

## Otimização dos processos de obtenção de açúcares redutores totais (ART) a partir do bagaço de abacaxi

### Optimization of processes to obtain total reducing sugars (TSA) from pineapple bagasse

DOI:10.34117/bjdv9n4-096

Recebimento dos originais: 17/03/2023

Aceitação para publicação: 19/04/2023

#### **Mariana Bisinotto Pereira**

Mestre em Engenharia Química

Instituição: Universidade Estadual de Maringá

Endereço: Avenida Colombo, 5790, Zona 07, Maringá – PR, CEP: 87020-680

E-mail: bisinottoufg@gmail.com

#### **Fernanda Ferreira Freitas**

Doutora em Engenharia Química

Instituição: Universidade Federal de Goiás

Endereço: Avenida Esperança s/n, Câmpus Samambaia, CEP: 74690-900,  
Goiânia - Goiás

E-mail: fernanda\_ferreira\_freitas@ufg.br

#### **Paula Rúbia Ferreira Rosa**

Doutora em Engenharia Química

Instituição: Universidade Federal de São Carlos

Endereço: Rod. Washington Luiz, s/n - Monjolinho, São Carlos - SP, CEP: 13565-905

E-mail: paularosa@ufscar.br

#### **Araceli Aparecida Seolatto**

Doutora em Engenharia Química

Instituição: Universidade Federal de Goiás

Endereço: Avenida Esperança s/n, Câmpus Samambaia, CEP: 74690-900,  
Goiânia - Goiás

E-mail: araceliseolatto@ufg.br

#### **RESUMO**

Com a crescente e competitiva demanda do etanol em relação aos combustíveis fósseis surgiu um novo desafio no cenário mundial: aumentar a produção sem aumentar a área plantada, evitando assim a competitividade por espaço com outras culturas alimentícias, caso no qual se enquadra a proposta do etanol de segunda geração. Neste sentido, este trabalho teve por objetivo a análise do desempenho do bagaço do abacaxi como possível biomassa para a produção de etanol de 2ª geração. Foi avaliada a etapa de hidrólise enzimática, visando a maior obtenção de ART (Açúcares Redutores Totais). Verificou-se através da análise dos dados que os maiores valores de ART são obtidos para as menores concentrações de peróxido juntamente com as menores temperaturas e os menores tempos de reação. Observa-se ainda, que utilizando todas as variáveis em seus maiores níveis obtém-se as piores resposta de ART. Observamos que em ambas as granulometrias

estudadas do bagaço, 20 e 48 mesh, foram obtidas respostas para a hidrólise enzimática, muito próximas em seu perfil.

**Palavras-chave:** material lignocelulósico, hidrólise enzimática, açúcares redutores totais.

## ABSTRACT

With the growing and competitive demand for ethanol in relation to fossil fuels, a new challenge has arisen on the world scene: to increase production without increasing the planted area, thus avoiding competition for space with other food crops, a case in which the proposal of second generation ethanol fits. In this sense, this work aimed to analyze the performance of pineapple bagasse as a possible biomass for the production of second generation ethanol. The stage of enzymatic hydrolysis was evaluated, aiming at the highest obtainment of TSA (Total Reducing Sugars). It was verified through data analysis that the highest values of ART are obtained for the lowest concentrations of peroxide along with the lowest temperatures and the shortest reaction times. It is also observed that using all variables at their highest levels the worst ART response is obtained. We observed that in both studied granulometries of the bagasse, 20 and 48 mesh, responses for the enzymatic hydrolysis were obtained, very close in their profile.

**Keywords:** lignocellulosic material, enzymatic hydrolysis, total reducing sugars.

## 1 INTRODUÇÃO

Os combustíveis fósseis sempre foram motivos de discussões, preocupações e até mesmo armas políticas, tendo como exemplo claro a Crise do Petróleo em 1973 que acabou sendo uma das principais razões para a criação do Programa Nacional do Álcool (Proálcool) em 1975 (IPEA, 2010). A partir desse momento até 1990 o programa foi gerenciado pelo Instituto do Açúcar e do Álcool (IAA) que além de administrar e facilitar o avanço do setor, também regulamentava os preços, e as quotas de produção (MARJOTTA-MAISTRO, 2002). O cenário começou a mudar em 1990 com o início da extinção do IAA e início da abertura do setor sucroalcooleiro. Apesar das crises enfrentadas, o setor mostrou-se bastante promissor.

