

Artigo

Pré-Tratamento Combinado $H_2SO_4/H_2O_2/NaOH$ para Obtenção das Frações Lignocelulósicas do Bagaço da Cana-de-Açúcar**de Assumpção, S. M. N.;* Pontes, L. A. M.; de Carvalho, L. S.; Campos, L. M. A.; de Andrade, J. C. F.; da Silva, E. G.***Rev. Virtual Quim.*, 2016, 8 (3), 803-822. Data de publicação na Web: 10 de abril de 2016<http://rvq.sbq.org.br>**Pre-Treatment Combined $H_2SO_4/H_2O_2/NaOH$ to Obtain the Lignocellulosic Fractions of Sugarcane Bagasse**

Abstract: The second generation ethanol (E2G) production process using residual lignocellulosic biomass such as bagasse and straw from sugarcane, has stimulated research to the use of different types of pre-treatments that enhance the greater use of cellulose in obtaining the E2G. This process aims to reduce the crystallinity of the cellulose, favoring exposure to enzymatic attack. In this present study, sugarcane bagasse (SCB) was subjected to pre-treatment combined with dilute sulfuric acid 1.45% (v/v), followed by delignification with hydrogen peroxide 7.5% (v/v) and sodium hydroxide 4.0% (v/v). Chemical characterization was performed by high performance liquid chromatography (HPLC), by diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy (DRIFTS), neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF), acid detergent lignin (ADL) and scanning electron microscopy (SEM). The chemical pre-treatment evaluated preserved the cellulosic chain and allowed the removal of 85.8% (m/m) lignin and 70.7% (m/m) hemicellulose. The resulting biomass has mass percentage in cellulose of 39.5 and 45.1 as determined by HPLC techniques and ADF / NDF, respectively.

Keywords: Sugarcane bagasse; combined pre-treatment; second generation ethanol.

Resumo

O processo de produção de etanol de segunda geração (E2G), utilizando biomassas lignocelulósicas residuais, como bagaço e palha da cana de açúcar, vem fomentando a pesquisa para a utilização de diferentes tipos de pré-tratamentos que potencializem o maior aproveitamento da celulose na obtenção do E2G. Este processo visa diminuir a cristalinidade da celulose, favorecendo a exposição ao ataque enzimático. Neste trabalho, o bagaço de cana-de-açúcar (BCA) foi submetido ao pré-tratamento combinado com o ácido sulfúrico diluído 1,45% (v/v), seguido da deslignificação com peróxido de hidrogênio 7,5% (v/v) e hidróxido de sódio 4,0% (v/v). A caracterização química foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), por espectroscopia por reflectância difusa no infravermelho com transformada de Fourier (DRIFTS), fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA), lignina em detergente ácido (LDA) e, por microscopia eletrônica de varredura (MEV). O pré-tratamento químico estudado preservou a cadeia celulósica e permitiu a remoção de 85,8% (m/m) de lignina e 70,7% (m/m) de hemicelulose. A biomassa resultante apresentou porcentagem mássica em celulose de 39,5 e 45,1, determinada pelas técnicas CLAE e FDA/FDN, respectivamente.

Palavras-chave: Bagaço de cana-de-açúcar; pré-tratamento combinado; etanol de segunda geração.

* Universidade Federal da Bahia, Escola Politécnica, Programa de Pós Graduação em Engenharia Química Rua Aristides Novis, nº 2, Federação, CEP40210-630, Salvador-BA, Brasil.

✉ samira.assumpcao@gmail.com

DOI: [10.5935/1984-6835.20160059](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20160059)

Pré-Tratamento Combinado $H_2SO_4/H_2O_2/NaOH$ para Obtenção das Frações Lignocelulósicas do Bagaço da Cana-de-Açúcar

Samira M. N. de Assumpção,^{a,*} Luiz A. M. Pontes,^a Luciene S. de Carvalho,^b Leila M. A. Campos,^a José C. F. de Andrade,^b Etemistocles G. da Silva^b

^a Universidade Federal da Bahia, Escola Politécnica, Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, Rua Aristides, nº 2, Federação, CEP 40210-630, Salvador-BA, Brasil.

^b Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Instituto de Química, Campus Universitário s/n Lagoa Nova, CEP 59078-970, Natal-RN, Brasil.

* samira.assumpcao@gmail.com

Recebido em 21 de agosto de 2015. Aceito para publicação em 9 de abril de 2016

1. Introdução

2. Materiais e Métodos

2.1. Preparação do Bagaço da Cana-de-Açúcar

2.2. Pré-Tratamento Químico

2.3. Métodos de Identificação e Quantificação de Frações Lignocelulósicas

2.4. Caracterização Química por Fibra Detergente Neutro (FDN), Fibra Detergente Ácido (FDA) e Lignina em Detergente Ácido (LDA) do Bagaço *in natura*

2.5. Caracterizações Textural e Química dos Bagaços *in natura* e Pré-Tratado

3. Resultados e Discussão

3.1. Curvas Analíticas e Análise Cromatográfica

3.2. Quantificação das Frações Lignocelulósicas do BCA *in natura* por CLAE e FDA/FDN e Lignina em Detergente Ácido (LDA)

3.3. Quantificação das Frações Lignocelulósicas do Bagaço Pré-Tratado

3.4. Análise por Espectroscopia por Reflectância Difusa no Infravermelho com Transformada de Fourier (DRIFTS)

3.5. Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

4. Conclusões

1. Introdução

A matriz energética brasileira apresenta, atualmente, uma oferta de 42,1% de energia

renovável, em que 15,4% é atribuído aos derivados da cana-de-açúcar.¹ A produção do etanol de primeira geração (E1G), a partir da fermentação do caldo extraído da moagem da cana-de-açúcar, utiliza 1/3 da energia

contida na cana e o restante encontra-se na forma de resíduos agroindustriais, como o bagaço e a palha de cana-de-açúcar. Estes resíduos formam matérias-primas promissoras na produção do etanol de segunda geração (E2G)^{2,3}, pois já fazem parte da cadeia produtiva do E1G,^{3,4} além de terem alto teor de carboidratos. Estes resíduos são utilizados no suprimento energético das usinas através dos processos de cogeração,^{a,5} e servem de matéria-prima para a produção de insumos e diversos produtos destinados às indústrias de química fina, automotivas e de alimentos⁶, tais como compostos furânicos, E2G, biopolímeros, ácido levulínico e ácido succínico.^{6,7}

O uso do E2G visa aumentar o volume do biocombustível, contribuindo com o suprimento do mercado automobilístico interno e a redução na importação. Além disso, é uma oportunidade de aumentar a produtividade do etanol em 40%, sem alterar as áreas de plantio, nem competir com a produção de alimentos.^{7,8}

O bagaço da cana-de-açúcar, como uma fibra vegetal, é constituído majoritariamente por três funções poliméricas: celulose (hexoses), hemicelulose (pentoses), lignina e por compostos de baixo peso molecular como extrativos e cinzas.⁹ Sua estrutura celular é complexa e formada por grupos químicos que se repetem em diferentes ligações carbono-carbono (C-C) e éter (C-O-C), contribuindo para sua elevada recalcitrância, ou seja, resistência aos ataques químicos e microbiano.¹⁰

O reaproveitamento do bagaço na produção do E2G envolve etapas de pré-tratamento, que removem a lignina e hemicelulose, caracterizadas por formarem uma capa protetora natural e, assim, impedir a acessibilidade das enzimas à celulose durante o processo de sacarificação, seguida de etapas de hidrólise e fermentação, responsáveis pela conversão dos açúcares fermentescíveis (glicose) em etanol.^{2,3,11}

^a Cogeração: Processo no qual se dá a geração de energia elétrica pela queima do bagaço

O pré-tratamento é um grande desafio na produção do E2G por influenciar fortemente nas etapas subsequentes e, por isso ainda requer o desenvolvimento de tecnologias eficientes e de baixo custo. O desempenho da técnica a ser utilizada é avaliado em função da máxima exposição da celulose, mínima formação de inibidores de fermentação e baixo consumo de insumos e energia.^{2,3,12} Podem ser classificados em químicos, físicos e biológicos, mas dentre eles, o químico vem sendo o mais estudado em razão da sua viabilidade técnica e econômica. O pré-tratamento químico pode ser ácido, básico ou oxidativo, diferindo pela ação do reagente e pelo mecanismo envolvido na alteração da estrutura celular.^{3,12,13} A combinação de soluções ácidas e básicas favorece o uso de condições amenas de temperatura e pressão, diminuindo os custos de operação.¹⁴ O pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído é o responsável por promover a dissolução de parte da hemicelulose, enquanto uma solução alcalina de peróxido de hidrogênio favorece a remoção da lignina e solubilização da hemicelulose remanescente, podendo extrair também óleos vegetais, proteínas e minerais que compõem a biomassa.^{11,13,15}

O presente trabalho visou avaliar a eficiência do pré-tratamento químico combinado na estrutura recalcitrante da lignocelulose, utilizando, inicialmente, solução de ácido sulfúrico diluído (H₂SO₄) e, em seguida, solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em meio alcalino. A combinação destas soluções no mesmo processo está sendo relatada pela primeira vez, diferindo da literatura especializada.¹⁶⁻¹⁹

O ácido sulfúrico diluído é vantajoso quanto à remoção da fração hemicelulósica, com baixa degradação da celulose,^{16,17} e o hidróxido de sódio^{16,18,19} e o peróxido de hidrogênio^{20,21} apresentam, respectivamente, seletividade para a remoção e oxidação da lignina, reduzindo a formação de resíduos sólidos.^{20,21} Além disso, o pré-tratamento combinado com estes reagentes propiciaram condições operacionais de mais baixa temperatura.

