

Eixo Temático ET-04-007 - Energia

ESTUDO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADA VISANDO A PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

Cybele Crystinne do Prado Marinho, Laís Campos Teixeira de Carvalho Gonçalves,
Solange Maria de Vasconcelos

Universidade Federal da Paraíba, Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional.

RESUMO

A possibilidade de esgotamento das fontes de combustíveis fósseis associada à crescente preocupação mundial com o meio ambiente, principalmente devido à emissão de gases que contribuem para o fenômeno do efeito estufa, têm impulsionado a busca pelo uso de energias renováveis. O etanol se apresenta como um dos combustíveis renováveis mais favoráveis na matriz energética de muitos países como forma de reduzir a dependência pelos combustíveis fósseis, podendo ser produzido a partir de diferentes matérias-primas, por exemplo. No Brasil, a cana-de-açúcar é a matéria-prima utilizada para a produção de etanol de primeira geração, sendo gerados como resíduos ou subprodutos o bagaço e palha de cana, materiais lignocelulósicos com um grande potencial para aumentar produção de etanol sem a necessidade de aumentar a área de cultivo. A palha da cana-de-açúcar se destaca como fonte energética entre os diferentes tipos de biomassa, e apresenta um grande potencial de geração de calor, eletricidade e produção de etanol celulósico. O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo da hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar pré-tratada, visando a produção de etanol de segunda geração. Realizou-se a hidrólise enzimática, empregando a enzima comercial Cellulase Blend (SAE 0020) da Sigma-Aldrich®, nas seguintes condições: 50 °C, agitação constante de 150 rpm em shaker agitador, pH 4,8 em tampão citrato de sódio. Avaliou-se a influência das concentrações de substrato (palha pré-tratada) e de enzima, seguindo um planejamento fatorial 2², com três pontos centrais, totalizando 7 experimentos. No estudo da hidrólise, utilizou-se como substrato a fração sólida obtida na condição de pré-tratamento com H₂SO₄ 0,3 M; 60 min e 100 °C (condição que liberou a maior concentração de açúcar redutor e apresentou maiores modificações estruturais, quando analisada pelo método FTIR). Observou-se que as concentrações de açúcares redutores liberados foram praticamente constantes entre 48 e 72 horas, assim, decidiu-se avaliar a sua eficiência em função de açúcares redutores liberados, no tempo de 48 horas. Os resultados obtidos mostraram que as maiores concentrações de açúcares redutores foram de 12,84 e 15,51 g/L, que corresponde às condições nas quais se utilizou maior carga de fração sólida (substrato), sendo de 10% (m/v). Através da análise estatística verificou-se que a concentração de substrato e a interação entre a concentração de substrato e concentração de enzima foram os fatores estatisticamente significativos a 95% de confiança, sendo o modelo de primeira ordem que representa a concentração de AR, preditivo e significativo.

Palavras-chave: Palha de cana-de-açúcar; Hidrólise enzimática; Etanol de segunda geração.

INTRODUÇÃO

A possibilidade de esgotamento das fontes de combustíveis fósseis associada à crescente preocupação mundial com o meio ambiente, principalmente devido à emissão de gases que contribuem para o fenômeno do efeito estufa, têm impulsionado a busca pelo uso de energias renováveis. Assim, surge um interesse grande pelo uso de biocombustíveis, os quais são menos poluentes, sendo que o etanol se apresenta como um dos mais favoráveis na matriz energética de muitos países como forma de reduzir a dependência pelos combustíveis fósseis,

podendo ser produzido a partir de diferentes matérias-primas, como a cana-de-açúcar, arroz, milho, entre outras fontes, sendo denominado com etanol de primeira geração (ANDRADE et al., 2019; BUSSAMRA, 2014; RESENDE, 2016).

O Brasil é um grande produtor de etanol de cana-de-açúcar e, durante esse processo são gerados resíduos de origem vegetal, também chamados de lignocelulósicos, como a palha e o bagaço. O bagaço usualmente é denominado como subproduto, uma vez que em grande parte é usado na geração de energia que abastece as próprias usinas de açúcar e álcool, e o excedente vendido para as concessionárias de energia elétrica. Esses materiais lignocelulósicos também podem ser utilizados para a produção etanol (etanol de segunda geração). Assim, o Brasil apresenta um grande potencial para se tornar um dos maiores produtores mundiais de etanol (BUSSAMRA, 2014; RESENDE, 2016; NOVACANA, 2017).