A produção global de biocombustíveis (etanol, biodiesel e HVO) cresceu mais de 10 vezes entre 2000 e 2019. Até 2026, a Agência Internacional de Energia estima que a produção global cresça 6,8% ante o recorde de 2019, com o maior avanço ocorrendo na Ásia e Pacífico, que têm a previsão de crescer 52,9% em relação a 2019. Para o Brasil, a projeção é de um aumento de cerca de 11,7% nesse período, sendo responsável pelos maiores aumentos no consumo e produção de etanol. (IBP, 2023). Os biocombustíveis tendem inclusive substituírem os combustíveis de transporte pesado à base de petróleo

como também transportes para longas distâncias, navegação marítima e aviação, principalmente no que se referem combustíveis de baixa emissão de carbono (IEA, 2015).

Embora a biomassa da cana-de-açúcar ou mesmo o seu bagaço seja empregado veementemente na fabricação do bioetanol, seja ele de primeira ou segunda geração, há um alerta para que novas biomassas tão atrativas quanto à cana sejam descobertas, principalmente quando voltado para um aproveitamento de resíduos. Os incentivos econômicos são necessários em função do custo competitivo da produção de energia a partir de biomassa, justificado principalmente pela segurança energética e ambiental associados a uma bioenergia sustentável (IEA, 2015).

O bioetanol de segunda geração apresenta grande potencial de crescimento, não por apenas depender da produção de alimentos para sua industrialização e nem tão pouco da expansão da área plantada, mas sim do reaproveitamento dos resíduos da produção, logo a principal vantagem do bagaço está na logística, pois como se trata de um coproduto já se encontra disponível (Araújo et al., 2013). Podendo ser transformados não apenas em matérias-primas para processos secundários, como também em produtos comerciais.

No entanto, estes materiais lignocelulósicos possuem uma estrutura complexa e compacta, necessitando de pré-tratamentos que possam auxiliar principalmente na remoção da lignina e hemicelulose, permitindo a redução da cristalinidade e aumento da porosidade do material, possibilitando que a celulose torne suscetível à hidrólise. Porém, é uma das etapas mais caras do processo de conversão da biomassa em açúcares fermentescíveis, embora necessária por aumentar a eficiência e diminuir o custo do processo de desenvolvimento e pesquisa (LEE *et al.*, 1994; LYND *et al.*, 1996; MOSIER *et al.*, 2005).

O uso do pré-tratamento alcalino possui por finalidade o efeito que as bases exercem sobre a lignina, ou seja, sua efetiva solubilização, proporcionando um aumento da digestibilidade da celulose. Além disso, os pré-tratamentos alcalinos exibem baixa solubilização da hemicelulose, como também da celulose quando comparados a outros pré-tratamentos como ácidos ou hidrotérmicos.

A hidrólise enzimática envolve a ação sinérgica entre enzimas celulolíticas que embora apresentem um elevado custo (ZHANG *et al.*, 2006), podem ser conduzidas em condições moderadas, diferentemente do que ocorre na hidrólise ácida, que exigem altas temperaturas e elevadas pressões, a hidrólise enzimática pode operar em pressões atmosférica e temperaturas, em torno de 50°C, além disso, não há formação de produtos que decompõem os monômeros. Porém, essas enzimas celulolíticas são incapazes de

catalisar uma completa e rápida hidrólise da celulose, isso implica em taxas de conversão que dependem do tipo de resíduo utilizado, além do tempo de hidrólise e a concentração de enzima aplicada (BASSO, 2010).

Estudos têm sido realizados na tentativa de detectar enzimas que sejam capazes de hidrolisar a celulose de uma forma mais efetiva, ora pela combinação de enzimas para obtenção de complexos mais eficientes ou pelo melhoramento de espécies (engenharia genética), ora, pela otimização dos processos fermentativos (MARTINS, 2005).