A metodologia utilizada neste trabalho permitiu a otimização das condições de reação vigentes, em relação a literatura especializada,^{20,22,23} e teve como foco a minimização de custos operacionais com redução da temperatura e do tempo de reação. As etapas de caracterização química das frações lignocelulósicas foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) a fim de determinar a composição química do bagaço, assim como fornecer resultados quantitativos das frações mássicas de lignina e hemicelulose removidas durante a etapa de pré-tratamento. As técnicas de fibra detergente ácido (FDA), fibra detergente neutro (FDN) e lignina detergente ácido (LDA) também foram utilizadas para a quantificação dos componentes majoritários do bagaço *in natura*. Em adição, foram realizadas análises por meio da espectroscopia por reflectância difusa no infravermelho com transformada de Fourier (DRIFTS) para a identificação dos grupos funcionais relativos a cada componente do bagaço antes e após a ação química, e microscopia eletrônica de varredura (MEV) para verificação das alterações morfológicas das fibras após o pré-tratamento.

2. Materiais e Métodos

2.1. Preparação do Bagaço da Cana-de-Açúcar

Cem gramas (100 g) de bagaço da cana-de-açúcar (BCA) *in natura* foram lavados em água corrente em ciclos de 12 horas. O material obtido foi seco em estufa Quimis (Q317B252) a 100 °C em ciclos de 3 horas. Este procedimento foi repetido até a estabilização da massa, obtendo-se cerca de 90 g do bagaço *in natura*, medido em balança gravimétrica. Em seguida, o bagaço foi triturado, em um moinho de facas Laboratory MILL-Model 4 e peneirado, utilizando peneiras Série Taylor entre 42-60 mesh.

2.2. Pré-Tratamento Químico

Vinte gramas (20 g) de BCA previamente lavado e seco foram introduzidos em um balão contendo solução de H₂SO₄ 1,45% (v/v) na proporção 1:10 (m/v), à temperatura de 105 °C, durante 75 minutos, sob agitação constante, em evaporador rotativo Fisatom (Modelo 802 D). Em seguida, o bagaço foi transferido para um balão contendo H₂O₂ 7,5% (v/v) com pH 11,5, ajustado com solução de NaOH 4,0% (v/v), na proporção 1:20 (m/v) em evaporador rotativo à temperatura de 80 °C, sob agitação constante, durante 3 horas. Após o término deste procedimento, a fração sólida remanescente foi lavada com água destilada até atingir a neutralidade, e seca em estufa Quimis (Q317B252) à 100 °C até estabilização da massa. Ao final da etapa de pré-tratamento foram obtidos 10 g de bagaço pré-tratado.

2.3. Métodos para Identificação e Quantificação das Frações Lignocelulósicas

As frações do bagaço *in natura* e bagaço pré-tratado foram analisadas quanto ao teor dos carboidratos, lignina, ácidos orgânicos e inibidores de fermentação. A metodologia aplicada é uma adaptação da norma *American Society for Testing Method ASTM-E 1758-01*,²⁴ que quantifica a fração lignina por gravimetria e por espectroscopia UV-Visível. Para as frações de carboidratos, ácidos orgânicos e inibidores, utilizou-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Todas as etapas aplicadas para a separação, identificação e quantificação das frações lignocelulósicas, para o bagaço *in natura* e pré-tratado, estão descritas neste tópico.

2.3.1. Separação das Frações Lignocelulósicas

Dois gramas (2 g) de BCA foi submetido a hidrólise com ácido sulfúrico (H_2SO_4) 72% (v/v) à 45 °C por 7 minutos, em seguida, 275 mL de água destilada foram adicionadas à mistura obtida e, esta foi colocada em autoclave vertical da marca Phoenix modelo AV-300 à 121 °C durante 30 minutos. O material resultante foi submetido a uma filtração simples em papel de filtro qualitativo Whatman nº1. A fração líquida foi utilizada para a quantificação dos carboidratos, inibidores de fermentação, (furfural e 5-hidroximetilfurfural (5HMF)) e lignina solúvel, enquanto a fração sólida foi utilizada para a quantificação do teor da lignina insolúvel e o teor de cinzas.

2.3.1.1. Quantificação da Lignina Insolúvel por Gravimetria

A fração sólida, resultante do procedimento anterior, foi lavada com 2 L de água destilada, transferida para pesa-filtros,

previamente secos e tarados. Para a secagem foi utilizada estufa Quimis (Q317B252) à 105 °C até estabilização da massa. A porcentagem de lignina insolúvel foi obtida pela diferença entre as massas final e inicial, dividida pela massa seca inicial.

2.3.1.2. Quantificação da Lignina Solúvel por UV-visível

Para a determinação do teor da lignina solúvel utilizou-se a fração líquida obtida com a filtração do material hidrolisado. Uma alíquota desta fração foi analisada em espectrofotômetro UV-Vis da Shimadzu, modelo UV-2450, em comprimento de onda de 280 nm. O cálculo da concentração da lignina solúvel foi obtido utilizando as equações 1 e 2, em que o valor adotado para a absorvidade do furfural foi igual a 146,85 $g^{-1}.cm^{-1}$ e, para a do 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) foi de 114 $g^{-1}.cm^{-1}$.²⁵

$$C_{lig} = \frac{(A_{lig\ 280} - A_{pd\ 280})}{\epsilon_{lig}}$$

Equação 1

Onde:

C_{lig} : concentração da lignina solúvel ($g.L^{-1}$);
 A_{lig280} : absorvância da lignina em 280 nm;

A_{pd280} : absorvância do furfural e 5-HMF e;

ϵ_{lig} : absorvância da lignina.

$$A_{pd\ 280} = C_1 \epsilon_1 + C_2 \epsilon_2$$

Equação 2

Onde:

C_1 : concentração do furfural ($g.L^{-1}$); C_2 : concentração do 5-HMF ($g.L^{-1}$); ϵ_1 : absorvância do furfural; ϵ_2 : absorvância do 5-HMF.

2.3.1.3. Quantificação de Carboidratos, Ácidos Orgânicos e Inibidores na Fração Líquida por CLAE

As concentrações (em $g.L^{-1}$) dos

carboidratos, ácidos orgânicos e dos inibidores de fermentação foram obtidas por CLAE, utilizando um equipamento da marca Shimadzu modelo LC-10AD. Para isto foi necessária a obtenção prévia de curvas analíticas, com padrões de açúcares e inibidores. Inicialmente, foi preparada uma mistura de padrões contendo carboidratos (celobiose, glicose, xilose, arabinose) e ácidos orgânicos (ácido acético, ácido glucorônico e ácido fórmico) e, outra mistura dos inibidores de fermentação (furfural e 5-HMF), obtendo-se curvas distintas. Todas as análises foram

feitas em replicatas, e, as concentrações variaram de 0 – 3 g.L⁻¹.

As análises cromatográficas foram realizadas em Laboratório de Controle de Processos Químicos (LADABio) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Paulo. A quantificação dos carboidratos e ácidos orgânicos presentes no bagaço foi realizada com uma coluna de separação Aminex HPX 87H (BioRad), solução de ácido sulfúrico 0,005 mol.L⁻¹ como fase móvel, fluxo de 0,6 mL.min⁻¹, temperatura do forno em 45 °C e, detector de índice de refração (RID-10), marca Shimadzu, modelo LC-10AD. Para a análise dos inibidores de fermentação, a fase móvel foi constituída de solução de

acetonitrila e água ultrapura, na proporção de 1:8 com coluna C-18 da Waters. Foram utilizados fluxo de 0,8 mL.min⁻¹, temperatura ambiente, tempo de corrida de 10 minutos e detector de UV (SPD-10AV) a 274 nm.

2.3.2. Cálculo da Perda Mássica dos Componentes

Os cálculos para avaliação da solubilidade ou perda mássica de cada componente no bagaço de cana de açúcar (BCA), após o pré-tratamento, foram realizados através da Equação 3.

$$S = \left(1 - \left(\frac{m_p \times y_p}{m_i \times y_i} \right) \right) \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

S: solubilidade do componente; m_p : massa do BCA pré-tratado seco (g); y_p : composição mássica do componente no BCA pré-tratado; m_i : massa do BCA *in natura* seco (g); y_i : composição do componente no BCA *in natura*.

