

EFEITO DO TEOR DE UMIDADE SOBRE O PRÉ-TRATAMENTO A VAPOR E A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Ana Paula Pitarelo, Thiago Alexandre da Silva, Patricio Guillermo Peralta-Zamora e Luiz Pereira Ramos*

Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, CP 19081, 81531-980 Curitiba - PR, Brasil

Recebido em 11/8/11; aceito em 13/4/12; publicado na web em 20/7/2012

EFFECT OF MOISTURE CONTENT IN THE STEAM TREATMENT AND ENZYMATIC HYDROLYSIS OF SUGARCANE BAGASSE. The effect of moisture content in the steam treatment and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse was evaluated. Steam treatment was performed at 195-210 °C for 4-8 min using cane bagasse with moisture contents in the range 16-100 wt% (dry basis). Increased moisture contents not only had a positive influence in recovery of main cane biomass components but also resulted in better substrates for enzymatic hydrolysis. As a result, drying is not required for optimal pretreatment and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse, which can be processed into second generation ethanol immediately after crushing and hot water washing.

Keywords: sugarcane bagasse; steam explosion; moisture content.

INTRODUÇÃO

O etanol é um dos principais combustíveis renováveis da atualidade e seu uso em grande escala contribui diretamente para a redução do uso extensivo de combustíveis fósseis no setor automotivo. Sua produção pode ser obtida a partir de diferentes matérias-primas e por diferentes tecnologias de conversão, que podem ser de primeira ou de segunda geração. Enquanto as tecnologias de primeira geração estão baseadas na fermentação alcoólica dos carboidratos presentes, por exemplo, no caldo de cana-de-açúcar (modelo brasileiro) ou em hidrolisados enzimáticos do amido de milho (modelo norte-americano), as tecnologias de segunda geração utilizam resíduos agrícolas e agroindustriais para este mesmo fim.¹⁻³ Neste caso, o processo fermentativo é baseado nos carboidratos liberados da biomassa vegetal por hidrólise da celulose e das hemiceluloses.⁴

A produção de etanol a partir de resíduos agroindustriais representa uma das mais importantes alternativas à consolidação de um modelo sustentável para a produção de combustíveis renováveis.^{5,6} Por esta razão, diferentes tecnologias de pré-tratamento, sacarificação (ou hidrólise) e fermentação vêm sendo estudadas em todo mundo para demonstrar a viabilidade comercial deste processo.^{3,4,7-9} Neste sentido, a maior parte destes estudos está orientada ao aumento da acessibilidade química da celulose, buscando reduzir a quantidade de enzima necessária para a conversão dos polissacarídeos em açúcares fermentescíveis.^{7,10,11}

A explosão a vapor tem sido proposta como um dos métodos mais promissores para separar os principais constituintes da biomassa vegetal e aumentar a sua susceptibilidade à bioconversão.^{8,12-16} Este processo, que atua tanto química como fisicamente na estrutura do material lignocelulósico, está baseado no contato direto da biomassa com vapor saturado à alta pressão por um determinado tempo de residência no reator, seguido de descompressão rápida à condição atmosférica (explosão). Ao longo deste processo, as ligações químicas que mantêm os componentes macromoleculares da fitobiomassa fortemente associados são em parte quebradas, de forma que, no momento da descompressão, o material é desfibrado com facilidade e assim reduzido a partículas menores, aumentando a área superficial de contato e diminuindo a resistência da parede celular à sacarificação.

O pré-tratamento por explosão a vapor pode ser realizado na ausência ou na presença de um catalisador, sendo que o processo realizado na ausência de catalisador é comumente denominado auto-hidrólise. Nesta estratégia, a eficácia do pré-tratamento depende da interação entre alguns fatores primários como temperatura, tempo de residência do material no reator e teor de umidade da biomassa. A escolha da condição de pré-tratamento (temperatura, tempo de residência e umidade) interfere diretamente no rendimento de recuperação dos principais componentes da parede celular (celulose, hemiceluloses e lignina), bem como na eficiência das etapas de sacarificação da celulose e de fermentação dos hidrolisados obtidos. Os maiores percentuais de sacarificação da celulose são, geralmente, derivados de condições mais drásticas de temperatura e tempo de residência no reator. No entanto, elevados níveis de decomposição dos carboidratos (celulose e hemiceluloses) e de condensação da lignina são obtidos sob estas condições, diminuindo o rendimento de recuperação desses componentes e promovendo o acúmulo de inibidores no meio de reação.

O teor de umidade da matéria-prima também pode interferir nos rendimentos quantitativos do processo. Estudos de auto-hidrólise de cavacos industriais de *Eucalyptus viminalis*, com teores de umidade variando de 13 a 100% (m/m, base seca), demonstraram que valores intermediários de umidade (e.g., 50%) proporcionaram maiores rendimentos de recuperação dos principais componentes da biomassa e maiores percentuais de sacarificação da celulose, quando comparados aos demais experimentos realizados neste estudo. Tal condição proporcionou hidrólise de 80% da celulose presente no substrato em 72 h de reação, empregando 2% de substrato (m/v) e 10 UPPF/g (unidades de papel de filtro por grama) de celulose seca.¹⁶

Estudos realizados com álamo verde (*Populus tremuloides*) demonstraram que, independentemente do tamanho dos cavacos empregados no pré-tratamento, o teor de umidade inicial não teve efeito sobre a susceptibilidade do substrato à sacarificação, sendo que a única diferença esteve associada à quantidade de vapor consumido na auto-hidrólise e, por consequência, a um aumento de seus custos operacionais. O pré-tratamento realizado com cavacos de maiores dimensões (23 mm de comprimento, 6,4 mm de largura e 2,8 mm de espessura) mostrou que 2/3 do vapor utilizado no aquecimento de cavacos verdes (contendo 100% de umidade) foram consumidos apenas para o aquecimento da água presente na madeira.¹⁷ Esses mesmos

*e-mail: luiz.ramos@ufpr.br

autores avaliaram o efeito da umidade de cavacos verdes (108,2% de umidade após descongelamento) e secos ao ar (7,16% de umidade) sobre os resultados de pré-tratamento a vapor a 221 °C por 80 s. Os resultados mostraram que o uso de cavacos verdes proporcionou maiores índices de hidrólise e solubilização das hemiceluloses e maiores níveis de sacarificação enzimática da celulose do que o uso de materiais com baixos teores de umidade.¹⁸

O aumento da umidade de 12 para 30% proporcionou efeito positivo sobre a recuperação dos principais componentes da parede celular de cavacos de coníferas pré-tratados a 195 °C por 4,5 min. Tal melhora foi atribuída à menor severidade do pré-tratamento, pois parte do calor latente de vaporização do sistema foi usado para aquecer a água presente no material. Além disso, os substratos obtidos a partir do material com alto teor de umidade apresentaram melhor desempenho frente à hidrólise enzimática.¹⁹ Por outro lado, o aumento da umidade, de 12 para 80%, não apresentou mudanças significativas na composição química do bagaço de cana pré-tratado a vapor a 205 °C por 10 min, bem como nos rendimentos de hidrólise enzimática e de fermentação alcoólica.²⁰

O presente trabalho teve como objetivo contribuir para a elucidação do efeito do teor de umidade do bagaço de cana sobre o seu pré-tratamento a vapor e susceptibilidade à hidrólise enzimática, considerando que, sob condições industriais, o bagaço apresenta umidade de 100% (m/m, base seca) após a moagem para retirada do caldo. Os parâmetros utilizados para avaliar o efeito da umidade sobre o pré-tratamento e hidrólise enzimática foram os rendimentos de recuperação da celulose e das hemiceluloses após o pré-tratamento por explosão a vapor e o aumento da acessibilidade das enzimas aos substratos produzidos.