Assim sendo, este trabalho teve por objetivo a análise do desempenho dos bagaços do abacaxi como possível biomassa para a produção de etanol de 2ª geração. Foram avaliadas as etapas de pré-tratamento e hidrólise enzimática, com ênfase nas melhores condições das variáveis visando a maior obtenção de ART.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 PREPARO DOS BAGAÇOS

Os bagaços das frutas foram fornecidos pela indústria Doce Vida, localizada em Anápolis, Goiás. Antes de serem estocadas, as biomassas foram secas em estufa a 60 °C por cinco dias, sendo posteriormente armazenadas em recipientes hermeticamente fechados.

### 2.2 PRÉ-TRATAMENTO COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO ALCALINO

Amostras de 4g de biomassa em base seca de 20 e 48 mesh foram tratadas com 100 mL de solução de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), em frascos Erlenmeyer, e o pH ajustado para 11,5 pela adição de hidróxido de sódio sólido (NaOH), de acordo com a metodologia descrita por Krishna (2000). Foram transferidas para um agitador orbital tipo shaker sob agitação de 150 rpm. Após o tempo reacional, filtrou-se e lavou-se várias vezes com água destilada. A temperatura, o tempo de reação e a concentração do peróxido de hidrogênio foram estabelecidos pelo planejamento.

### 2.3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

As amostras do bagaço pré-tratados e secos em cada condição de estudo do pré-tratamento, foram transferidos para frascos de Erlenmyers e adicionado tampão acetato de sódio pH 4,8 ( pH ótimo da enzima).

Para a avaliação das condições do pré-tratamento, utilizou-se uma concentração da celulase de 9 FPU/g de biomassa seca. Os frascos de Erlenmyers foram vedados com

parafilm e encubados em shaker sob agitação a 150 rpm. Paralelamente, para que não haja subestimação nos resultados, e como o método escolhido foi o DNS, brancos da biomassa (biomassa apenas pré-tratada + tampão) correspondentes aos respectivos ensaios da hidrólise enzimática dos bagaços pré-tratados foram realizados. Com isto, após a hidrólise, os valores obtidos foram descontados desse ensaio com o intuito de quantificar apenas o que foi liberado após a hidrólise enzimática, e não o que já continha na biomassa inicial.

Foi realizado um primeiro estudo para avaliar o comportamento da influência da temperatura na atividade enzimática da celulase em função do tempo de hidrólise, isto porque pacotes comerciais de enzimas celulases possuem baixa concentração de  $\beta$ -glicosidases e estas requerem tempos maiores de reação, para converterem a celobiose em glicose, ocasionando um aumento da repressão catabólica do meio reacional. Em experimentos que demandam longos tempos como no caso da sacarificação da celulose, as  $\beta$ -glicosidases exercem ação efetiva e conseqüentemente influenciam no rendimento final (MARTINS, 2005). O mesmo autor comparando complexos celulásicos de *Trichoderma. reesei* e *Penicillium echinulatum* em diferentes substratos (polpas Kraft branqueadas e não branqueadas) observou que a *T.reesei* apresentava uma maior diferença, principalmente a partir de 11 h de reação, quando uma maior taxa de glicose era convertida. Logo a temperatura utilizada no decorrer da hidrólise enzimática foi de 50°C.

No intuito de analisar as variáveis do processo e as condições de pré-tratamento. Alíquotas de 1 mL do líquido reacional foram coletadas em tempos de 0, 3, 6, 12, 24, 48 e 60 h.

#### 2.4 QUANTIFICAÇÃO DOS AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS (ART)

Para a análise de açúcares redutores totais, adicionou-se 2 mL de reagente de DNS e 1 mL da amostra hidrolisada em tubos de ensaio, aqueceu-se a mistura em banho de água a 95°C durante 5 minutos para desenvolvimento de coloração avermelhada. Em seguida, resfriou-se a amostra em banho de gelo e completou-se o volume para 25 mL com água deionizada. A solução de referência foi preparada misturando 1 mL de água deionizada e 2 mL de DNS. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (faixa de 540 nm).