A palha da cana-de-açúcar por ser um material lignocelulósico se evidencia como fonte energética entre os diferentes tipos de biomassa, e apresenta um grande potencial de geração de calor, eletricidade e produção de etanol celulósico (SANTOS, 2013).

O material lignocelulósico é uma estrutura cristalina vegetal altamente firme e fibrosa, constituída dos polissacarídeos de celulose, hemicelulose, lignina, além de pequenas quantidades de extrativos e minerais, e que para suas estruturas serem rompidas necessitam de alguns processos. Inicialmente, é necessário um pré-tratamento, onde ocorrerá a separação das frações de celulose, hemicelulose e lignina. Em seguida, o material pré-tratado é submetido a um processo de hidrólise enzimática ou ácida, para que possa chegar aos açúcares fermentescíveis e, então assim ocorra a fermentação da glicose para a produção de etanol (RODRIGUES et al., 2017).

A hidrólise enzimática é definida como uma reação química na qual uma enzima quebra uma molécula em outras menores. As enzimas são proteínas bastante complexas que reduzem a energia de ativação solicitada na reação e funcionam como catalisadores sendo responsáveis pelas diferentes fases do metabolismo (GRANBIO, 2018; HIJAZIN et al., 2010). No caso da celulose, um polímero de glicose, a enzima celulase irá atuar promovendo a despolimerização da celulose em glicose, um açúcar fermentescível. Os rendimentos de hidrólise são influenciados por diversos fatores tais como: o tipo de pré-tratamento efetuado no substrato, ocorrência do conteúdo de hemicelulose presente e de lignina; aparecimento de celobiose (produto intermediário) no meio reacional o qual inibe a ação da enzima; temperatura, concentração do substrato; a velocidade de agitação (ARAÚJO et al., 2013; CARVALHO, 2011). A cristalinidade e o grau de polimerização da celulose; tamanho das partículas do material também são fatores importantes para uma hidrólise com melhores rendimentos (BUSSAMRA, 2014).

OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo da hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar, submetida previamente ao processo de pré-tratamento, visando a produção de etanol de segunda geração.

METODOLOGIA

O trabalho foi desenvolvido nos laboratórios de Tecnologia Sucroalcooleira, Operações Unitárias e de Microbiologia localizados no Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional da UFPB.

Matéria-prima

A palha da cana-de-açúcar (safra 2017/2018) utilizada no desenvolvimento do presente trabalho foi cedida pela Usina Japungu Agroindustrial S.A., localizada no município de Santa Rita – PB, e encaminhada ao Laboratório de Tecnologia Sucroalcooleira da Universidade Federal da Paraíba em sacos plásticos de 15 L. Inicialmente a palha passou por um processo de

lavagem em água corrente com o auxílio de uma peneira para remoção da areia remanescente e ao final do processo foi colocada sobre uma lona para secagem ao ar livre, sob o sol. Após a secagem, a palha foi submetida à moagem no moinho de facas (SOLAB/SL-31), em seguida foi peneirada em peneira elétrica (MATEST/R-813800) de 12 mesh para uniformização da sua granulometria. Posteriormente, a palha foi submetida a diferentes condições de pré-tratamento, com variação dos seguintes fatores: tempo, temperatura e concentração de ácido sulfúrico. Após o pré-tratamento e análises realizadas, a fração sólida obtida que apresentou melhor resultado, em termos de maior solubilização de componentes macromoleculares e maiores modificações estruturais, as quais foram evidenciadas através de análise utilizando a técnica analítica da espectroscopia na região do infravermelho por transformadas de Fourier (FTIR), seguiu para uma estudo de hidrólise enzimática.

Hidrólise Enzimática

A fração sólida obtida após o pré-tratamento da palha sob as condições: H₂SO₄ 0,3 M; 60 min e 100 °C, foi submetida ao estudo de hidrólise enzimática. As reações enzimáticas foram realizadas seguindo um planejamento experimental fatorial 2² com 3 (três) pontos centrais e 4 (quatro) combinações únicas, totalizando 7 (sete) ensaios. Os fatores independentes avaliados foram a concentração de sólido (substrato) e a concentração de enzima. As análises do planejamento foram realizadas através do software Statistica (Statsoft 7.0, EUA).