2.4. Caracterização Química por Fibra Detergente Neutro (FDN), Fibra Detergente Ácido (FDA) e Lignina em Detergente Ácido (LDA) do Bagaço *in natura*

Primeiramente, o bagaço foi triturado e teve sua granulometria reduzida a 0,5 mm. Em seguida, 0,55 g de bagaço (em triplicata) foram pesados em saquinhos (porta-amostras) confeccionados em TNT (tecido não tecido), os quais foram posteriormente lacrados.

Os porta-amostras foram introduzidos em um equipamento da marca ANKON e submetidos ao procedimento de lavagem com detergente neutro (FDN) a fim de realizar a remoção (solubilização) de

pectinas, proteínas, açúcares e lipídeos, resultando em um resíduo fibroso constituído essencialmente de celulose, hemicelulose e lignina. Tal processo ocorreu em um sistema fechado e sob agitação constante durante 1 hora, à temperatura de 100 °C. Transcorrido o tempo necessário, a solução de FDN foi removida e adicionada água destilada (2 L), na temperatura de 90 °C e, durante 5 minutos, os porta-amostras foram lavados por três vezes, substituindo-se a água destilada a cada lavagem. Em seguida, foram retirados, escorridos e deixados imersos em acetona por 5 minutos para remoção da água, e posteriormente secos em estufa à 105 °C durante 12 horas. Finalmente, foram acondicionados em dessecador e pesados, possibilitando a realização dos cálculos com as massas obtidas.

Na etapa seguinte, os porta-amostras foram submetidos à lavagem com detergente ácido (FDA) para quantificação do teor de hemicelulose. O procedimento foi o mesmo utilizado para o detergente neutro (FDN), ocorrendo apenas a substituição do detergente ácido pelo neutro. O cálculo para determinação do teor de hemicelulose consiste na diferença entre a massa inicial

(FDN) e final (FDA).²⁶

Para determinação do teor de lignina (lignina em detergente ácido - LDA), as amostras ainda contidas nos porta-amostras após tratamento com a solução ácida (FDA), devidamente secas e pesadas, foram imersas em uma solução de H₂SO₄ 72% (v/v) à temperatura ambiente, por 3 horas, sofrendo agitação a cada 1 hora. Após o tempo necessário, os porta-amostras foram lavados com água destilada até obtenção de pH neutro e, imersos em béquer de 250 mL, contendo acetona, durante 3 minutos. Na sequência, estes foram retirados do recipiente, colocados em uma bandeja limpa para volatilização da acetona, e logo em seguida secos novamente em estufa à temperatura de 105 °C por 12 horas, depois resfriados em dessecador e pesados. O cálculo para a determinação do teor de lignina é feito através da diferença entre as massas inicial (FDA) e final (após o tratamento com o ácido sulfúrico) e, o resultado, dividido pelo valor correspondente à MS (matéria seca total) pertencente ao BCA, cujo valor final é multiplicado por 100 para a obtenção em porcentagem.

Finalmente, o teor de celulose é obtido pela diferença entre os valores encontrados de FDA e lignina (respectivamente), ambos

em porcentagem.

2.5. Caracterizações Textural e Química dos Bagaços *in natura* e Pré-Tratado

2.5.1. Análise por Espectroscopia por Reflectância Difusa no Infravermelho com Transformada de Fourier (DRIFTS)

A avaliação das alterações na estrutura química do BCA, antes e após o pré-tratamento, foi possível mediante a análise por espectroscopia de reflectância difusa no infravermelho com transformada de Fourier (DRIFTS). Os grupos funcionais predominantes na celulose, lignina e hemicelulose foram identificados mediante conhecimento prévio da estrutura do bagaço adquirida através da revisão da literatura. Os experimentos foram realizados em espectrofotômetro DRS-8000 Shimadzu com registro espectral na região 4000 – 400 cm⁻¹, acumulando 45 leituras com 4 cm⁻¹. No Quadro 1 estão representadas as bandas de absorção típicas para os compostos lignocelulósicos.

Quadro 1. Atribuições típicas em materiais lignocelulósicos por DRIFTS²⁷

Faixa de absorção (cm ⁻¹)	Grupos Funcionais	Atribuição
3640-3200	Hidroxilas (OH) de álcoois, fenóis e ácidos carboxílicos	Lignina e celulose
3000-2840	CH ₂ e CH ₃ de grupos alquil, alifáticos e aromáticos	Extrativos e celulose
1870-1540	Carbonilas (C=O) de cetonas, ácidos carboxílicos e de grupos acetil	Hemicelulose
1610-1516	(C=C) de anéis aromáticos	Lignina
1420-1330	Hidroxilas (OH) de fenóis	Lignina e carboidratos
1400-1200	Hidroxilas (OH) de fenóis e (C-O-C) em aril-alkil-éter	Hemicelulose e lignina
1150-1085	(C-O-C) em anel de piranose	Lignina
900-675	(C-H) em anéis aromáticos	Lignina

2.5.2. Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura foi útil na análise das alterações morfológicas sofridas pelo bagaço da cana-de-açúcar antes e após as etapas de pré-tratamento. As análises foram realizadas no Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - Fundação Oswald Cruz (FIOCRUZ) em Microscópio Eletrônico modelo Denton Vacuum LLC Desk IV. Inicialmente, as amostras foram metalizadas com 10 mm de ouro em atmosfera de argônio por 300 segundos, com vácuo de aproximadamente 10^{-6} Torr em equipamento Jeol JSM-6390 1.0 com tensão de 12 kv, produzindo fótons de 4.500 keV. O ângulo de incidência foi de aproximadamente 38 deg e ampliação de 500 vezes.

3. Resultados e Discussão

3.1. Curvas Analíticas e Análise Cromatográfica

As curvas analíticas utilizadas para a quantificação dos componentes das frações lignocelulósicas, por CLAE, estão apresentadas na Figura 1. Nas Figuras 1A e 1B encontram-se as curvas dos açúcares e ácidos orgânicos, e em 1C, dos inibidores. Na

Tabela 1 encontram-se as equações das curvas obtidas e os coeficientes de determinação (R^2), que apresentaram valores próximos de um (1), indicando ser satisfatória a linearidade dos gráficos. As equações obtidas foram utilizadas para a quantificação dos componentes do bagaço de cana, por CLAE, conforme cromatograma mostrado na Figura 2.

Na Figura 2, estão apresentados os cromatogramas obtidos na quantificação de açúcares e ácidos orgânicos, respectivamente, para os bagaços de cana-de-açúcar *in natura*, Figura 2A, e pré-tratado, Figura 2B. Em ambas os cromatogramas, pode-se observar que a glicose e a xilose apresentaram os picos de maior área, sendo estes açúcares os que possuem maior relevância, uma vez que a glicose é representativa da fração celulósica, e a xilose é predominante na lignocelulose.

O ácido acético, ácido glucurônico e a celobiose não foram quantificados, conforme mostrado no cromatograma, Figura 2 e Tabela 2, pois as concentrações destes compostos estão abaixo do limite de quantificação do equipamento.

Na Figura 3, estão apresentados os cromatogramas obtidos para os inibidores, HMF e furfural, utilizando a técnica CLAE, para os bagaços de cana-de-açúcar *in natura*, Figura 3A, e pré-tratado, Figura 3B, conforme metodologia descrita no item 2.3.1.3.