A curva-padrão foi obtida a partir da diluição da solução-mãe 10 mg/mL de glicose, preparando soluções de 0,1 a 3,8 mg/mL.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 3.1 PRÉ-TRATAMENTO COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO ALCALINO

Para avaliação da hidrólises enzimática no bagaço de abacaxi foi aplicado um delineamento composto central rotacional a três níveis, acrescidos de três réplicas no ponto central, 2<sup>3</sup> ensaios para a investigação e ainda seis experimentos nos pontos axiais ( $\alpha$ ) totalizando 17 experimentos realizados em triplicata. Foram quantificadas as variáveis de respostas em ART e perda de massa para ambas granulometrias da biomassa. Na Tabela 1 são apresentados os valores codificados e não codificados para cada uma das variáveis analisadas no pré-tratamento: tempo (h), temperatura (°C) e concentração de peróxido de hidrogênio alcalino (%).

Tabela 1. Valores das variáveis do planejamento experimental para a hidrólise enzimática para o bagaço de 20 e 48 mesh com os valores codificados e não codificados.

Ensaio	Tempo (h)	Temperatura (°C)	Concentração H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> alcalino (%)
1	8 (-1)	20 (-1)	2 (-1)
2	8 (-1)	20 (-1)	6 (1)
3	8 (-1)	50 (1)	2 (-1)
4	8 (-1)	50 (1)	6 (1)
5	24 (1)	20 (-1)	2 (-1)
6	24 (1)	20 (-1)	6 (1)
7	24 (1)	50 (1)	2 (-1)
8	24 (1)	50 (1)	6 (1)
9	2,55 (-1,68)	35 (0)	4 (0)
10	29,45 (1,68)	35 (0)	4 (0)
11	16 (0)	9,77 (-1,68)	4 (0)
12	16 (0)	60,23 (1,68)	4 (0)
13	16 (0)	35 (0)	0,64 (-1,68)
14	16 (0)	35 (0)	7,36 (1,68)
15	16 (0)	35 (0)	4 (0)
16	16 (0)	35 (0)	4 (0)
17	16 (0)	35 (0)	4 (0)

É apresentado na Tabela 2 a média dos resultados obtidos de valores de açúcares redutores totais (ART) liberados na hidrólise enzimática para o bagaço de abacaxi de 20 e 48 mesh. Foi utilizada como unidade de resposta: g de ART/ g de bagaço seco (bagaço sem nenhum tratamento) no sentido de facilitar a comparação do rendimento em massa do processo da hidrólise enzimática com a massa do bagaço de abacaxi antes de qualquer pré-tratamento.

Tabela 2. Matriz do planejamento experimental fatorial das médias dos resultados das massas de ART liberadas para cada um dos ensaios após a hidrólise enzimática para o bagaço de 20 e 48 mesh.

Ensaio	Tempo (h)	Temperatura (°C)	[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] (%)	Média Massa de ART g/g) 20 mesh	Média Massa de ART (g/g) 48 mesh
1	8 (-1)	20 (-1)	2 (-1)	0,063±0,0008	0,058±0,0012
2	8 (-1)	20 (-1)	6 (1)	0,044±0,0016	0,037±0,0003
3	8 (-1)	50 (1)	2 (-1)	0,057±0,0014	0,056±0,0020
4	8 (-1)	50 (1)	6 (1)	0,043±0,0008	0,034±0,0027
5	24 (1)	20 (-1)	2 (-1)	0,054±0,0003	0,049±0,0002
6	24 (1)	20 (-1)	6 (1)	0,042±0,0003	0,030±0,0008
7	24 (1)	50 (1)	2 (-1)	0,050±0,0001	0,049±0,0003
8	24 (1)	50 (1)	6 (1)	0,039±0,0010	0,032±0,0024
9	2,55 (-1,68)	35 (0)	4 (0)	0,052±0,0009	0,047±0,0047
10	29,45 (1,68)	35 (0)	4 (0)	0,044±0,0016	0,035±0,0048
11	16 (0)	9,77 (-1,68)	4 (0)	0,048±0,0003	0,044±0,0017
12	16 (0)	60,23 (1,68)	4 (0)	0,043±0,0001	0,043±0,0013
13	16 (0)	35 (0)	0,64 (-1,68)	0,059±0,0007	0,063±0,0034
14	16 (0)	35 (0)	7,36 (1,68)	0,036±0,0004	0,028±0,0017
15	16 (0)	35 (0)	4 (0)	0,041±0,0005	0,039±0,0004
16	16 (0)	35 (0)	4 (0)	0,040±0,0001	0,039±0,0027
17	16 (0)	35 (0)	4 (0)	0,040±0,0016	0,038±0,0030