PARTE EXPERIMENTAL

Material

O bagaço de cana-de-açúcar foi obtido por colheita mecanizada junto à Indústria Sucroalcooleira Melhoramentos S/A (Jussara, PR). Após a coleta, o bagaço foi seco em estufa a 50 °C até 16% (m/m, base seca) de umidade e estocado a vácuo a 4 °C. A hidrólise enzimática foi realizada com as enzimas comerciais Celluclast 1.5L FG[®] e Novozym 188[®], ambas fornecidas pela Novozymes A/S (Bagsvaerd, Dinamarca). Celluclast 1.5L FG é uma preparação celulásica produzida pelo fungo *Trichoderma reesei*, enquanto que Novozym 188 corresponde a uma preparação β -glucosidásica de *Aspergillus niger*.

Métodos

Os teores de umidade das amostras de bagaço *in natura* e pré-tratado a vapor foram determinados gravimetricamente em balança de infravermelho (Gehaka IV2000) a 125 °C até peso constante. O teor de cinzas destes materiais foi determinado segundo as recomendações do relatório técnico NREL/TP-510-42619 do *National Renewable Energy Laboratory* (Golden, CO, EUA).

O teor de extraíveis do bagaço *in natura* foi determinado em aparelho Soxhlet, empregando-se uma sequência de três solventes em ordem crescente de polaridade [diclorometano, etanol:tolueno 1:2 (v/v) e etanol 95%], seguindo as recomendações do relatório técnico NREL/TP-510-42619. O percentual de cada extrato foi calculado pela perda de massa em relação à massa seca do material originalmente empregado no ensaio.

O pré-tratamento a vapor (auto-hidrólise) foi realizado utilizando-se um reator de aço inox com capacidade para 10 L, provido de sensores para o acompanhamento da pressão e da temperatura, além de válvulas de controle para entrada de vapor e sua subsequente

descompressão. Ao reator estão acopladas uma caldeira geradora de vapor, um compressor de ar e um ciclone, empregado para descarga e coleta do material.

O efeito das variáveis operacionais sobre o pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar foi avaliado através de um planejamento fatorial de experimentos que envolveu três variáveis em dois níveis (2³): umidade do material (16 e 100% m/m), temperatura (195 e 210 °C) e tempo de residência do material no reator (4 e 8 min). Adicionalmente, um ponto central (PC a 202,5 °C por 6 min usando bagaço com 58% de umidade) foi ensaiado em quadruplicata, objetivando a avaliação da estimativa do desvio experimental.

Cerca de 230 g de bagaço de cana (peso seco) foram introduzidos no reator pré-aquecido (Tabela 1). Então, a válvula superior do reator foi fechada e as válvulas de entrada do vapor foram imediatamente abertas. A partir deste momento, o aumento da temperatura foi acompanhado até que o valor desejado fosse atingido, a partir do qual se iniciou a contagem do tempo de pré-tratamento. A evolução da temperatura no interior do reator foi monitorada a cada 15 s, desde a abertura das válvulas de pressurização até o momento da explosão a vapor. O tempo médio para atingir a temperatura desejada foi de 65 ± 17 s.

Após o pré-tratamento, o bagaço de cana, recuperado no ciclone em suspensão aquosa, foi mantido sob agitação mecânica por 1 h na temperatura ambiente, a uma consistência de aproximadamente 5% (m/v). A suspensão foi então filtrada em funil de Büchner e as fibras, retidas em uma tela de nylon, foram dispersas em água para serem submetidas a uma nova etapa de lavagem aquosa, nas mesmas condições de extração empregadas anteriormente. Assim, as amostras foram separadas em fração solúvel em água (BEV-SA), composta majoritariamente pelo hidrolisado das hemiceluloses, e fração insolúvel em água (BEV-IA), formada por celulose, lignina e hemicelulose residual.

A composição química do bagaço de cana livre de extraíveis e dos substratos derivados do pré-tratamento a vapor (frações BEV-IA) foi determinada pelo método de Klason modificado para a quantificação gravimétrica da lignina insolúvel em meio ácido.²¹ O teor de lignina solúvel em meio ácido foi determinado por espectrofotometria no ultravioleta, de acordo com as recomendações da literatura especializada.²² A determinação de carboidratos nos substratos celulósicos e seus respectivos produtos de desidratação foi realizada nos hidrolisados resultantes da determinação de Klason, usando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As análises foram realizadas em sistema Shimadzu modelo LC10AD (Kyoto, Japan) com amostrador automático SIL10A, degaseificador de fase móvel DGU14A, forno de aquecimento de coluna CTO 10A e detectores RID10A para índice de refração e SPD-M10Avp para espectrofotometria no ultravioleta. A análise foi realizada em coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad) a 65 °C, precedida por pré-coluna Cation-H e eluída com fase móvel H₂SO₄ 8 mmol/L a uma vazão de 0,6 mL/min. A quantificação foi efetuada por padronização externa, com base em curvas de calibração construídas para cada analito investigado: celobiose, glucose, xilose, arabinose, ácido fórmico e ácido acético, levando-se em conta os seus respectivos fatores de hidrólise ácida. Estes fatores, que foram de 0,95 para a celobiose, 0,90 para a glucose, 0,88 para xilose e arabinose e 0,72 para o ácido acético, serviram para converter cada componente em seus respectivos derivados anidro. Os produtos de desidratação de pentoses e hexoses (furfural e hidroximetilfurfural) também foram quantificados por CLAE, empregando-se o mesmo protocolo de análise; entretanto, estes produtos não foram contabilizados nos cálculos do balanço de massas, na forma de seus respectivos carboidratos de origem. Por outro lado, manose e galactose não foram determinadas nos hidrolisados do bagaço porque ambas coeluem com a xilose no

sistema cromatográfico empregado. No entanto, a contribuição destas duas hexoses na quantificação das xilanas do bagaço não ultrapassou a faixa de 1 a 2% em relação à massa seca do material de origem.

Alíquotas das frações BEV-SA foram centrifugadas a 10.000 rpm, filtradas em membrana de nylon de 0,45 µm e analisadas empregando o mesmo sistema cromatográfico descrito acima. Como todas as frações BEV-SA apresentaram oligossacarídeos em sua constituição, foi necessária a realização de uma etapa complementar de pós-hidrólise para garantir uma análise consistente e um bom fechamento do balanço de massas do sistema. A pós-hidrólise foi realizada com ácido sulfúrico 1 mol/L por 2 h em estufa a 105 °C, seguindo-se a análise cromatográfica conforme já descrito.