As Tabelas 1 e 2 apresentam os níveis das variáveis independentes e níveis codificados e a matriz do planejamento experimental fatorial, respectivamente.

Tabela 1. Níveis das variáveis independentes para o estudo de hidrólise enzimática.

Variáveis Independentes	Símbolo	Limites		
		- 1	0	+1
Concentração de sólido (%, m/v)	CS	2	6	10
Concentração enzima (FPU/g _{sólido})	CE	5	15	25

Tabela 2. Matriz do planejamento fatorial 2².

Ensaio	Conc. de sólido (%m/v)	Conc. de enzima (FPU/g _{sólido})
1	2 (-1)	5 (-1)
2	10 (+1)	5 (-1)
3	2 (-1)	25 (+1)
4	10 (+1)	25 (+1)
5	6 (0)	15 (0)
6	6 (0)	15 (0)
7	6 (0)	15 (0)

Os experimentos de hidrólise enzimática foram realizados utilizando-se a enzima comercial Cellulase Blend (SAE 0020) da Sigma-Aldrich®, em frascos Erlenmeyers de 250 mL. O volume reacional foi de 50 mL, sendo as massas da fração sólida ajustadas, de forma atender as concentrações definidas no planejamento fatorial (Tabela 2) e adicionadas aos Erlenmeyers.

A enzima, cuja atividade enzimática total (167,66 FPU/mL), determinada segundo metodologia especificada por Ghose (1987), com pequenas adaptações, foi diluída em tampão citrato de sódio 50 mM – pH 4,8 de forma a atender concentração definida no planejamento fatorial. Após adição da fração sólida e da solução de enzima, os Erlenmeyers foram fechados com papel alumínio e papel filme, para que não ocorresse qualquer alteração considerável dos volumes reacionais e, posteriormente foram incubados em uma incubadora shaker (LUCA-

223/LUCADEMA) com rotação constante de 150 rpm e temperatura ajustada para 50 °C. Antes da adição de sólido foram retiradas amostras da solução de enzima, de cada concentração diferente definida no planejamento, as quais foram submetidas à análise posterior, servindo como branco (determinação de açúcar redutor presente na enzima).

As reações de hidrólise foram conduzidas por um período total de 72 horas, sendo retiradas amostras no decorrer do processo (24, 48 e 72 horas). Tanto a amostra que serviu como branco, quanto as amostras retiradas durante o processo de hidrólise, foram submetidas a um banho em ebulição e banho de gelo para desativação da enzima. Posteriormente, foram centrifugadas e o sobrenadante submetido à análise de açúcares redutores pelo método do DNS.

Para as análises dos açúcares redutores liberados foram usados tubos de ensaio com 0,5 mL de DNS e adicionados 0,5 do sobrenadante retirado, em seguida colocado em banho termostático (LOGEN/LSRE-52CS-BA) a 100 °C por 5 min, em seguida foi resfriado em banho de gelo. Após o resfriamento, foram adicionados 4 mL de água destilada e centrifugada na centrífuga (NOVA/NI-1811) e o sobrenadante foi submetido à leitura no espectrofotômetro (EDUTEK/EEQ-9005) a 540 nm. Os valores das absorbâncias foram substituídos na equação obtida da curva de calibração, previamente preparada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Hidrólise enzimática

O estudo da hidrólise enzimática aplicado ao material sólido obtido após o pré-tratamento da palha conforme as condições de ensaio 8 do planejamento foi realizado segundo as condições descritas na etapa de hidrólise enzimática.

A Figura 1 mostra os perfis de concentrações de açúcares redutores liberados nos ensaios de hidrólise ao longo do tempo. É possível observar que, de forma geral, houve pouca variação nas concentrações entre 48 e 72 horas de hidrólise. Entre 24 e 48 horas, a maior variação nas concentrações ocorreu para as condições de hidrólise 1 e 3, condições em que se utilizou a menor concentração de sólido (2%, m/v). As maiores concentrações foram obtidas nas condições experimentais 2 (10% m/v de sólido e 5 FPU/g sólido) e 4 (10% m/v de sólido e 25 FPU/g sólido).

