Biomass Valorization**, v. 13, p. 95-106, 2022.

DEVI, A. *et al.* Lignocellulosic Biomass Valorization for Bioethanol Production: a Circular Bioeconomy Approach. **BioEnergy Research**, 15, p. 1820-1841, 2022.

ELIAS, A. M. *et al.* Retro-techno-economic-environmental analysis improves the operation efficiency of 1G-2G bioethanol and bioelectricity facilities. **Applied Energy**, v. 282, Part A, n. 116133, 2021.

FERNANDES, E. S. *et al.* Minor Biomass Particle Size for an Efficient Cellulose Accessibility and Enzymatic Hydrolysis. **ChemistrySelect**, v. 5, n. 25, 2020.

FERREIRA, J. A.; TAHERZADEH, M. Improving the economy of lignocellulose-based biorefineries with organosolv pretreatment. **Bioresource Technology**. v. 299, n. 122695, 2020.

FREDERICCI, C. *et al.* Caracterização de cinzas de bagaço de Cana como matéria-prima para a produção de cerâmica. 56º Congresso Brasileiro de Cerâmica: 1º Congresso Latino-Americano de Cerâmica IX Brazilian Symposium on Glass and Related Materials, 47 Curitiba, Pr, v. 1, n. 1, p. 1-12, 06 jul. 2012. Anual. Disponível em: https://inis.iaea.org/collection/NCLCollectionStore/_Public/46/051/46051914.pdf. Acesso em: 25 de maio de 2023.

GRASSI, M. C. B.; PEREIRA, G. A. G. Energy-cane and RenovaBio: Brazilian vectors to boost the development of Biofuels. **Industrial Crops and Products**, v. 129, p. 201-205, 1 mar. 2019.

GUNDUPALLI, M. P.; SRIARIYANUN, M. Recent Trends and Updates for Chemical Pretreatment of lignocellulosic biomass. **Applied Science and Engineering Process**, v. 16, n. 1, 5842, 2023.

HERNÁNDEZ-BELTRÁN, J. U.; LIRA, I. O. H.; CRUZ-SANTOS, M. M.; SAUCEDO-LUEVANOS, A.; HERNÁNDEZ-TERÁN, F.; BALAGURUSAMY, N. Insight into Pretreatment Methods of Lignocellulosic Biomass to Increase Biogas Yield: Current State, Challenges, and Opportunities. **Applied Sciences** 9 (18): 3721, 2019.

HOUFANI *et al.* Insights from enzymatic degradation of cellulose and hemicellulose to fermentable sugars- a review. **Biomass and Bioenergy**, v. 134, n. 105481, 2020.

ILANIDIS, D. *et al.* Hydrothermal Pretreatment of Wheat Straw: Effects of Temperature and Acidity on Byproduct Formation and Inhibition of Enzymatic Hydrolysis and Ethanol Fermentation. **Agronomy**, 11 (3), 487, 2021.

JUNIOR, P. N. A. *et al.* How did COVID-19 affect green-fuel supply chain? - A performance analysis of Brazilian ethanol sector. **Research in Transportation Economics**, 2021.

KRASZNAI, D. J. *et al.* Compositional analysis of lignocellulosic biomass: conventional methodologies and future outlook. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 38, n. 2, p. 199- 217, 2018.

LAMOUNIER, K. F. R. *et al.* Ethanol Production and Other Bioproducts by *Galactomyces geotrichum* from Sugarcane Bagasse Hydrolysate. **Current Microbiology**, v. 77, n. 5, p. 738-745, 2020.

LORENZI, B. R.; ANDRADE, T. H. N. DE. Second generation ethanol in Brazil: Policies and socio-technical networks. **Revista Brasileira de Ciências Sociais**, v. 34, n. 100, 2019.

MAIA, R. G. T.; BOZELLI, H. The importance of GHG emissions from land use change for biofuels in Brazil: An assessment for current and 2030 scenarios. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 179, 2022.

MANKAR, A. R. *et al.* Pretreatment of lignocellulosic biomass: A review on recent advances. **Bioresource Technology**, v. 334, n. 125235, 2021.

MEIGHAN, B. N. *et al.* Two-stage fractionation of sugarcane bagasse by autohydrolysis and glycerol organosolv delignification in a lignocellulosic biorefinery concept. **Industrial Crops and Products**, v. 108, n. June, p. 431-441, 2017.

MENG, X. *et al.* Effects of the advanced organosolv pretreatment strategies on structural properties of woody biomass. **Industrial Crops and Products**. v. 146, n. 112144, 2020.

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

MOREIRA, F. S. *et al.* Improvement of hydrogen production by biological route using sepeated batch cycles. **Process Biochemistry**, v. 58, p. 60–68, 2017.