A hidrólise enzimática dos substratos obtidos após o pré-tratamento a vapor foi realizada em triplicata, sempre acompanhada de seus respectivos brancos do substrato e da enzima. Os ensaios foram realizados em suspensão contendo 2% de substrato (m/v) em tampão acetato de sódio 50 mmol/L (pH 4,8) por 72 h a 45 °C e 150 rpm, empregando uma mistura de Celluclast 1.5L e Novozym 188® (Novozymes) com atividades celulásica de 15 UPF/g e celobiásica de 13,5 UCB/g (unidades celobiásicas por grama) de substrato.

Todos os ensaios de atividade enzimática foram conduzidos em tampão acetato de sódio 50 mmol/L e pH 4,8. A atividade celulásica total foi determinada contra papel de filtro Whatman #1 usando o ácido 3,5-dinitro-salicílico (DNS) para quantificar açúcares redutores totais (ART). A atividade celobiásica total foi determinada utilizando como substrato uma solução de celobiose a 15 mmol/L, sendo que os açúcares solúveis foram analisados por CLAE.²³

A liberação de açúcares durante o processo hidrolítico foi monitorada por CLAE nos tempos de 4, 8, 24, 48 e 72 h. Alíquotas de 1 mL foram fervidas por 5 min em banho-maria, centrifugadas a 10.000 rpm e imediatamente conduzidas para análise cromatográfica. Os componentes monitorados por CLAE foram celobiose, glucose e xilose. Estes valores foram expressos em relação aos seus polissacarídeos de origem, através da multiplicação por seus respectivos fatores de hidrólise. Os rendimentos de hidrólise foram, então, calculados em relação à quantidade de celulose e hemiceluloses presentes no bagaço de cana pré-tratado a vapor. Para tabulação dos dados de hidrólise enzimática, as concentrações de celobiose e glucose foram reunidas e expressas em termos de equivalentes de glucose (EqGlc), já que ambos são carboidratos majoritariamente oriundos da celulose propriamente dita.

O efeito da umidade do bagaço de cana sobre a hidrólise enzimática de substratos pré-tratados também foi avaliado com base no fator de severidade (R_0) do processo de auto-hidrólise. Tal fator foi obtido, para cada condição de pré-tratamento, a partir da fórmula

$R_0 = e^{[(T-100)/14,75] \cdot t}$, onde T (°C) é a temperatura e t (min) é o tempo de residência do material no reator.²⁴ Neste caso, o planejamento experimental descrito acima foi reduzido a duas variáveis em dois níveis (2²), já que o tempo e a temperatura foram condensados em uma única variável (R_0).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O bagaço de cana utilizado foi seco em estufa a 50 °C, para facilitar a estocagem e evitar perdas por degradação biológica. Neste sentido, todas as amostras de bagaço com alto teor de umidade, empregadas no desenvolvimento do planejamento fatorial (Tabela 1), foram umedecidas com água até atingir o teor de umidade desejado.

Inicialmente, a composição química do bagaço de cana foi determinada em triplicatas a partir de amostras livres de extraíveis, empregando metodologias padronizadas, como o método de Klason modificado seguido da análise dos hidrolisados por CLAE. Como resultado, foram caracterizadas as presenças de 6,7 ± 0,2% de extraíveis totais, 39,3 ± 0,3% de anidrogucose, 16,3 ± 0,2% de anidroxilose, 2,3 ± 0,1% de anidroarabinose, 3,0 ± 0,1% de grupo acetil, 27,4 ± 0,1% de lignina de Klason (insolúvel em ácido), 1,2 ± 0,1% de lignina solúvel em ácido e 2,9 ± 0,2% de cinzas, totalizando 99,2 ± 0,9% em relação à massa seca do material de origem. Em geral, esta composição química mostrou-se semelhante à relatada em outros trabalhos disponíveis na literatura, onde a análise quantitativa do bagaço também foi expressa em relação à matéria seca livre de extraíveis.^{2,20}

A Tabela 1 apresenta a influência das principais variáveis do processo sobre a recuperação das frações insolúvel (BEV-IA) e solúvel (BEV-SA) em água, abordando tanto os efeitos principais (temperatura, tempo e umidade) quanto os decorrentes de interações secundárias e terciárias entre estas variáveis. A partir destes valores, e levando-se em consideração a estimativa do desvio padrão experimental associado à quadruplicata do ponto central (DP), foi possível observar que nenhuma variável influenciou de maneira estatisticamente significativa a recuperação das frações solúvel (BEV-SA) e insolúvel (BEV-IA). No entanto, considerando-se um nível de confiança de 95%, foram observadas influências estatisticamente significativas no rendimento total do processo (frações BEV-SA + BEV-IA), onde foi constatado um efeito negativo do tempo de pré-tratamento (t = -4,7) e um efeito positivo da umidade presente no material de origem (U = 4,6). Este conjunto de observações revela que o uso de menores tempos de pré-tratamento e maiores valores de umidade no bagaço revertem em maiores rendimentos totais de recuperação dos principais componentes da biomassa, situação correspondente aos

Tabela 1. Rendimentos obtidos após o pré-tratamento e os efeitos calculados em pontos percentuais para as variáveis definidas no planejamento experimental 2³

| Exp. | Massa (g) | Condições | Rendimentos de auto-hidrólise (%) | | | Efeitos [2Σ(E ⁺ + E ⁻)/N] | | | |
|------------------|-----------|------------------------------|-----------------------------------|---------------------|--------------------|--|--------|--------|-------|
| | | | BEV-SA ¹ | BEV-IA ¹ | Total ¹ | Códigos ⁴ | BEV-SA | BEV-IA | Total |
| B1 | 224,6 | 4 min, 195 °C, 16% umidade | 21,0 | 60,2 | 81,2 | t | -1,0 | -3,8 | -4,7 |
| B2 | 225,8 | 8 min, 195 °C, 16% umidade | 20,1 | 59,0 | 79,1 | T | -0,8 | -2,9 | .3,7 |
| B3 | 223,9 | 4 min, 210 °C, 16% umidade | 19,7 | 60,4 | 80,1 | U | 1,7 | 2,9 | 4,6 |
| B4 | 224,1 | 8 min, 210 °C, 16% umidade | 17,0 | 57,8 | 74,8 | t x T | -0,6 | -2,6 | -3,2 |
| B5 | 224,2 | 4 min, 195 °C, 100% umidade | 20,8 | 65,5 | 86,3 | t x U | 0,9 | -1,9 | -1,0 |
| B6 | 225,1 | 8 min, 195 °C, 100% umidade | 20,9 | 64,4 | 85,3 | T x U | 1,4 | -2,4 | -1,0 |
| B7 | 227,4 | 4 min, 210 °C, 100% umidade | 21,6 | 64,7 | 86,3 | t x T x U | 0,4 | -1,9 | -1,6 |
| B8 | 227,0 | 8 min, 210 °C, 100% umidade | 21,3 | 54,5 | 75,8 | | | | |
| PC ² | 226,5±0,2 | 6 min, 202,5 °C, 58% umidade | 18,8±0,8 | 53,9±1,3 | 72,2±1,2 | DP ⁵ | 2,5 | 3,9 | 3,9 |
| B7* ³ | 227,0 | 4 min, 210 °C, 100% umidade | 22,3 | 62,3 | 84,6 | | | | |

¹ BEV-SA, fração solúvel em água; BEV-IA, fração insolúvel em água; Total = BEV-SA + BEV-IA; ² PC, média e desvio padrão do ponto central do planejamento fatorial; ³ Pré-tratamento realizado com bagaço de cana úmido, obtido diretamente da linha de produção industrial; ⁴ Códigos: t, tempo; T, temperatura; U, umidade; DP, desvio-padrão; ⁵ Estimativa do desvio padrão experimental ($s \times t_{95\%, n-1=3}$).

ensaios B5 e B7 da Tabela 1, caracterizados por rendimentos totais da ordem de 86,3%.