Percebe-se ainda que as hidrólises apresentaram um comportamento esperado de acordo com o reportado na literatura, podendo ser finalizada em 48 h de hidrólise, já que, a glicose se manteve quase estável após este período (OLIVEIRA, 2010; ROCHA, 2018; SANTOS 2018; SOUZA, 2016).

Devido ao fato das concentrações de açúcares redutores liberados terem sido praticamente constantes entre 48 e 72 horas, decidiu-se avaliar a eficiência da hidrólise em função de açúcares redutores liberados, no tempo de 48 horas (Tabela 3).

Tabela 3. Matriz do planejamento fatorial 2² para a hidrólise enzimática.

Ensaio	Concentração de sólido (%m/v)	Concentração de enzima (FPU/g sólido)	AR*(g/L) Ensaio 8 – pré-tratamento
1	2 (-1)	5 (-1)	6,84
2	10 (+1)	5 (-1)	12,84
3	2 (-1)	25 (+1)	4,37
4	10 (+1)	25 (+1)	15,51
5	6 (0)	15 (0)	10,43
6	6 (0)	15 (0)	10,57
7	6 (0)	15 (0)	9,18

* AR = açúcares redutores. Ensaio 8 (H₂SO₄ 0,3 M; 60 min; 100 °C).

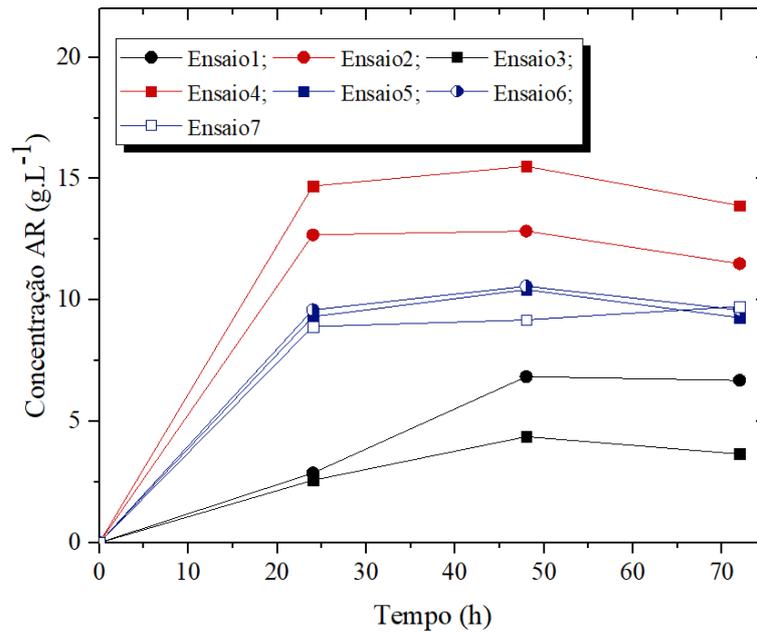


Figura 1. Perfis de concentrações de açúcares redutores liberados na hidrólise enzimática da fração sólida obtida do ensaio 8 (H₂SO₄ 0,3 M, 60 min, 100 °C), utilizando a enzima comercial Cellulase Blend (SAE 0020) da Sigma-Aldrich®.

Através dos resultados apresentados na Tabela 3, observou-se que as maiores concentrações de açúcar redutor foram de 12,84 e 15,51 g/L (correspondentes aos experimentos 2 e 4, respectivamente), nos quais se empregaram maior carga de sólido, sendo de 10% (m/v). Martínez (2014) ao submeter a palha de cana-de-açúcar pré-tratada hidrotérmicamente (195 °C, 10 min) à hidrólise enzimática (com uma carga de sólidos de 10%, m/v e uma carga de 10 FPU/g_{celulose}), conseguiu obter uma concentração de glicose de aproximadamente 30 g/L. Porém, é importante observar que ele trabalhou com condições mais severas que as empregadas neste trabalho, o que provavelmente levou a uma maior remoção da fração de hemicelulose, deixando a celulose mais acessível às enzimas.