Analisando a Tabela 2, referente a fração de 20 mesh nota-se que o maior valor de ART, após a hidrólise enzimática do bagaço, ocorreu no ensaio 1, em que foram observados 0,063 g/g de ART de bagaço seco.

Quando analisamos o fator concentração, podemos perceber que esta variável exerceu maior efeito sobre o modelo, ao passo que a variável tempo exerceu menor influência. Um exemplo disso são os experimentos 1, 2 e 5. No ensaio 1 (tempo de 8h e concentração de 2%) e no ensaio 2 (tempo de 8h e concentração de 6%), a temperatura adotada foi de 20°C, e obteve-se 0,063 g/g de ART e 0,044 g/g de ART de bagaço seco respectivamente. Ao compararmos o ensaio 1 (tempo de 8h e concentração de 2%) e o ensaio 5 (tempo de 24h e concentração de 2%), em que a temperatura utilizada foi de 20°C, obteve-se 0,063 g/g de ART e 0,054 g/g de ART de bagaço seco, respectivamente. Sendo assim, o experimento 1, apresenta o melhor resultado, usando o menor tempo e concentração de peróxido.

Tratando-se da variável temperatura, nota-se que esta exerceu menor influência, fato que pode ser confirmado pelo experimento 1 e 3. Utilizando as mesmas condições de tempo de reação (8h) e concentração de peróxido (2%), obtiveram-se 0,063 g/g de ART de bagaço seco para a temperatura de 20°C e 0,057 g/g de ART de bagaço seco para a temperatura de 50°C, respectivamente. O mesmo fato também pode ser observado nos experimentos 11 (0,048 g/g de ART de bagaço seco) e 12 (0,043 g/g de ART de bagaço seco). Demonstrando que a temperatura exerceu redução no valor da resposta, ou seja, para

este tratamento opta-se então por menores valores de temperatura.

A melhor resposta para a fração de 48 mesh do bagaço de abacaxi na hidrólise enzimática foi encontrada no ensaio 13, obtendo 0,063 g/g de ART de bagaço seco. Observa-se que uma das menores respostas obtidas (experimento 8) foi ocasionado quando utilizou-se as maiores concentrações e tempos.

Nota-se que a interação tempo e concentração são significativas ao modelo, e ao verificar a Tabela 2, observa-se que os maiores valores de ART foram obtidos quando utilizou as combinações de menores tempo e concentração, confirmados pela comparação dos ensaios 1 e 3 (0,058 e 0,056 g/g de ART de bagaço seco respectivamente) com experimento 8 (0,032 g/g de ART de bagaço seco).

Os pontos de maior valor de ART são obtidos em baixas concentrações de peróxido de hidrogênio e, que tanto em altas temperaturas, como em baixas, o aproveitamento de obtenção dos açúcares redutores é semelhante, isto porque a interação entre os fatores concentração e temperatura não se mostrou significativa ao modelo. Nos experimentos 1 e 3, verifica-se que foram obtidos 0,058 g/g de ART e 0,056 g/g de ART de bagaço seco respectivamente, indicando que o aumento da temperatura no ensaio 3 não afetou a produção de açúcares. Sendo assim, podem-se utilizar temperaturas amenas, em torno de 20°C, sem interferir significativamente nos resultados.