O fato de um elevado rendimento total também ter sido observado nas condições do ensaio B7, que envolve uma temperatura elevada de pré-tratamento (210 °C), sugere a existência de um efeito de interação entre as variáveis tempo (t) e temperatura (T), mesmo que o efeito de interação médio ($t \times T = 3,2$) tenha sido inferior ao valor de desvio utilizado como critério de influência ($s \times t = 3,9$). Este efeito de segunda ordem pode ser mais bem visualizado na representação geométrica apresentada na Figura 1, que corresponde a um planejamento 2^2 extraído do planejamento original (2^3), fixando-se a umidade no seu maior valor (100%). Nesta representação, o efeito de interação é evidente, uma vez que o efeito negativo da temperatura (-9,5) somente se manifesta para o maior tempo de tratamento (8 min). Para o menor tempo, o efeito da temperatura é negligenciável, o que configura um efeito combinado que faz com que maiores rendimentos possam ser obtidos em qualquer temperatura, desde que o menor tempo de tratamento seja praticado. O efeito combinado do tempo e da temperatura na recuperação mássica do bagaço pré-tratado parece evidente e esta tendência é justificada por perdas na recuperação do substrato após o pré-tratamento, por volatilização de subprodutos de reação como furfural e hidroximetilfurfural e, eventualmente, por erros experimentais associados aos processos de extração.

Durante o processo de pré-tratamento a vapor, todos os

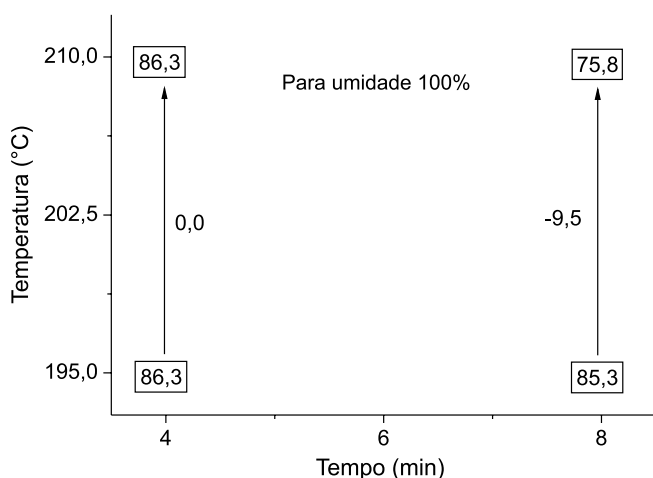


Figura 1. Representação geométrica do efeito de segunda ordem entre o tempo e a temperatura, fixando a umidade em 100%

Tabela 2. Composição química das frações BEV-SA obtidas após pré-tratamento e os efeitos calculados em pontos percentuais para as variáveis definidas no planejamento experimental 2^3

| Exp. | Composição (g/100g) | | | | | | Efeitos [$2\Sigma(E^+ + E^-)/N$] | | | | | | |
|------------------|---------------------|--------------------|--------------------|---------------------|------------------|----------------|------------------------------------|-------|-------|-------|--------|-----|------|
| | AnGlc ¹ | AnXyl ¹ | AnAra ¹ | Acetil ¹ | HMF ¹ | F ¹ | Código ⁴ | AnGlc | AnXyl | AnAra | Acetil | HMF | F |
| B1 | 1,83 | 13,69 | 2,12 | 2,67 | 0,03 | 0,11 | t | -0,4 | -3,3 | -0,5 | 0,1 | 0,1 | 0,3 |
| B2 | 1,57 | 12,08 | 1,70 | 3,88 | 0,05 | 0,21 | T | 0,1 | 1,4 | -0,1 | 1,1 | 0,2 | 0,1 |
| B3 | 1,94 | 20,01 | 1,98 | 3,79 | 0,11 | 0,22 | U | 0,1 | -0,4 | 0,1 | -0,3 | 0,1 | 0,2 |
| B4 | 1,00 | 12,00 | 1,23 | 3,76 | 0,16 | 0,48 | t x T | -0,1 | -2,5 | 0,2 | -0,2 | 0,1 | 0,1 |
| B5 | 1,62 | 14,21 | 2,31 | 2,76 | 0,04 | 0,12 | t x U | 0,2 | 1,5 | 0,2 | -0,5 | 0,1 | 0,1 |
| B6 | 1,28 | 14,13 | 1,32 | 2,29 | 0,05 | 0,65 | T x U | 0,3 | -1,7 | 0,2 | 0,5 | 0,1 | -0,1 |
| B7 | 1,84 | 15,71 | 1,81 | 4,03 | 0,15 | 0,11 | t x T x U | 0,2 | 0,7 | 0,4 | 0,4 | 0,1 | -0,1 |
| B8 | 1,68 | 12,10 | 2,02 | 3,82 | 0,33 | 0,49 | | | | | | | |
| PC ² | 2,61±0,10 | 20,61±0,70 | 2,02±0,06 | 3,37±0,20 | 0,11±0,02 | 0,40±0,03 | DP ⁵ | 0,3 | 2,2 | 0,2 | 0,7 | 0,1 | 0,1 |
| B7* ³ | 1,81 | 14,98 | 1,13 | 4,06 | 0,12 | 0,09 | | | | | | | |

¹ AnGlc, anidroglicose; AnXyl, anidroxilose; AnAra, anidroarabinose; HMF, hidroximetilfurfural; F, furfural; ² PC, média e desvio padrão do ponto central do planejamento fatorial; ³ Pré-tratamento realizado com bagaço de cana úmido, obtido diretamente da linha de produção industrial; ⁴ Códigos: t, tempo; T, temperatura; U, umidade; DP, desvio-padrão; ⁵ Estimativa do desvio padrão experimental ($s \times t_{95\%, n-1=3}$).

componentes da biomassa sofrem hidrólise ácida, mas as hemiceluloses são as mais profundamente modificadas por este tipo de reação. Sob a ação da temperatura e da pressão, os grupamentos acetil presentes nas hemiceluloses são hidrolisados a ácido acético e o ácido liberado no meio catalisa a quebra das ligações do complexo lignina-carboidrato, provocando a solubilização de grande parte das hemiceluloses, que são facilmente removidas por extração aquosa, sendo que o aumento da acessibilidade das enzimas à celulose é frequentemente atribuída a este fato.^{11,14}

Com intuito de avaliar o efeito do pré-tratamento sob a remoção das hemiceluloses, todos os extratos aquosos obtidos após lavagem do material pré-tratado foram analisados por CLAE. Os resultados obtidos demonstraram que algumas amostras continham uma quantidade significativa de oligossacarídeos, cuja quantificação não foi possível porque o sistema cromatográfico empregado não era capaz de resolver adequadamente esses oligossacarídeos. Para quantificar todos os carboidratos presentes nos extratos aquosos na forma de açúcares livres, tais extratos foram submetidos a uma pós-hidrólise com ácido sulfúrico diluído e os hidrolisados resultantes foram reanalisados por CLAE (Tabela 2).