É importante chamar a atenção também ao fato das concentrações de açúcar redutor terem se mantido praticamente constantes entre 48 e 72 horas, isso pode ter ocorrido devido à inibição da enzima pelo produto intermediário (celobiose), a qual pode ser liberada durante o processo de hidrólise como já observado em diversos trabalhos reportados pela literatura (MARTÍNEZ, 2014; PRATTO, 2015). Outro fato importante, é que os pré-tratamentos com ácido diluído, como o empregado neste trabalho, promovem pouca remoção de lignina (SANTOS, 2013) e a lignina, por sua vez, pode dificultar o processo de hidrólise enzimática, no caso a celulose presente na fração sólida.

Realizou-se a análise estatística, através do software Statistica (Statsoft 7.0, EUA), sobre influência das variáveis concentração de sólido (CS) e da concentração de enzima (CE) sobre a liberação de açúcares redutores no hidrolisado enzimático, no tempo de 48 de hidrólise, sendo os fatores concentração de sólido (CS) e a interação entre a concentração de sólido e concentração de enzima (CS x CE) apresentaram estatisticamente significativos, a 95% de confiança, conforme pode ser visto através do diagrama de Pareto (Figura 2).

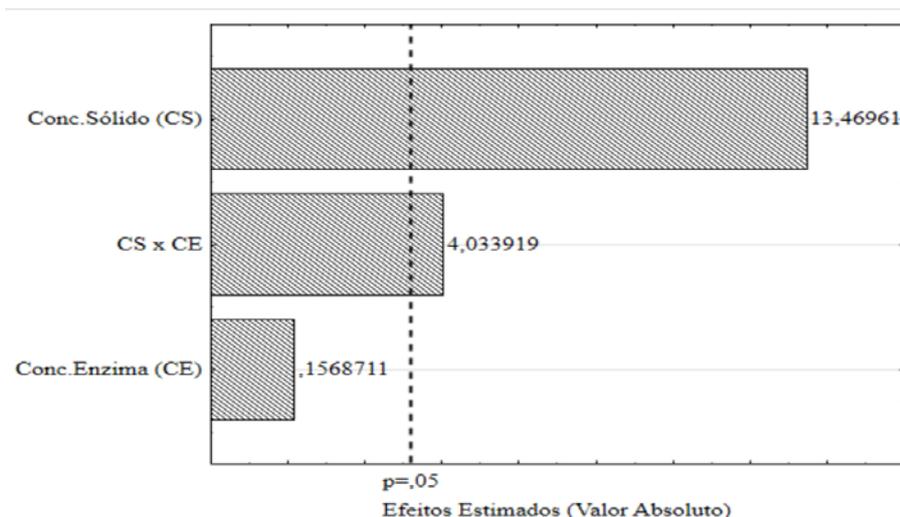


Figura 2. Diagrama de Pareto para os açúcares redutores liberados no processo de hidrólise enzimática.

Em estudo cinético aplicado à hidrólise enzimática de palha de cana-de-açúcar pré-tratada hidrotermicamente a 195 °C, Pratto (2015) concluiu que a velocidade inicial da reação aumentou com o aumento da concentração inicial de enzima, entretanto ao longo do tempo, para concentrações muito altas de enzima, o substrato se tornou limitante, por não estar presente em quantidade suficiente para ocupar os sítios ativos livres das enzimas. Os resultados obtidos no presente estudo, estão coerentes com os obtidos por Pratto (2015), visto que nas condições aplicadas, a concentração de enzima não apresentou significância estatística a 95% de confiança.

Objetivando a obtenção de um modelo codificado que representa a concentração de açúcares redutores no hidrolisado enzimático, foi realizada a análise de coeficientes de regressão (Tabela 4).

Tabela 4. Coeficientes de regressão para os açúcares redutores liberados no hidrolisado enzimático, em 48 horas (palha pré-tratada nas condições: H₂SO₄ 0,3 M, 60 min, 100 °C).

	Coeficiente de regressão	Desvio padrão	p	Limite de Confiança (- 95%)	Limite de Confiança (95%)
Média	9,96	0,24	0,000031*	9,20	10,73
Concentração de palha (CS)	4,29	0,32	0,000885*	3,27	5,30
Concentração de enzima (CE)	0,05	0,32	0,885309	-0,96	1,06
CS x CE	1,28	0,32	0,027396*	0,27	2,30

p: probabilidade de significância – p < 0,05 (estatisticamente significativo a 95% de confiança).