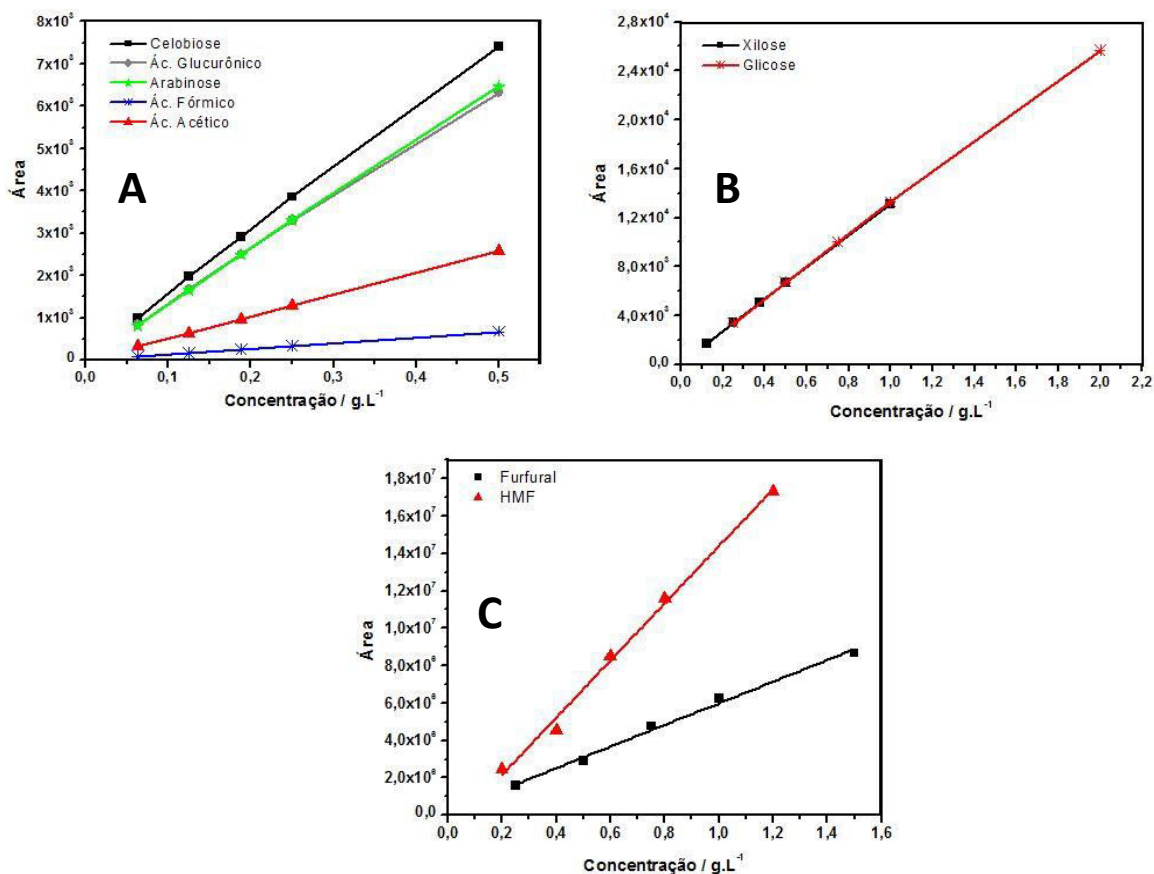


Figura 1. Curvas analíticas para quantificação dos carboidratos, ácidos orgânicos e inibidores obtidas por CLAE

Tabela 1. Equações das curvas analíticas e respectivos coeficientes de determinação (R^2) para cada componente obtido por CLAE

Composto	Equação da Reta ($y = ax + b$)	Coefficiente de determinação (R^2)
Celobiose	$Y = 14610,56x + 135,18$	0,9993
Ácido glucurônico	$Y = 12484,69x + 112,75$	0,9992
Glicose	$Y = 12704,26x + 377,67$	0,9996
Xilose	$Y = 13031,74x + 140,34$	0,9997
Arabinose	$Y = 12933,52x + 31,77$	0,9997
Ácido Fórmico	$Y = 1352,36x - 6,21$	0,9999
Ácido Acético	$Y = 5179,78x - 8,57$	0,9999
Furfural	$Y = 5,78 \cdot 10^6 x + 2,1 \cdot 10^5$	0,9914
5-HMF	$Y = 1,53 \cdot 10^7 x - 8,91 \cdot 10^5$	0,9932

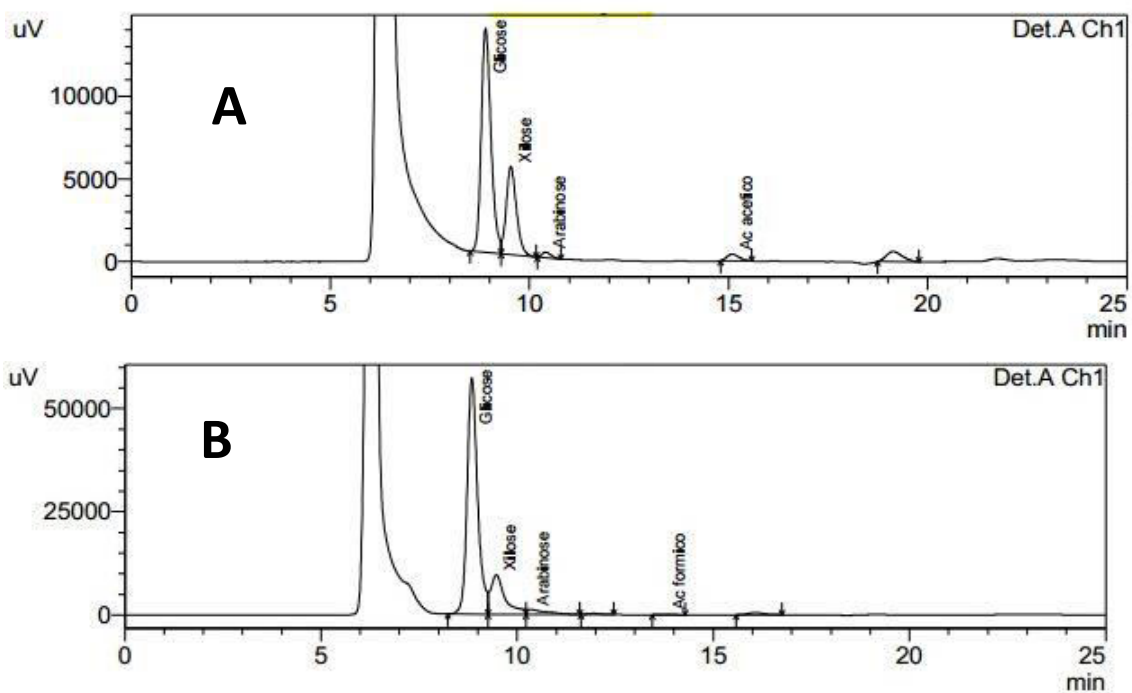


Figura 2. Cromatogramas obtidos da análise de açúcares e ácidos do bagaço de cana (A) *in natura* e (B) pré-tratado, por CLAE

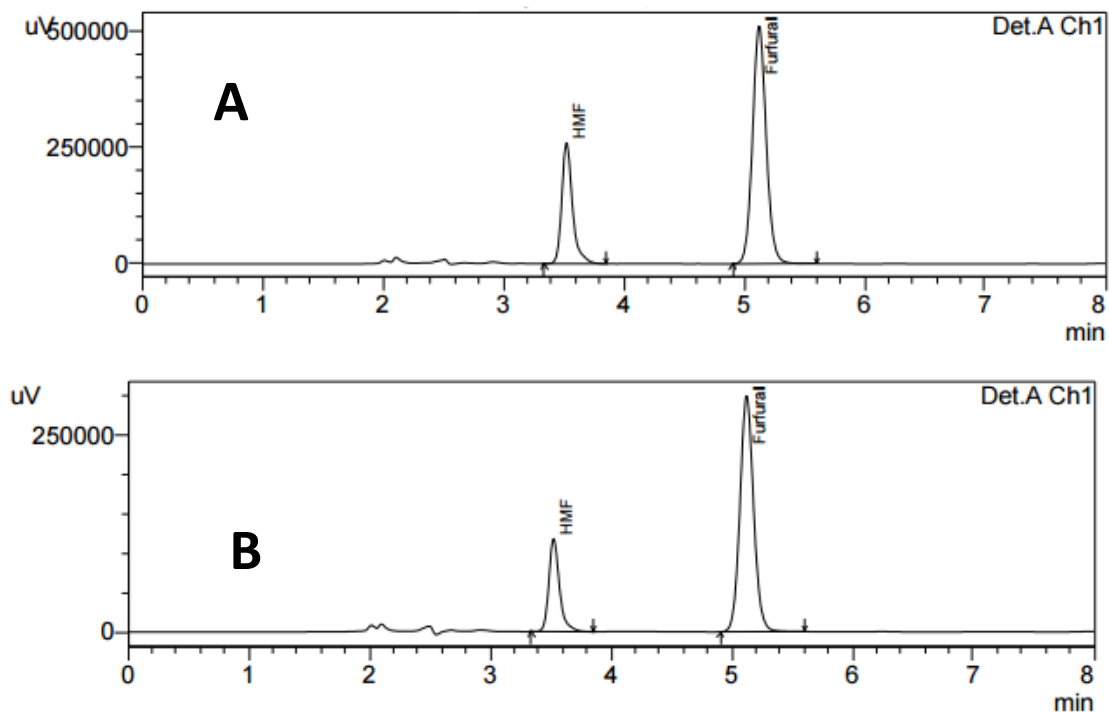


Figura 3. Cromatogramas obtidos da análise de inibidores do bagaço de cana (A) *in natura* e (B) pré-tratado, por CLAE

Verificou-se que as concentrações de inibidores no bagaço são praticamente desprezíveis, frente aos açúcares, e que as concentrações destes, no bagaço *in natura*, são maiores que no bagaço pré-tratado, indicando a eficiência do tratamento combinado na retirada destes compostos, o que é relevante, uma vez que estes inibidores

tendem a diminuir a conversão dos açúcares em outros produtos.

Na Tabela 2, estão apresentadas as concentrações dos açúcares, ácidos orgânicos e inibidores, obtidas pela técnica CLAE, para os bagaços *in natura* e pré-tratado, e seus respectivos desvios padrões.