MOREIRA, R.; *et al.* Physicochemical characterization of white, yellow and purple maize flours and rheological characterization of their doughs. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, p. 7954-7963, 2015.

NOVO, L. P. Determinação da relação dos parâmetros de solubilidade de Hansen de solventes orgânicos com a deslignificação organossolve de bagaço de cana-de-açúcar. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade de São Paulo (USP), p. 140, 2012.

POLKO, J. K; KIEBER, J. J. The Regulation of Cellulose Biosynthesis in Plants. **The Plant Cell**, v. 31, n. 2, p. 282-296, 2019.

QASEEM, M. F.; SHAHEEN, H. WU, A. Cell wall hemicellulose for sustainable industrial utilization. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 144, n. 110996, 2021.

RAJ, T. *et al.* Recent advances in commercial biorefineries for lignocellulosic ethanol production: Current status, challenges and future perspectives. **Bioresource Technology** Elsevier Ltd, 2022.

RAJENDRAN, K. *et al.* Updates on the pretreatment of lignocellulosic feedstocks for bioenergy production—a review. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 8, n. 2, p. 471- 483, 2018.

RALPH, J.; LAPIERRE, C.; BOERJAN, W. Lignin structure and its engineering. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 56, p. 240-249, 2019.

RAO *et al.* Hemicellulose: Structure, chemical modification, and application. **Progress in Polymer Science**, v. 140, n. 101675, 2023.

REIS, M. C. DOS; GONÇALVES, W.; FREITAS, R. R. DE. PANORAMA EVOLUTIVO DA PRODUTIVIDADE DE BIOCOMBUSTÍVEIS NO BRASIL NOS ÚLTIMOS 10 ANOS. **Brazilian Journal of Production Engineering - BJPE**, p. 34-46, 2022.

RUIZ *et al.* Engineering aspects of hydrothermal pretreatment: From batch to continuous operation, scale-up and pilot reactor under biorefinery concept. **Bioresource Technology**, v. 299, n. 122685, 2020.

SAKTHIVEL, P.; SUBRAMANIAN, K. A.; MATHAI, R. Experimental study on unregulated emission characteristics of a two-wheeler with ethanol-gasoline blends (E0 to E50). **Fuel**, v. 262, n. 116504, 2020.

SEGAL, L.; CREELY, J. J.; MARTIN, A.; CONRAD, C. M.; An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. **Textile Research Journal, Princeton**, v.29, n. 10, p. 786-794, 1959.

SHARMA, B.; LARROCHE, C.; DUSSAP, C. Comprehensive assessment of 2G bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 313, n. 123630, 2020.

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

SJULANDER, N.; KIKAS, T. Origin, impact and control of lignocellulosic inhibitors in bioethanol production—A review. **Energies**, v. 13, n. 4751, 2020.

SLUITER, A. *et al.* Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. v. 2011, n. April 2008, 2012.

SUN *et al.* Ultrastructural change in lignocellulosic biomass during hydrothermal pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 341, n. 125807, 2021.

VEIGA, A. T. V. Plasma em meio líquido para modificação superficial de fibra de celulose. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), p. 107, 2020.

WIETSCHEL, L. *et al.* Environmental benefits of large-scale second-generation bioethanol production in the EU: An integrated supply chain network optimization and life cycle assessment approach. **Journal of Industrial Ecology**, v. 25, n. 3, p. 677-692, 2021.

WOICIECHOWSKI, A. L. *et al.* Lignocellulosic biomass: Acid and alkaline pretreatments and their effects on biomass recalcitrance - Conventional processing and recent advances. **Bioresource Technology**, v. 304, n. 122848, 2020.

YOUSUF, A.; PIROZZI, D.; SANNINO, F. Lignocellulosic biomass to liquid biofuels. **Academic Press**, 2019. 334p.

YU, Hailong; YOU, Yanzhi; LEI, Fuhou; LIU, Zuguang; ZHANG, Weiming; JIANG, Jianxin. Comparative study of alkaline hydrogen peroxide and organosolv pretreatments of sugarcane bagasse to improve the overall sugar yield. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 187, p. 161-166, jul. 2015.

YUE *et al.* Hydrothermal pretreatment for the production of oligosaccharides: A review. **Bioresource Technology**, v. 343, n. 126075, 2022.

ZHAO, L. *et al.* Advances in pretreatment of lignocellulosic biomass for bioenergy production: Challenges and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 343, n. 126123, 2022.

ZHONG, L. *et al.* Hydrazine hydrate and organosolv synergetic pretreatment of corn stover to enhance enzymatic saccharification and co-production of high-quality antioxidant lignin. **Bioresource Technology**, v. 268, p. 677–683, 2018.