*Fatores significativos (p < 0,05).

O modelo codificado que representa a concentração de açúcares redutores liberado no hidrolisado enzimático, estão representados na Equação 1.

$$AR \left(\frac{g}{L} \right) = 9,96 + 4,29CS + 0,05 CE + 1,28 CS \times CE \quad (1)$$

Os dados da análise de variância (ANOVA) do modelo obtido, encontram-se apresentados na Tabela 5, onde é possível observar uma boa correlação ($R^2 = 98,51\%$) do modelo de primeira ordem obtido pelo planejamento experimental fatorial 2² aplicado ao

processo de hidrólise enzimática. Além disso, observa-se que o valor F calculado ($F_{\text{calc}} = 65,91$) se apresentou muito superior ao F tabelado ($F_{0,05;3;3} = 9,28$), sendo o modelo de primeira ordem que representa a concentração de açúcar redutor no hidrolisado enzimático, significativo e preditivo, pois para que uma regressão seja preditiva, o valor do teste F ($F_{\text{calc}}/F_{\text{tabelado}}$) deve ser no mínimo maior que 4 (BARROS NETO, 1996 apud SANTOS et al., 2008).

Tabela 5. Análise de variância (ANOVA) para AR liberados no hidrolisado enzimático em 48 horas.

	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	F_{calc}	R^2 (%)
Regressão	80,09	3	26,70	65,91	98,51
Resíduo	1,22	3	0,41		
Falta de ajuste	0,05	1			
Erro puro	1,17	2			
Total	81,31	6			

$F_{0,05;3;3} = 9,28$ (Teste F = $F_{\text{calc}}/F_{\text{tab}} = 7,10$).

A Figura 3 ilustra o gráfico de superfície de resposta referente à concentração de açúcar redutor liberado, na hidrólise enzimática, construído com base no modelo apresentado representado pela Equação 1.

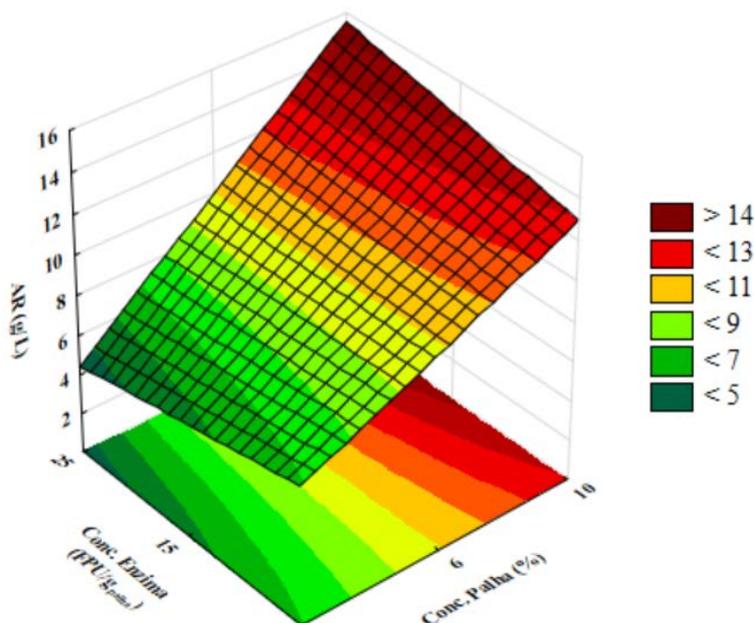


Figura 3. Superfície de resposta para os AR liberados após em 48 h de hidrólise enzimática (palha pré-tratada nas condições: H_2SO_4 0,3 M; 60 min; 100 °C).

Percebe-se a partir da Figura 3 que as maiores concentrações de açúcares redutores foram obtidas quando se aumentou a concentração de palha (concentração de substrato – CS), sendo a concentração máxima alcançada de aproximadamente 16 g/L, nas condições aplicadas.