Tabela 2. Concentrações dos carboidratos, ácidos orgânicos e inibidores do BCA *in natura* e pré-tratado obtidas com a técnica CLAE, por padronização externa, e, seus respectivos desvios padrões

Carboidratos e ácidos orgânicos	Concentração (g.L ⁻¹)	
	BCA <i>in natura</i>	BCA pré-tratado
Ácido Acético	0,01 ± 0,02	0,00 ± 0,00
Ácido Fórmico	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Ácido Glucurônico	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Arabinose	0,00 ± 0,01	0,04 ± 0,04
Celobiose	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Glicose	1,32 ± 0,30	3,93 ± 0,60
Xilose	0,24 ± 0,09	0,91 ± 0,18
Furfural	0,01 ± 0,01	0,00 ± 0,00
5-HMF	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01

N = 3, número de replicatas.

A partir dos resultados apresentados na Tabela 2 é possível afirmar que o pré-tratamento utilizado neste trabalho foi eficiente em relação à disponibilização da fração celulósica, uma vez que houve um aumento no teor de açúcares, glicose e xilose, quantificado pela técnica CLAE, em relação ao bagaço *in natura*.

3.2. Quantificação das Frações Lignocelulósicas do BCA *in natura* por CLAE e FDA/FDN e Lignina em Detergente Ácido (LDA)

O estudo dos efeitos produzidos pela etapa de pré-tratamento sobre a estrutura

lignocelulósica só foi possível após a quantificação prévia dos compostos majoritários (celulose, hemicelulose e lignina) do bagaço *in natura*, conforme Tabela 3. Os resultados de composição mássica do BCA *in natura* com a técnica CLAE foram obtidos a partir dos dados apresentados na Tabela 2, expressos em concentração (g.L⁻¹), e convertidos em composição mássica percentual, de acordo com a literatura especializada²⁵, e estão mostrados na Tabela 3.

A técnica FDA/FDN, que emprega o método idealizado por Van Soest²⁸, considera que os constituintes das plantas podem ser divididos em conteúdo celular (lipídios, compostos nitrogenados, gorduras, amido, e

outros compostos solúveis em água) e parede celular (proteína insolúvel, hemicelulose, celulose e lignina). Este método faz uso de soluções detergentes para solubilizar o conteúdo celular e/ou hemicelulose, tendo como resíduo a fibra em detergente. Tais soluções são divididas em dois tipos: detergente neutro e detergente ácido. Utilizando-se a solução de detergente neutro solubiliza-se o conteúdo celular, restando o conteúdo insolúvel (hemicelulose, celulose e lignina), chamado então de fibra em detergente neutro (FDN). A extração com o detergente ácido, feita de forma similar a com detergente neutro, solubiliza o conteúdo celular remanescente e a hemicelulose, restando celulose e lignina. Esta extração é usada para estimar a quantidade de hemicelulose, a partir da diferença entre FDN e FDA, respectivamente, e ao mesmo tempo trata-se de uma análise preparatória para determinação de celulose e lignina, chamando-se então este resíduo final de fibra em detergente ácido (FDA).

Para a determinação da lignina em detergente ácido (LDA) foi empregada uma solução de H_2SO_4 72%. É importante ressaltar que o detergente ácido é capaz de remover proteínas e outros materiais solúveis neste meio que possam interferir na determinação da lignina. Desta forma, parte-se do princípio que a fibra FDA seja composta apenas de lignina e celulose, sendo esta última dissolvida pela solução de H_2SO_4 72% na etapa de isolamento da lignina para sua quantificação. Porém, amostras que apresentam altos teores de material inorgânico (cinzas insolúveis) e outros materiais, como a cutina^b, terão seus percentuais contabilizados dentro do teor de lignina,²⁹ uma vez que são de difícil remoção e não são solubilizados pelo detergente ácido nem pelo detergente neutro. Encontrado o percentual de lignina, foi possível quantificar o teor de celulose a partir da diferença entre

^b Cutina: polímero formado por muitos ácidos de cadeia longa unidos por ligações éster. A cutina está localizada na parede secundária de células vegetais.

o resíduo FDA (composto de celulose mais lignina) e o teor de lignina encontrado anteriormente. Os materiais indesejáveis não removidos durante a realização da análise FDN e/ou FDA foram contabilizados nas determinações subsequentes de hemicelulose, lignina e celulose. Por este motivo, os valores do teor destas substâncias apresentaram variações quando comparados aos valores obtidos por outras técnicas, como pode ser verificado na Tabela 3.

Para os componentes majoritários da biomassa, lignina, hemicelulose e celulose, os valores de composição mássica na técnica CLAE encontram-se bem próximos dos valores reportados na literatura, conforme mostrado da Tabela 3. É importante salientar que o teor de cada componente varia de acordo com as condições de plantio, colheita, armazenamento e da espécie da cana-de-açúcar.

Apesar da análise de fibras realizada através da metodologia FDN e FDA ser caracterizada pelo diferencial de solubilidade dos componentes, pode-se perceber que os resultados foram satisfatórios na quantificação dos componentes majoritários (45,1% de celulose, 22,1% de hemicelulose e 26,1% de lignina) constituintes do BCA, uma vez que estão muito próximos da literatura e dos resultados obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência (39,5% de celulose, 20,5% de hemicelulose e 22,5% de lignina), conforme mostrado na Tabela 3.

3.2.1. Comparativo Entre as Técnicas de Quantificação para a Composição do BCA in natura

A quantificação das frações lignocelulósicas pela técnica do CLAE e do FDA/FDN foram realizadas em triplicatas, logo foi possível o cálculo do desvio padrão para os resultados de composição mássica obtidos. Para o cálculo do desvio padrão foi considerado a média das diferenças entre o valor de cada evento e a média central. Outra

medida dispersiva utilizada neste trabalho foi o erro relativo entre as composições mássicas do BCA *in natura*. Na Tabela 4 estão mostrados os valores de desvio padrão obtidos para cada técnica avaliada neste trabalho, assim como o erro relativo entre elas. Os erros relativos para a composição mássica das frações lignocelulósicas referem-

se à diferença entre os valores de composições mássicas obtidas por cada técnica, dividido pela composição de cada fração, obtida pelo CLAE. Neste cálculo tomou-se como referência a composição mássica obtida pelo CLAE, por ser uma técnica que apresenta menor erro.

Tabela 3. Composição mássica dos constituintes do BCA *in natura* relatados na literatura e obtidos neste trabalho

Fonte	Componentes (%)				Técnica utilizada
	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Outros (%)	
Gómez <i>et al</i> ¹⁷	37,3	23,6	25,1	13,9	CLAE
Rabelo <i>et al</i> ²¹	39,6	23,9	25,8	10,8	CLAE
Arruda ³⁰	43,1	28,6	20,8	7,5	CLAE
Esteves ³¹	37,7	25,9	21,0	15,4	CLAE
Carvalho ³²	38,8	29,4	21,7	10,1	CLAE
Fonseca ³³	39,4	32,7	20,8	7,1	CLAE
Fuentes ³⁴	37,4	23,7	25,1	13,9	CLAE
Gomes <i>et al</i> ³⁵	40,5	28,9	10,7	19,9	FDA/FDN
Neste trabalho*	39,5	20,5	22,5	17,5	CLAE
Neste trabalho**	45,1	22,1	26,1	6,7	FDA/FDN

*composição obtida por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE;

**composição obtida por meio de metodologia de análise de fibras, FDA e FDN.

Tabela 4. Erro relativo entre as análises deste trabalho

Técnica	Composição BCA <i>in natura</i> (%)		
	Celulose	Hemicelulose	Lignina
CLAE	39,5 ± 0,7	20,5 ± 1,0	22,5 ± 0,3
FDA/FDN	45,1 ± 2,1	22,1 ± 2,5	26,1 ± 2,4
Erro relativo	14,3%	8,0%	15,8%

De modo comparativo, e considerando os resultados obtidos por CLAE como referência, utilizando a metodologia que segue a norma ASTM E1758-01²⁴, infere-se que o percentual de erro entre as técnicas utilizadas, FDA/FDN e CLAE, encontra-se na ordem de 15%. Além disso, verifica-se menor desvio padrão na composição das amostras obtida com a CLAE, o que permite maior confiabilidade dos resultados.

As análises FDA/FDN são muito utilizadas nos estudos de fibras alimentares, visando à

investigação nutricional de biomassas para os ruminantes. Os resultados obtidos com esta técnica, considerada de baixo custo, podem apresentar maiores desvios quanto ao conteúdo da parede celular, uma vez que é susceptível a retenção de proteínas, pectinas^c e taninos^d, devido ao não fracionamento total dos constituintes da parede celular com o detergente neutro. Além disso, é limitante quanto ao teor da fração hemicelulósica real presente no material em virtude da solubilização incompleta da hemicelulose com o tratamento com detergente ácido. Por

se tratar de uma técnica gravimétrica, podem ocorrer erros grosseiros no que se refere à manipulação excessiva dos analistas, tomada de alíquotas e erros de pesagem, que diminuem a precisão dos resultados. Em contrapartida, a cromatografia líquida de alta eficiência, por se tratar de uma técnica cujo equipamento é automatizado requerendo menor intervenção do analista, é caracterizada pela grande precisão e elevada eficiência na separação dos compostos com uma alta resolução, entretanto apresenta custo elevado.