Os resultados apresentados na Tabela 2 sugerem uma maior influência das variáveis na recuperação da xilose, o que implicou em um efeito negativo do tempo de pré-tratamento ($t = -3,3$) e um efeito de interação entre tempo e temperatura ($t \times T = -2,5$). Em função destes efeitos, o maior percentual de xilose na fração BEV-SA foi obtido no menor tempo de pré-tratamento (ver resultado de experimentos B1, B3, B5 e B7), particularmente nos ensaios envolvendo temperatura de 210 °C (experimentos B3 e B7).

Em todos os pré-tratamentos, a xilose foi o monossacarídeo predominante nos extratos aquosos pós-hidrolisados, seguida da arabinose e da glucose. Para a glucose e a arabinose, a única variável que apresentou um efeito significativo foi o tempo, que influenciou negativamente os seus rendimentos de recuperação. No caso do ácido acético, gerado pela desacetilação das heteroxilanas (hemiceluloses), a temperatura foi a única variável significativa ($T = 1,1$), indicando que esta variável favorece a sua recuperação independentemente do tempo de pré-tratamento e do teor de umidade, resultando na desacetilação praticamente completa das hemiceluloses presentes no bagaço. Já para os produtos de desidratação de pentoses e hexoses (furfural e hidroximetilfurfural, respectivamente), apenas os efeitos de primeira ordem da temperatura e do tempo de reação foram significativos para a sua formação e acúmulo nas frações solúveis em água do pré-tratamento. No entanto, os níveis de HMF e furfural obtidos não foram considerados inibitórios, quando comparados aos

dados relatados na literatura especializada.^{20,25,26} Níveis superiores de furfural e inferiores de HMF foram obtidos em estudos de auto-hidrólise do bagaço a 205 °C por 10 min, empregando amostras com diferentes teores de umidade.²⁰ Estes autores demonstraram que a auto-hidrólise do bagaço seco (13% de umidade) gerou 1,07 e 0,11 g/100 g de furfural e HMF em relação ao material de origem (base seca), enquanto que para o bagaço úmido (79% de umidade) estes valores foram de 0,77 e 0,07 g/100 g, respectivamente.

A influência da umidade do bagaço sobre a composição química da fração BEV-IA também foi avaliada em relação à estimativa do desvio padrão experimental. Os resultados obtidos para a composição química das frações BEV-IA e os valores dos efeitos estão dispostos na Tabela 3. Os efeitos de primeira ordem foram mais significativos em relação aos efeitos combinados (segunda e terceira ordem) para a recuperação de arabinose na fração BEV-IA. Tais resultados evidenciam que condições de pré-tratamento menos drásticas (experimentos B1 e B5) diminuem a hidrólise ácida deste componente e que o aumento da umidade de 16 para 100% tem efeito contrário. Para a xilose, a interação entre as três variáveis empregadas no pré-tratamento apresentou efeito positivo ($t \times T \times U = 2,0$). Entretanto, quando os efeitos individuais foram avaliados, o tempo e a temperatura apresentaram influência negativa, enquanto a umidade apresentou influência positiva. Assim, maiores teores de xilose na fração BEV-IA foram obtidos em condições mais brandas de pré-tratamento, principalmente quando houve um aumento da umidade de 16 para 100%. Neste sentido, o maior percentual de xilose nas fibras pré-tratadas foi obtido no experimento B05 (14,7%).

Com a remoção das hemiceluloses por lavagem aquosa, o teor de lignina dos substratos aumentou em relação ao teor de lignina do bagaço não tratado (30,7%). Neste sentido, a variável responsável por tal resultado foi a temperatura do pré-tratamento ($T = 2,4$), já que a umidade apresentou efeito negativo ($U = -2,0$) e o tempo de residência não apresentou efeito estatisticamente significativo. Isto também justifica o efeito negativo da umidade, já que o pré-tratamento realizado com bagaço úmido propiciou menor remoção das hemiceluloses, principalmente de anidroxilose, conforme descrito anteriormente. A quantidade de glucose na fração insolúvel também foi aumentada em comparação ao bagaço original, sendo que o efeito mais significativo foi a interação de três fatores, que proporcionou um efeito negativo ($t \times T \times U = -3,8$) no seu rendimento de recuperação.

O balanço de massas dos principais componentes do bagaço também foi avaliado em relação às variáveis empregadas no planejamento fatorial e os resultados obtidos estão descritos na Tabela 4. Analisando os valores associados à recuperação da glucose, pode-se observar que

a interação entre três fatores resultou em um efeito positivo ($t \times T \times U = 2,3$). O melhor rendimento foi obtido no experimento realizado a 210 °C por 4 min com material seco ao ar (experimento B3), que resultou na recuperação de 88,1% da glucose originalmente presente no bagaço, sendo 3,3% na fração BEV-SA e 84,8% na fração BEV-IA. Tendências semelhantes foram obtidas para o bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor a 205 °C por 10 min, onde os experimentos realizados com o bagaço seco (13%) proporcionaram maior rendimento em relação ao bagaço úmido (79%).²⁰ Entretanto, estes autores relataram a recuperação de 100% da glucose em ensaios de pré-tratamento realizados com bagaço seco, apesar de terem constatado a presença de HMF na fração solúvel obtida após o pré-tratamento. Portanto, a quantidade de HMF formada no processo foi provavelmente convertida em glucose para efeitos do cálculo do balanço de massas do sistema.