CONCLUSÕES

A hidrólise enzimática da fração sólida obtida após o pré-tratamento (H_2SO_4 0,3 M; 60 minutos e 100 °C) apresentou concentrações de açúcares redutores de 12,84 e 15,51 g/L, sendo os fatores concentração de sólido e interação concentração de sólido e concentração de enzima,

estatisticamente significativos a 95% de confiança, nas condições aplicadas no presente trabalho. Através dos dados da análise de variância (ANOVA) do modelo obtido pode-se dizer que o modelo que representa a concentração de açúcares redutores no hidrolisado enzimático, foi significativo e preditivo. O trabalho demonstrou que o aumento da concentração de enzima nem sempre levará ao aumento significativo da concentração de açúcar redutor liberado no hidrolisado. Isso é um fator positivo sob o ponto de vista industrial, visto que altas concentrações de enzima podem tornar o processo mais oneroso.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, T. C. C.; BITENCOURT, W. C.; BOMTEMPO, F. V. S.; ALVES, F. S.; BARBOSA, R. S.; GUARDA, E. A. Hidrólise enzimática de celulose para obtenção de glicose utilizando líquido iônico como meio solvente. **Revista Virtual Química**, v. 11, n. 1, p. 310-325, 2019.
- ARAÚJO, C. E.; GARRIDO, C. V. S.; SANTOS, J. M. G. M.; LEAL, S. C. S.; CAMPOS, L. M. A. Estudo das rotas de hidrólise química e biológica para a produção de etanol de segunda geração a partir de resíduos lignocelulósicos. In: XII SEPA - Seminário Estudantil de Produção Acadêmica. Salvador: UNIFACS, 2013.
- BARROS NETO, B.; SCARMÍNIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos: pesquisas e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas: UNICAMP. 401p. 2001.
- BUSSAMRA, B. C. **Melhoramento de coquetéis enzimáticos para a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar**. Campinas: 124p., 2014. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
- CARVALHO, M. L. **Estudo cinético da hidrólise enzimática de celulose de bagaço de cana-de-açúcar**. São Carlos, 103 p., 2011. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos.
- GRANBIO. 2018. Disponível em: <<http://www.granbio.com.br/biotecpedia/hidroliseenzimatica/>>. Acesso em: 28 nov. 2018.
- GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure & Appl. Chem.**, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.
- HIJAZIN. C. A. H. SIMÕES, A. T. SILVEIRA, D. R. Hidrólise ácida, alcalina e enzimática. **Revista Atitude**, v. 4, n. 7, p. 89-93, 2010.
- MARTÍNEZ, J. D. A. **Modelagem cinética da hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar pré-tratada hidrotermicamente**. Rio de Janeiro, 2014. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- NOVACANA. 2017. Disponível em: <<https://www.novacana.com/etanol/materiasprimas/>>. Acesso em: 30 mai0 2019.
- OLIVEIRA, F. M. V. Avaliação de diferentes pré-tratamentos e deslignificação alcalina na sacarificação da celulose de palha de cana. Lorena, 101 p.,2010. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo.
- RESENDE, R. R. **Biотecnologia aplicada à agro&indústria: fundamentos e aplicações**. São Paulo: Blucher, 2016. v. 4.
- PRATTO, B. **Hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar: Estudo cinético e modelagem matemática semi-mecanística**. São Carlos: UFSCar, 130 p., 2015. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos.

ROCHA, M. S. R. S. **Estudo integrado das etapas de pré-tratamento e hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar**. São Carlos: UFSCAR, 143 p., 2017. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Carlos.

RODRIGUES, C. WOICIECHOWSKI, A. L.; LETTI, L. A. J.; KARP, S. G.; GOELZER, F. D.; SOBRAL, K. C. A.; CORAL, J. D.; CAMPIONI, T. S.; MACENO, M. A. C.; SOCCOL, C. R. Materiais lignocelulósicos como matéria-prima para a obtenção de biomoléculas de valor comercial. In: RESENDE, R. R. **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria**. São Paulo: Blucher, 2017. v. 4. p. 283-314.

SANTOS, A. M. **Caracterização química da biomassa: Potencial da palha da cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração**. Rio Largo: UFAL, 65 p., 2013. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Alagoas.

SANTOS, F. A. **Avaliação do pré-tratamento hidrotérmico de palhas de cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda geração**. Viçosa: UFV, 112 p., 2018. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

SOUZA, R. B. A. **Estudo do pré-tratamento hidrotérmico e hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar**. São Carlos: UFSCAR, 124 p., 2016. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Carlos.