3.3. Quantificação das Frações Lignocelulósicas do BCA Pré-Tratado

Na Tabela 5 estão apresentados os dados comparativos da composição química do

bagaço *in natura* e do bagaço pré-tratado obtidos por CLAE, conforme ASTM E1758-01.²⁴ Ressalta-se que os valores referentes aos ácidos orgânicos, furfural e 5-hidroximetilfurfural já estão incorporados na composição da celulose e hemicelulose, uma vez que são provenientes da degradação destes carboidratos. É possível notar um aumento da concentração, percentual mássica, da celulose no bagaço pré-tratado, em virtude da remoção das frações de lignina e hemicelulose. Essa resposta é positiva por tornar a celulose mais disponível para etapas posteriores de sacarificação.

Com a Equação 3 mencionada no item 2.3.2, calculou-se a perda mássica (solubilidade) de cada componente do bagaço antes e após o pré-tratamento, dispostos na Tabela 6.

Tabela 5. Composição percentual mássica do BCA *in natura* e pré-tratado obtido por CLAE

Componentes do bagaço	Composição mássica (%)		
	BCA <i>in natura</i>	BCA após o pré-tratamento ácido	BCA após o pré-tratamento ácido e alcalino combinado
Celulose	39,5	46,2	67,8
Hemicelulose	20,5	13,1	12,5
Lignina	22,5	24,7	6,6
Outros	17,5	16,0	13,1

Tabela 6. Solubilização mássica (%) dos componentes majoritários do bagaço após os pré-tratamentos ácido, e ácido e alcalino combinado

Componentes	BCA após o Pré-tratamento ácido	BCA após o pré-tratamento ácido e alcalino combinado
Celulose	5,6	17,5
Hemicelulose	48,3	70,7
Lignina	13,4	85,8

Conforme pode ser observado nas Tabelas 5 e 6, houve um enriquecimento do teor de celulose em 67,8% (m/m) em relação à biomassa *in natura*, com significativa solubilização de 70,7% (m/m) da hemicelulose e, 85,8% (m/m) da lignina. A remoção de pelo menos 50% da hemicelulose já é suficiente para aumentar sensivelmente a eficiência da etapa da hidrólise enzimática.¹⁰ Na Tabela 6, observa-se que o pré-tratamento com solução ácida apresentou uma maior seletividade quanto a remoção da hemicelulose, conforme indicado por Alvira *et al.*¹⁶ e Carvalho *et al.*³⁶ Além disso, é possível verificar que a perda mássica de celulose foi 17,5%, após o pré-tratamento combinado. Nada *et al.*¹⁴ relata que a celulose é composta por uma fase 15% amorfa que é mais facilmente hidrolisada e solubilizada. A perda mássica sinalizada neste estudo aponta que a fase amorfa da celulose foi degradada com a ação do pré-tratamento combinado.

A perda mássica da lignina, por sua vez, foi bastante expressiva. Os fenóis, derivados da lignina, inibem a ação de micro-organismos nas etapas de hidrólise e fermentação. Logo, a redução da lignina é positiva e indica que a biomassa pré-tratada está mais adequada para a produção de E2G. Os principais derivados da lignina são o ácido 4-hidroxibenzoico, vanilina, catecol e o seringaldeído, ácido vanílico e ácido ferúlico.³⁷

Na literatura foram encontrados trabalhos que estudaram o pré-tratamento combinado

de materiais lignocelulósicos, Wang *et al.*³⁸, ao realizar o pré-tratamento combinado do bagaço com ácido fosfórico seguido de solução de peróxido de hidrogênio alcalino, obtiveram uma perda mássica em celulose de 29% (m/m), com solubilização mássica de 74,4% de hemicelulose e 76,4% de lignina. Rezende *et al.*³⁹ estudaram o pré-tratamento do bagaço da cana com o ácido sulfúrico diluído seguido do uso de solução de hidróxido de sódio, resultando na remoção mássica de 85% de lignina e 96% hemicelulose e, degradação de 30% (m/m) da celulose. Kim e Kim⁴⁰ obtiveram uma deslignificação de 70% (m/m) e remoção de 83% (m/m) de hemicelulose, ao pré-tratar a fibra de palma com ácido sulfúrico diluído, seguido de solução de hidróxido de sódio. Chen *et al.*⁴¹ ao pré-tratar o BCA com o peróxido de hidrogênio seguido de explosão a vapor, conseguiram solubilizar 60,9% (m/m) da hemicelulose e remover 75,7% (m/m) da lignina. Estes resultados permitem comprovar que os percentuais obtidos neste trabalho são bastante promissores para o pré-tratamento de materiais lignocelulósicos, em particular, o bagaço da cana-de-açúcar.

3.4. Análise por Espectroscopia por Reflectância Difusa no Infravermelho com Transformada de Fourier (DRIFTS)

As análises realizadas por DRIFTS possibilitaram a observação das alterações estruturais, conforme mostrado na Figura 4.

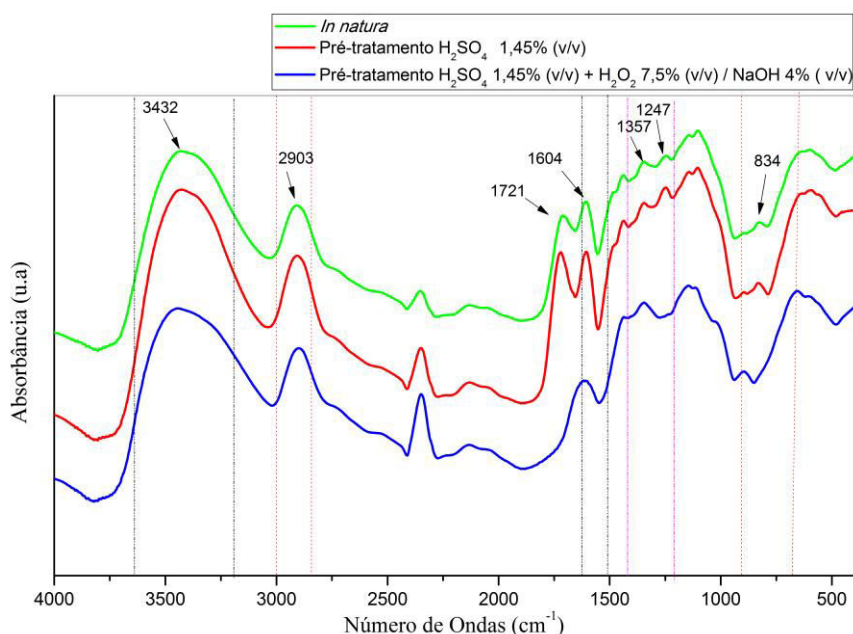


Figura 4. Espectros do DRIFTS das amostras de bagaço *in natura* e pré-tratadas

Na Figura 4, que apresenta os espectros do BCA *in natura*, pré-tratado com H_2SO_4 e pré-tratado combinado ($\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2/\text{NaOH}$), é perceptível a existência de bandas que podem ser atribuídas aos componentes majoritários da biomassa. A celulose é representada por duas bandas específicas, sendo a primeira, em 3432 cm^{-1} pela vibração dos grupos hidroxila (OH) dos álcoois, fenóis e ácidos carboxílicos, e a segunda, em 2903 cm^{-1} referente às vibrações dos grupos metil (CH_3) e metileno (CH_2), em compostos alifáticos.^{27,30} Em ambas regiões ficou evidenciada uma perda pouco significativa deste componente no bagaço pré-tratado. Este comportamento ratifica os resultados anteriores da baixa solubilização da celulose, preservando assim a fração de interesse para a obtenção do E2G a partir da sua hidrólise.

A lignina e a hemicelulose podem ser observadas nas demais bandas apontadas nos espectros. Os grupos funcionais presentes na cadeia hemicelulósica são representados pelos picos em 1721 cm^{-1} que se referem ao estiramento das carbonilas (C=O) provenientes de vibrações de ácidos carboxílicos e cetonas e, em 1247 cm^{-1} , característico do estiramento simétrico da

ligação (C-O-C) da lignina. Zhao *et al.*,⁴² em estudo similar, também indicou as bandas supracitadas referentes à hemicelulose.