Confirmando a expectativa causada por resultados anteriores, o tempo de reação teve efeito negativo ($t = -5,3$) e a umidade apresentou efeito positivo ($U = 3,3$) sobre a recuperação total da xilose, mostrando que, independentemente da temperatura, o emprego de bagaço com maior teor de umidade (100%) sob menores tempos de residência no reator (4 min) maximizou a recuperação desta pentose na fração BEV-SA. Os melhores resultados foram obtidos para os experimentos B3 e B7, ambos realizados a 210 °C por 4 min, em que a recuperação de xilose foi de 87,3 e 89,2% em relação ao teor de hemiceluloses presente no bagaço *in natura*, sendo 71,9 e 77,2% na fração BEV-SA e 15,4 e 12,0% na fração BEV-IA, respectivamente. O efeito mais significativo na recuperação da arabinose foi a interação entre temperatura e umidade, que aumentou o seu rendimento em 9,7 p.p.. Entretanto, a arabinose apresentou menores percentuais de recuperação que a glucose e a xilose, reiterando que este monossacarídeo é mais susceptível à hidrólise e desidratação, sendo a fonte mais importante para o acúmulo de furfural no extrato aquoso. Os percentuais de recuperação de pentoses obtidos neste estudo foram consideravelmente superiores aos descritos na literatura para o pré-tratamento de bagaço de cana a 205 °C por 10 min, onde se encontram registrados valores de 40 a 55% e de 55 a 58% para biomassas com 13 e 79% de umidade, respectivamente.²⁰ Sobre a lignina, a interação entre os três fatores influenciou positivamente na sua recuperação ($t \times T \times U = 5,6$) e os experimentos realizados com tempos de residência mais prolongados e altos teores de umidade proporcionaram maiores rendimentos quantitativos deste componente nos materiais pré-tratados. Por outro lado, percentuais excessivamente altos de recuperação da lignina de Klason foram obtidos sob condições mais severas (por exemplo, 101% para 210 °C por 8 min) sugerindo que,

Tabela 3. Composição química das frações BEV-IA obtidas após o pré-tratamento e efeitos calculados em pontos percentuais para as variáveis definidas no planejamento 2³

| Exp. | Composição (%) | | | | Efeitos [$2\Sigma(E^+ + E^-)/N$] | | | | |
|------------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------|------------------------------------|-------|-------|-------|---------|
| | AnGlc ¹ | AnXyl ¹ | AnAra ¹ | Lignina | Código ⁴ | AnGlc | AnXyl | AnAra | Lignina |
| B1 | 55,9 | 8,1 | 1,9 | 32,4 | t | 1,7 | -3,8 | -0,4 | 0,3 |
| B2 | 56,7 | 5,3 | 0,9 | 31,8 | T | -0,8 | -3,3 | -0,4 | 2,4 |
| B3 | 50,6 | 8,8 | 1,0 | 34,1 | U | -0,4 | 3,4 | -0,3 | -2,0 |
| B4 | 58,0 | 2,1 | 0,8 | 35,1 | t x T | -0,4 | 0,1 | 0,3 | -0,1 |
| B5 | 53,0 | 14,7 | 1,2 | 29,6 | t x U | -2,4 | 1,0 | 0,2 | 0,1 |
| B6 | 56,5 | 9,7 | 0,8 | 30,9 | T x U | 1,2 | -2,1 | 0,1 | -0,2 |
| B7 | 57,7 | 7,1 | 0,7 | 32,7 | t x T x U | -3,8 | 2,0 | -0,1 | -0,8 |
| B8 | 52,7 | 6,4 | 0,7 | 32,2 | | | | | |
| PC ² | 57,9±0,8 | 5,7±0,1 | 0,61±0,03 | 30,7±0,4 | DP ⁵ | 2,6 | 0,3 | 0,1 | 1,2 |
| B7* ³ | 58,4 | 6,7 | 1,4 | 33,8 | | | | | |

¹ AnGlc, anidrogucose; AnXyl, anidroxilose; AnAra, anidroarabinose; ² PC, média e desvio padrão do ponto central do planejamento fatorial; ³ Pré-tratamento realizado com bagaço de cana úmido, obtido diretamente da linha de produção industrial; ⁴ Códigos: t, tempo; T, temperatura; U, umidade; DP, desvio-padrão;

⁵ Estimativa do desvio padrão experimental ($s \times t_{95\%, n-1=3}$)

Tabela 4. Rendimento total do pré-tratamento (BEV-SA + BEV-IA) e os efeitos calculados em pontos percentuais para as variáveis definidas no planejamento experimental 2³

| Exp. | Composição (%) | | | | Código ⁴ | Efeitos [2Σ(E ⁺ + E ⁻)/N] | | | |
|------------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------|---------------------|--|-------|-------|---------|
| | AnGlc ¹ | AnXyl ¹ | AnAra ¹ | Lignina | | AnGlc | AnXyl | AnAra | Lignina |
| B1 | 83,0 | 84,8 | 83,0 | 78,6 | t | -2,2 | -5,3 | -4,1 | 8,8 |
| B2 | 83,5 | 79,3 | 74,3 | 86,2 | T | 0,9 | 1,9 | -5,2 | -3,8 |
| B3 | 88,1 | 87,3 | 64,6 | 81,5 | U | 1,9 | 3,3 | 7,5 | 12,0 |
| B4 | 78,2 | 79,5 | 62,9 | 85,9 | t x T | -2,9 | -0,6 | 5,1 | 4,0 |
| B5 | 83,7 | 86,7 | 81,3 | 98,6 | t x U | 2,5 | 1,4 | 1,1 | 2,7 |
| B6 | 84,6 | 82,8 | 71,6 | 100,3 | T x U | 1,0 | 0,6 | 9,7 | -5,1 |
| B7 | 86,2 | 89,2 | 79,1 | 80,1 | t x T x U | 2,3 | 0,6 | 1,6 | 5,6 |
| B8 | 85,8 | 85,3 | 82,8 | 101,1 | | | | | |
| PC ² | 86,9±0,5 | 87,7±0,8 | 77,6±0,1 | 93,1±0,2 | DP ⁵ | 1,6 | 2,5 | 0,3 | 0,6 |
| B7* ³ | 88,6 | 89,8 | 87,4 | 82,8 | | | | | |

¹ AnGlc, anidroglicose; AnXyl, anidroxilose; AnAra, anidroarabinose; ² PC, média e desvio padrão do ponto central do planejamento fatorial; ³ Pré-tratamento realizado com bagaço de cana úmido, obtido diretamente da linha de produção industrial; ⁴ Códigos: t, tempo; T, temperatura; U, umidade; DP, desvio-padrão;

⁵ Estimativa do desvio padrão experimental ($s \times t_{95\%, n-1=3}$)

neste caso, reações de condensação preponderaram sobre reações de hidrólise. Este fato é importante porque a geração de materiais poliméricos, que se comportam como lignina durante o procedimento de Klason, já foi relatada em estudos de pré-tratamento a vapor de outras matrizes e estes materiais, devido a suas propriedades hidrofóbicas, causam a perda de atividade específica por adsorção irreversível das principais enzimas responsáveis pela hidrólise.^{1,12,27}

A eficiência do pré-tratamento a vapor também foi monitorada pela hidrólise enzimática dos substratos resultantes do processo, com intuito de identificar as condições que produziram substratos de maior acessibilidade às enzimas (Tabela 5). Neste sentido, o aumento do tempo e da temperatura do pré-tratamento apresentou efeito positivo sobre os índices de hidrólise enzimática da celulose, enquanto que a umidade inicial do bagaço apresentou efeito negativo. O melhor resultado foi obtido para os pré-tratamentos realizados a 210 °C por 8 min e 16% de umidade (B4), onde praticamente toda a celulose foi hidrolisada à glucose após 48 h de reação, sendo que, em 8 h, 73% da celulose já tinham sido convertidos à glucose e celobiose. Já para o experimento realizado com 100% de umidade nas mesmas condições de tempo e temperatura, os percentuais de conversão em 8 e 48 h foram de 65,4 e 97,5%, respectivamente. Estes resultados mostraram que os substratos obtidos após o pré-tratamento do bagaço de cana com 16% de umidade são hidrolisados mais rapidamente do que os substratos obtidos com bagaço contendo 100% de umidade. Entretanto, apesar da umidade ter apresentado influência negativa

sobre o percentual de hidrólise, todos os substratos obtidos sob elevadas temperaturas e tempos de residência no reator apresentaram alta acessibilidade às enzimas em 72 h de reação. Naturalmente, o bagaço com maior teor de umidade exigiu temperaturas superiores para atingir níveis adequados de severidade no pré-tratamento. Além disso, substratos obtidos nestas condições apresentaram maior teor de xilanas em sua composição química, o que justifica parcialmente os resultados de hidrólise enzimática, já que há evidências de que a remoção de hemiceluloses (xilanas) durante o pré-tratamento aumenta a acessibilidade das enzimas à celulose.^{20,28}