A alteração estrutural da lignina, por sua vez, é evidenciada em 1604 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação (C=C) do anel aromático e, em 1357 cm^{-1} , atribuída a vibração da deformação angular de hidroxilas (OH) ligadas a grupos fenólicos. Outra evidência da presença da lignina refere-se à banda em 834 cm^{-1} relativa à vibração de deformação de ligações do tipo carbono-hidrogênio (C-H) provenientes de compostos aromáticos.²⁷ As atribuições destas bandas espectrais também foram citadas por Yang *et al.*⁴³ Com os espectros apresentados, observa-se nestas cinco últimas bandas uma redução do sinal analítico no bagaço pré-tratado quando comparado ao bagaço *in natura*. Os resultados confirmam que houve a remoção de frações de lignina e hemicelulose no bagaço após o pré-tratamento.

3.5. Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O pré-tratamento do bagaço promove alterações morfológicas que garantem a menor cristalinidade da celulose, com consequente aumento da acessibilidade das

enzimas na hidrólise. A Figura 5 apresenta as imagens obtidas com a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das amostras de bagaço *in natura* (5A), após o pré-tratamento ácido (5B) e, após o pré-tratamento com ácido e alcalino combinado (5C).

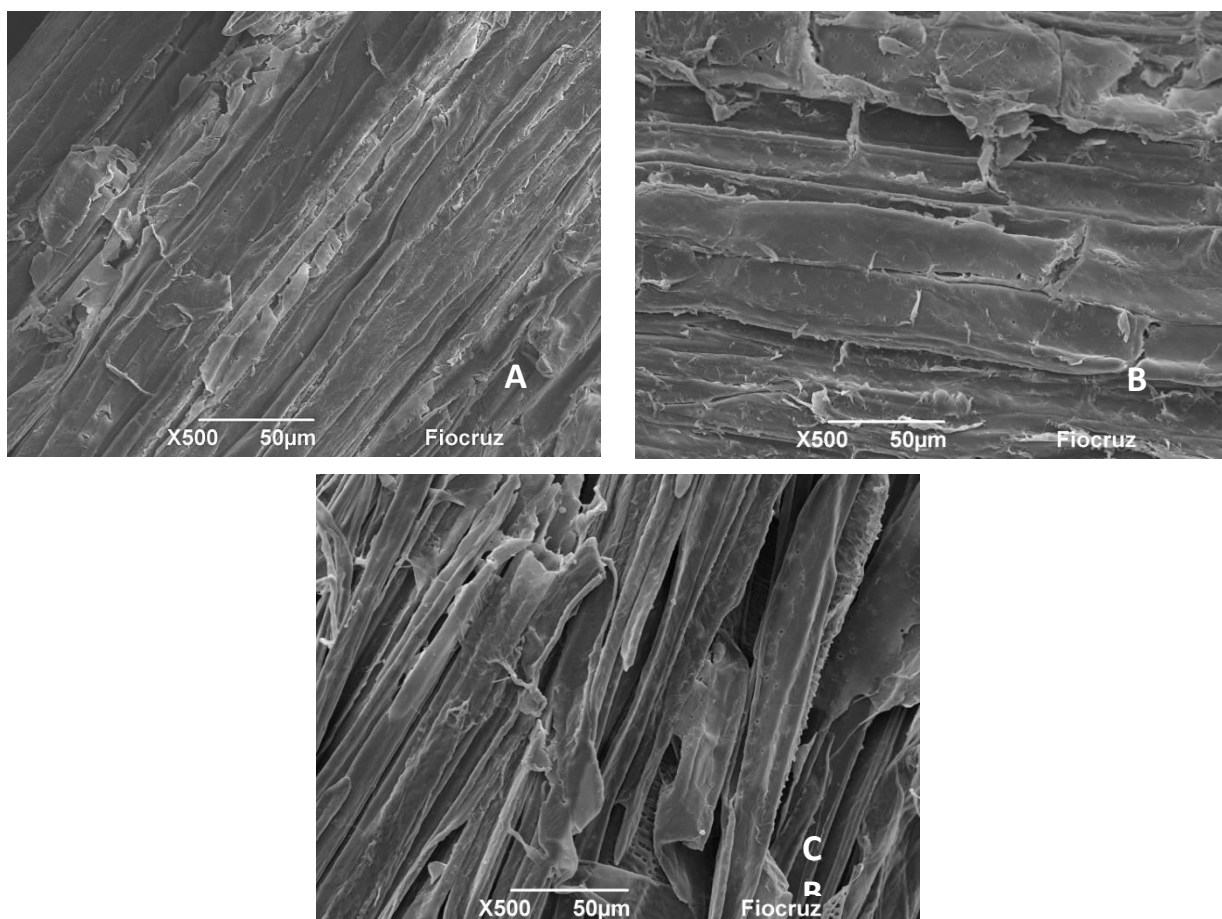


Figura 5. Micrografia Eletrônica de Varredura (MEV) das amostras de bagaço da cana (A) sem pré-tratamento (*in natura*), (B) pré-tratamento com solução de ácido sulfúrico e (C) pré-tratamento com ácido sulfúrico e peróxido de hidrogênio em meio alcalino

Observa-se na Figura 5A, uma estrutura vegetal bem organizada com fibras lisas, compactas e sem nenhuma ruptura, características do bagaço sem o pré-tratamento. Isso ocorre devido a presença da camada protetora formada pela lignina e hemicelulose. O bagaço submetido ao pré-tratamento com ácido sulfúrico (Figura 5B) não apresentou alterações morfológicas significativas, apenas formação de fissuras na superfície. Após o pré-tratamento ácido e

alcalino combinado, Figura 5C, verificou-se a ocorrência de dois tipos de eventos: a abertura de fendas ou canais, e a formação de uma parede celular estratificada. Para Rezende *et al.*,³⁹ as várias camadas formadas indicam uma fibra com maior área superficial, enquanto as fendas caracterizam uma maior porosidade da fibra.

A partir destas micrografias infere-se que o pré-tratamento contribuiu para maior

desorganização física das fibras, resultando assim em uma maior acessibilidade para as enzimas durante a hidrólise enzimática na obtenção do E2G.

4. Conclusões

O pré-tratamento com ácido sulfúrico combinado com peróxido de hidrogênio em meio alcalino foi bem sucedido. A novidade deste trabalho consiste na ação dos três reagentes em conjunto, que resultou em uma fração rica em celulose, com remoção significativa da lignina e hemicelulose, caracterizadas por serem estruturas recalcitrantes e prejudiciais à etapa de hidrólise enzimática da celulose na produção do etanol de segunda geração. Portanto, a combinação de soluções ácidas e alcalinas permitiu maior acessibilidade à celulose em um pré-tratamento sob condições amenas de concentração de reagentes, reduzindo assim os custos de produção.

As limitações quanto ao fracionamento dos constituintes da parede celular do material lignocelulósico, assim como, a possibilidade da solubilização parcial da cadeia hemicelulósica durante a análise composicional do BCA por meio da análise de fibras (FDN e FDA), são justificativas pertinentes para os valores encontrados não estarem tão exatos quando comparados com outras técnicas de determinação composicional. Porém, devido à simplicidade e baixo custo desta análise, frente a outras técnicas, como a cromatográfica líquida de alta eficiência (CLAE), a análise de fibras apresenta grande praticidade, podendo ser utilizada como alternativa à norma ASTM E1758-01, para a quantificação de materiais utilizados para produção do E2G. A técnica CLAE assegura um menor erro na quantificação das frações lignocelulósicas, sendo a técnica mais difundida para esta metodologia.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio das instituições MCT/FINEP, REDE DE COMBUSTÍVEIS, CAPES pelas bolsas, à UFSCar, UFRN, UFBA e CPGM - FIOCRUZ pela caracterização química, e à UNIFACS pela disponibilidade dos laboratórios.

Referências Bibliográficas

- ¹ Sítio do Ministério de Minas e Energia (MME). Disponível em: <http://www.mme.gov.br/web/guest/publicacoes-e-indicadores/pde?_20_displayStyle=descriptiv_e&p_p_id=20>. Acesso em: 5 março 2015.
- ² Raele, R.; Boaventura, J. M. G.; Fischmann, A. A.; Sarturi, G. Scenarios for the second generation ethanol in Brazil. *Technological Forecasting & Social Change* **2014**, *87*, 205. [CrossRef]
- ³ Sousa-Aguiar, E. F.; Appel, L. G.; Zonetti, P. C. Fraga; A. C.; Bicudo, A. A.; Fonseca, I. Some important catalytic challenges in the bioethanol integrated biorrefinery. *Catalysis Today* **2014**, *234*, 13. [CrossRef]
- ⁴ Moraes, B. S.; Zaiat, M.; Bonomi, A. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil: Challenges and perspectives. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2015**, *44*, 888. [CrossRef]
- ⁵ Vaz Júnior, S.; *Estratégias para o uso de biomassa em química renovável*, 1a. Ed., Embrapa Agroenergia: Brasília, 2012. [Link]
- ⁶ Cherubini, F. The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management* **2010**, *51*, 1412. [CrossRef]
- ⁷ Alvim, J. C.; Alvim, F. A. L. S.; Sales, V. H. G.; Sales, P. V. G.; Oliveira, E. M.; Costa, A. C. R. Biorrefinarias: Conceito, classificação e matérias primas e produtos. *Journal of Bioenergy and Food Science* **2014**, *3*, 61. [Link]

- ⁸ Morais, A. P. S.; Broetto, F. Pré-hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar e sua caracterização físico-química. *Energia na Agricultura* **2012**, *27*, 1. [CrossRef]
- ⁹ Santos, F. A.; Queiróz, J. H.; Colodette, J. L.; Fernandes, S. A.; Guimarães, V. M.; Rezende, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. *Química Nova* **2012**, *35*, 1004. [CrossRef]
- ¹⁰ Agbor, V. B.; Cicek, N.; Sparling, R.; Berlin, A.; Levin, D. B. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. *Biotechnology Advances* **2011**, *29*, 675. [CrossRef] [PubMed]
- ¹¹ Assumpção, S. M. N.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal da Bahia, 2015.
- ¹² Chaturvedi, V.; Verma, P. An overview of key pretreatment process employed for bioconversion of lignocellulosic biomass into biofuels and value added process. *3 Biotech* **2013**, *3*, 415. [CrossRef]
- ¹³ Brouder, G.; Yau, E.; Badal, K.; Collier, J.; Ramachandran, K. B.; Ramakrishnan, S. Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: A review. *Enzyme Research* **2011**, *2011*, 1. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁴ Nada, A. A. M. A.; El-Kady, M. Y.; El-Sayed, E. S. A. B.; Amine, F. M. Preparation and characterization of microcrystalline cellulose (MCC). *BioResources* **2009**, *4*, 1359. [Link]
- ¹⁵ Canilha, L.; Chandel, K. A.; Milessi, T. S. S.; Antunes, F. A. F.; Freitas, W. L. C.; Felipe M. G. A.; da Silva, S. S. Bioconversion of Sugarcane Biomass into Ethanol: An overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2012**, *2012*, 1. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁶ Alvira, P.; Tomás-Pejó E.; Ballesteros, M.; Negro, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology* **2010**, *101*, 851. [PubMed]
- ¹⁷ Gómez Sandra, M. R.; Rafael, R. A.; Carlos, G. S.; Costa, A. C.; Marciel Filho, R. Pretreatment of sugar cane bagasse with phosphoric and sulfuric diluted acid for fermentable sugars production by enzymatic hydrolysis. *Chemical Engineering Transactions* **2010**, *20*, 321. [CrossRef]
- ¹⁸ Chandel, A. K.; Antunes, F. A. F.; Anjos, V.; Bell, M. J. V.; Rodrigues, L. N.; Polikarpov, I.; Azevedo, E. R.; Bernardinelli, O. D.; Rosa, C. A.; Pagnocca, F. C.; Silva, S. S. Multi-scale structural and chemical analysis of sugarcane bagasse in the process of sequential acid-base pretreatment and ethanol production by *Scheffersomyces shehatae* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels* **2014**, *7*, 1. [Link]
- ¹⁹ Ramadoss, G.; Muthukumar, K. Influence of dual salt on the pretreatment of sugarcane bagasse with hydrogen peroxide for bioethanol production. *Chemical Engineering Journal* **2015**, *260*, 178. [CrossRef]
- ²⁰ Su, Y.; Du, R.; Guo, H.; Cao, M.; Wu, Q.; Su, R.; Qi, W.; He, Z. Fractional pretreatment of lignocellulose by alkaline hydrogen peroxide: Characterization of its major components. *Food and Bioprocess Processing* **2015**, *94*, 322. [CrossRef]
- ²¹ Rabelo, S. C.; Andrade, R. R.; Maciel Filho, R.; Costa, A. C. Alkaline hydrogen peroxide pretreatment, enzymatic hydrolysis and fermentation of sugarcane bagasse to ethanol. *Fuel* **2014**, *136*, 349. [CrossRef]
- ²² Terán-Hilares, R.; Reséndiz, A. L.; Martínez, R. T.; Silva, S. S.; Santos, J. C. Successive pretreatment and enzymatic saccharification of sugarcane bagasse in a packed bed flow-through column reactor aiming to support biorefineries. *Bioresource Technology* **2016**, *203*, 42. [CrossRef]
- ²³ Bluhm, K.; Heger, S.; Agler, M. T.; Maletz, S.; Schäffer, A.; Seiler, T. B.; Angenent, L. T.; Hollert, H. In *Assessment of the Ecotoxicological and Environmental Effects of Biorefineries, in The Role of Green Chemistry in Biomass Processing and Conversion*; Xie, H.; Gathergood, N., eds.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, 2012, Cap. 15.
- ²⁴ American Society for testing and Materials Method. ASTM E1758-01: Standard Test Method for Determination of Carbohydrates in Biomass by High Performance Liquid Chromatography. Current edition approved June 1, 2015. Published July 2015. Originally approved in 1995. Last previous edition

- approved in 2007 as E1758–01(2007). West Conshohocken, 2015. [\[Link\]](#)
- ²⁵ Gouveia, E. R.; Nascimento, R. T.; Souto-Maior, A. M. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. *Química Nova* **2009**, *32*, 1500. [\[CrossRef\]](#)
- ²⁶ Silva, V. L.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2014. [\[Link\]](#)
- ²⁷ Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; Kiemle, D. J.; *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*, 7a. ed., LTC: Rio de Janeiro, 2007.
- ²⁸ Van Soest, P. J. Development of a comprehensive system of feed analysis and its application to forages. *Journal of Animal Science* **1967**, *26*, 119. [\[Link\]](#)
- ²⁹ Rodrigues, R. C. Métodos de análises bromatológicas de alimentos: métodos físicos, químicos e bromatológicos. 1a Ed., Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010. [\[Link\]](#)
- ³⁰ Arruda, P. V.; *Tese de Doutorado*, Universidade de São Paulo, 2011. [\[Link\]](#)
- ³¹ Esteves, P. J.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, 2011. [\[Link\]](#)
- ³² Carvalho, M. L.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de São Carlos, 2011. [\[Link\]](#)
- ³³ Fonseca, C. R.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, 2011. [\[Link\]](#)
- ³⁴ Fuentes, L. L. G.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Estadual de Campinas, 2009. [\[Link\]](#)
- ³⁵ Gomes, G. M. F.; Vasconcelos, A. M.; Egito, A. S.; Lima, A. R.; Carneiro, J. C.; Landim, A. V.; Fonteles, N. L. O.; Salles, H. O. Degradabilidade in situ do bagaço de cana-de-açúcar para pequenos ruminantes de raças naturalizadas do Nordeste brasileiro. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* **2013**, *65*, 1792. [\[CrossRef\]](#)
- ³⁶ Carvalho, de D. M.; Sevastyanova, O.; Penna, L. S.; da Silva, B. P.; Lindstrom, M. E.; Colodette, J. L. Assessment of chemical transformation in eucalyptus, sugarcane bagasse and straw during hydrothermal, dilute acid, and alkaline pretreatments. *Industrial Crops and Products* **2015**, *73*, 118. [\[CrossRef\]](#)
- ³⁷ Palmqvist, E.; Hågerdal, H. B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *BioResources Technology* **2000**, *74*, 25. [\[CrossRef\]](#)
- ³⁸ Wang, Q.; Wang, Z.; Shein, F.; HU, J.; Sun, F.; Lili, L.; Yang, G.; Zhang, Y.; Deng, S. Pretreating lignocellulosic biomass by the concentrated phosphoric acid plus hydrogen peroxide (PHP) for enzymatic hydrolysis: Evaluating the pretreatment flexibility on feedstocks and particle sizes. *Bioresource Technology* **2014**, *166*, 420. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ³⁹ Rezende, C. A.; Lima, M. A.; Maziero, P.; Azevedo, E. R.; Garcia, W.; Polikarpov, I. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to delignification process for enhanced enzymatic digestibility. *Biotechnology for Biofuels* **2011**, *4*, 54. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ⁴⁰ Kim, S.; Kim, C. H. Bioethanol production using the sequential acid/alkali-pretreated empty palm fruit bunch fiber. *Renewable Energy* **2013**, *54*, 150. [\[CrossRef\]](#)
- ⁴¹ Chen, H.; Han, Y.; Xu, J. Simultaneous saccharification and fermentation of steam exploded wheat straw pretreated with alkaline peroxide. *Process Biochemistry* **2008**, *43*, 1462. [\[Link\]](#)
- ⁴² Zhao, X.; Heide, E. V. D.; Zhang, T.; Liu, D. Delignification of sugarcane bagasse with alkali and peracetic acid and characterization of the pulp. *BioResources* **2010**, *5*, 1565. [\[Link\]](#)
- ⁴³ Yang, H.; Yan, R.; Chen, H.; Lee, H. D.; Zheng, C. Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis. *Fuel* **2007**, *86*, 1781. [\[Link\]](#)