O efeito da umidade do bagaço sobre a hidrólise enzimática de substratos pré-tratados também foi avaliado em relação ao fator de severidade (R_0) do processo de auto-hidrólise.²⁴ Tal análise foi realizada com base nos resultados de 72 h de hidrólise da Tabela 5, onde as condições de tempo e de temperatura foram transformadas no referido fator (Figura 2). Esta representação mostra que a susceptibilidade do substrato à hidrólise aumenta com o aumento da severidade do pré-tratamento e que substratos obtidos com alto teor de umidade (100%) necessitam de condições mais severas de pré-tratamento para que a celulose seja totalmente hidrolisada pela ação sinérgica das enzimas.

A lignina representa uma barreira para a degradação enzimática da celulose²⁹⁻³¹ porque a sua estrutura polimérica tridimensional e amorfa³² promove a adsorção não específica das enzimas sobre a sua superfície, diminuindo a disponibilidade destas para a sacarificação da celulose ou eventualmente ocasionando a sua inativação.^{33,34} Por

Tabela 5. Equivalentes de glucose para os tempos de 8 a 72 h de hidrólise enzimática e os efeitos calculados em pontos percentuais para as variáveis definidas no planejamento experimental 2³

| Exp. | Equivalentes de glucose (%) | | | | Código ³ | Efeitos [2Σ(E ⁺ + E ⁻)/N] | | | |
|------------------|-----------------------------|----------|----------|----------|---------------------|--|------|-------|------|
| | 8 h | 24 h | 48 h | 72 h | | 8 h | 24 h | 48 h | 72 h |
| B1 | 44,4 | 61,9 | 75,9 | 79,9 | t | 8,0 | 11,5 | 12,0 | 9,4 |
| B2 | 58,5 | 72,6 | 88,2 | 87,7 | T | 19,0 | 21,1 | 20,4 | 19,5 |
| B3 | 62,3 | 76,3 | 88,4 | 96,1 | U | -4,0 | -4,8 | -6,3 | -4,9 |
| B4 | 73,4 | 86,2 | 100,7 | 101,3 | t x T | -3,6 | -5,5 | -4,5 | -5,6 |
| B5 | 40,2 | 53,2 | 57,5 | 63,1 | t x U | -4,6 | 1,2 | -0,30 | 2,9 |
| B6 | 49,4 | 76,5 | 78,2 | 85,3 | T x U | 2,6 | 7,1 | 7,9 | 4,7 |
| B7 | 67,6 | 92,1 | 94,7 | 97,2 | t x T x U | -2,1 | -5,1 | -4,4 | -4,3 |
| B8 | 65,4 | 94,4 | 97,5 | 99,6 | | | | | |
| PC ¹ | 65,1±1,2 | 82,9±1,1 | 88,4±1,5 | 92,0±1,5 | DP ⁴ | 3,7 | 3,4 | 4,8 | 4,8 |
| B7* ² | 56,40 | 74,12 | 88,32 | 96,41 | | | | | |

¹ PC, média e desvio padrão do ponto central do planejamento fatorial; ² Pré-tratamento realizado com bagaço de cana úmido, obtido diretamente da linha de produção industrial; ³ Códigos: t, tempo; T, temperatura; U, umidade; DP, desvio-padrão; ⁴ Estimativa do desvio padrão experimental ($s \times t_{95\%, n-1=3}$)

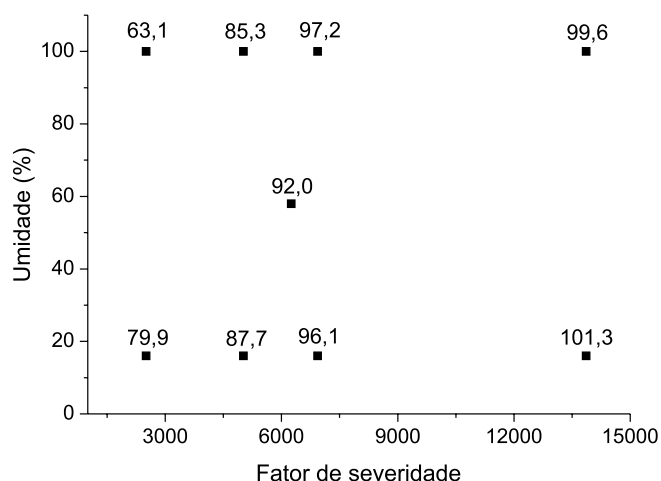


Figura 2. Representação geométrica da hidrólise enzimática após 72 h de reação, em relação ao fator de severidade do pré-tratamento

outro lado, alguns estudos comprovaram que mudanças na estrutura da lignina afetam a hidrólise enzimática em maior extensão do que a quantidade de lignina presente no substrato.³³ No presente trabalho, tanto o percentual de lignina quanto as modificações ocorridas em sua estrutura não foram suficientes para comprometer a acessibilidade das enzimas ao substrato, já que altos índices de sacarificação foram observados em todos os ensaios de hidrólise enzimática.

Como a secagem em estufa de materiais lignocelulósicos pode levar à colapso da microporosidade das fibras, levando a uma provável diminuição de sua permeabilidade ao vapor, um experimento complementar (B7* na Tabela 1) também foi realizado a 210 °C por 4 min com amostras de bagaço úmido obtidas diretamente da linha de produção industrial, ou seja, contendo cerca de 100% de umidade. Os resultados obtidos foram então comparados ao experimento B7, que foi realizado com bagaço reidratado a esta mesma condição de umidade. Tais condições de auto-hidrólise foram selecionadas por terem sido aquelas em que foram obtidos os melhores índices de recuperação de carboidratos, paralelamente aos maiores índices de sacarificação da celulose. Os resultados de rendimento e de composição química obtidos no experimento B7*, em comparação ao realizado com amostras reidratadas até atingir o mesmo teor de umidade (B7), foram muito semelhantes entre si, apresentando apenas uma pequena diferença no percentual de arabinose e, por consequência, no seu percentual de recuperação (Tabelas 2 a 4). Por outro lado, os substratos apresentaram o mesmo perfil de acessibilidade enzimática, mostrando que as etapas de secagem em estufa e reidratação por aspersão não alteram a susceptibilidade do bagaço à auto-hidrólise (Tabela 5).

Conforme relatado por outros autores,¹⁶⁻²⁰ altos teores de umidade influenciaram de forma positiva a recuperação dos principais componentes da biomassa, mas sua influência foi negativa em relação ao percentual de hidrólise. No entanto, apesar disto, todos os substratos obtidos sob elevadas temperaturas e tempos de reação apresentaram conversão praticamente total em 72 h de hidrólise. Portanto, a secagem de materiais lignocelulósicos não seria necessária para garantir bons resultados de sacarificação enzimática do bagaço. Por outro lado, o processamento de materiais de baixo teor de umidade comprometeria em parte o rendimento de recuperação dos carboidratos, mas geraria substratos de acessibilidade superior aos derivados de amostras de bagaço com alto teor de umidade.

CONCLUSÃO

O pré-tratamento a vapor de amostras de bagaço de cana com alto

teor de umidade proporcionou um aumento considerável nos índices de recuperação de celulose, hemiceluloses e lignina, em comparação com experimentos realizados com amostras de baixo teor de umidade. Por outro lado, aumentos no teor de umidade apresentaram um efeito negativo sobre os rendimentos de hidrólise enzimática dos materiais pré-tratados, mas esta influência pode ser revertida pelo uso de condições mais drásticas de pré-tratamento. No entanto, o uso de altas temperaturas e elevados tempos de residência no reator causaram perdas significativas de rendimento que são, geralmente, acompanhadas pela eventual geração de inibidores de fermentação. Portanto, o pré-tratamento realizado com bagaço úmido, obtido diretamente da linha de produção ou reidratado a partir de amostras de baixo teor de umidade, permite a obtenção dos maiores índices de recuperação dos principais componentes da parede celular, paralelamente à produção de substratos celulósicos de alta susceptibilidade à hidrólise enzimática.

AGRADECIMENTOS

À CAPES, pela concessão de bolsa de estudos para A. P. Pitarelo, ao CNPq (Processo 481637/2007-9) e à Fundação Araucária, pelo aporte financeiro a esta linha de pesquisa.

REFERÊNCIAS

- Ramos, L. P.; *Quim. Nova* **2003**, *26*, 863.
- Carrasco, C.; Baudel, H. M.; Sendelius, J.; Modig, T.; Roslander, C.; Galbe, M.; Hahn-Hägerdal, B.; Zacchi, G.; Lidén, G.; *Enzyme Microb. Technol.* **2010**, *46*, 64.
- Soccol, R. C.; Vandenberghe, L. P. S.; Medeiros, A. B. P.; Karp, S. G.; Buckeridge, M.; Ramos, L. P.; Pitarelo, A. P.; Ferreira-Leitão, V.; Gottschalk, L. M. F.; Ferrara, M. A.; Bon, E. P. S.; Moraes, L. M. P.; Araújo, J. A.; Torres, F. A. G.; *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 4820.
- Geddes, C. C.; Peterson, J. J.; Zacchi, G.; Multinnix, M. T.; Shanmugan, K. T.; Ingram, L. O.; *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 1857.
- Sánchez, O. J.; Cordona, C. A.; *Bioresour. Technol.* **2008**, *88*, 5270.
- Sukumaran, R. K.; Singhanian, R. R.; Mathew, G. M.; Pandey, A.; *Renewable Energy* **2009**, *34*, 421.
- Alvira, P.; Tomás-Pejojó, E.; Ballesteros, M.; Negro, M. J.; *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 4851.
- Cardona, C. A.; Quintero, J. A.; Paz, I. C.; *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 4654.
- Gírio, F. M.; Fonseca, C.; Carvalheiro, F.; Duarte, L. C.; Marques, S.; Bogel-Lukasik, R.; *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 4775.
- Balat, M.; *Energy Conversion and Management* **2011**, *52*, 858.
- Mosier, N.; Wyman, C.; Dale, B.; Elander, R.; Lee, Y. Y.; Holtzapple, M.; Ladish, M.; *Bioresour. Technol.* **2005**, *96*, 673.
- Excoffier, G.; Toussaint, B.; Vignon, M. R.; *Biotechnol. Bioeng.* **1991**, *38*, 1308.
- Ramos, L. P.; Sessler, J. N.; *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.* **1994**, *566*, 325.
- Hendriks, A. T. W. M.; Zeeman, G.; *Bioresour. Technol.* **2009**, *100*, 10.
- Hernández-Salas, J. M.; Villa-Ramírez, M. S.; Veloz-Rendón, J. S.; Rivera-Hernández, K. N.; González-César, R. A.; Plascencia-Espinosa, M. A.; Trejo-Estrada, S. R.; *Bioresour. Technol.* **2009**, *100*, 1238.
- Ramos, L. P.; Breuil, C.; Kushner, D. J.; Sessler, J. N.; *Holzforchung* **1992**, *46*, 149.
- Brownell, H. H.; Sessler, J. N.; *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **1984**, *14*, 55.
- Brownell, H. H.; Yu, E. K. C.; Sessler, J. N.; *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **1986**, *28*, 792.
- Cullis, I. F.; Sessler, J. N.; Mansfield, S. D.; *Biotechnol. Bioeng.* **2004**, *85*, 413.
- Ewanick, S.; Bura, R.; *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 2651.
- Gomide, J. L.; Demuner, B. J.; *O Papel* **1986**, *46*, 36.

22. Dence, C. W.; Lin, S. Y.; *Methods in Lignin Chemistry*, Springer Verlag: New York, 1992.
23. Ghose, T. K.; *Pure Appl. Chem.* **1987**, *59*, 257.
24. Overend, R. P.; Chornet, E.; *Phil. Trans. R. Soc. London*, **1987**, *A321*, 523.
25. Hodge, D. B.; Karim, M. N.; Schell, D. J.; McMillan, J. D.; *Bioresour. Technol.* **2008**, *99*, 8940.
26. Sineiro, J.; Dominguez, H.; Núñez, M. J.; Lema, J. M.; *Biotechnol. Lett.* **1997**, *19*, 524.
27. Ramos, L. P.; Cotrim, A. R.; Silva, F. T.; Chen, C. L.; *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 2992.
28. Bura, R.; Chandra, R.; Saddler, J. N.; *Biotechnol. Prog.* **2009**, *25*, 315.
29. Adsul, M. G.; Ghule, J. E.; Shaikh, H.; Singh, K. B.; Gokhale, D. V.; *Carbohydr. Polym.* **2005**, *62*, 6.
30. Shevchenko, S. M.; Beatson, R. P.; Saddler, J. N.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1999**, *77*, 867.
31. Mooney, C. A.; Mansfield, S. D.; Touhy, M. G.; Saddler, J. N.; *Bioresour. Technol.* **1999**, *64*, 113.
32. Weng, J.; Li, X.; Bonawitz, N. D.; Chapple, C.; *Curr. Opin. Biotechnol.* **2008**, *19*, 166.
33. Polonen, H.; Tjerneld, F.; Zacchi, G.; Tenkanen, M.; *J. Biotechnol.* **2004**, *107*, 65.
34. Sun, Y.; Cheng, J.; *Bioresour. Technol.* **2002**, *83*, 1.