É importante salientar que as duas frações médias de bagaço de abacaxi, 20 e 48 mesh, apresentaram semelhança em seu perfil na hidrólise enzimática. Em ambas as frações, as maiores quantidades de ART foram obtidas nos ensaios em que foram empregados menores níveis da variável concentração de peróxido de hidrogênio. Além de proporcionar maiores quantidades de ART com um menor custo, a utilização de menores concentrações de peróxido de hidrogênio também proporcionam uma menor perda de massa, segundo o que concluiu FREITAS *et al.* (2020), uma vez que utilizando menores concentrações de peróxido o tratamento se torna menos agressivo a biomassa.

#### **4 CONCLUSÃO**

Neste estudo foi possível realizar a sacarificação da celulose do bagaço de abacaxi e obter desta biomassa concentrações consideráveis de açúcares redutores totais, a partir da hidrólise enzimática. Logo o bagaço de abacaxi é uma proposta promissora.

Testes realizados usando o bagaço seco e peneirado nas faixas de partículas de 1,242 mm (20 mesh) e 0,564 mm (48 mesh) mostraram que o melhor desempenho, para os valores de açúcares totais, foi encontrado quando utilizado os menores níveis para as

variáveis do planejamento para o bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino.

Neste sentido, conclui-se que no estudo da hidrólise enzimática utilizando o bagaço de abacaxi pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino nos menores níveis: tempo, temperatura e concentração de peróxido mostraram-se mais vantajoso, obtendo maiores valores de açúcares redutores totais em ambas as frações do bagaço de 20 e 48 mesh. Também foi possível observar que as frações de 20 e 48 mesh demonstraram comportamentos diferentes em alguns experimentos, dificultando uma conclusão geral para os ensaios.

## REFERÊNCIAS

ARAÚJO, DE G.J.F., NAVARRO, L. F.S, SANTOS, B. A. S., 2013. O Etanol de Segunda Geração e sua Importância Estratégica ante o Cenário Energético Internacional Contemporâneo. ANAP. IX Fórum Ambiental da Alta Paulista.

BASSO, Thalita P. **Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e serapilheira em comparação com cepas de *Trichoderma reesei***. (Dissertação de Mestrado). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

FREITAS, F.F., SEOLATTO, A.A., FERREIRA, M.M.P, NOGUEIRA, D.P., MACEDO, L.C.V., ROSA, P.R.F. Evaluation of mass loss of pineapple bagasse pretreated with alkaline hydrogen peroxide. **Brazilian Journal of Development**, V.6, n.6, 2020.

IBP, Instituto Brasileiro de Petróleo e Gás, 2023. Disponível em: <http://www.ibp.org.br/observatorio-do-setor/snapshots/evolucao-da-producao-de-biocombustiveis-no-mundo/>

IEA, International Energy Agency. Renewables, 2015. Disponível em: <http://www.iea.org/topics/renewables/>.  
<http://www.iea.org/topics/renewables/subtopics/bioenergy/>.

IPEA. Petróleo: da crise aos carros flex. 2010. Disponível em: [http://www.ipea.gov.br/desafios/index.php?option=com\\_content&view=article&id=2321:catid=28&Itemid=23](http://www.ipea.gov.br/desafios/index.php?option=com_content&view=article&id=2321:catid=28&Itemid=23).

KARAGÖZ, P.; ROCHA, I. V.; ÖZKAN, M.; ANGELIDAKI, I. Alkaline peroxide pretreatment of rapeseed straw for enhancing bioethanol production by Same Vessel Saccharification and Co-Fermentation. *Bioresource Technology*., v.104, p. 348-357, 2012.

LEE, D., YU, A.H.C., WONG, K.K.Y., Evaluation of the enzymatic susceptibility of cellulosic substrates using specific hydrolysis rates and enzyme adsorption. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. n.45/45, p.407-415, 1994.

LYND, L.R., ELANDER, R.T., WYMAN, C.E., Likely features and costs of mature biomass ethanol technology. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. n.57/58, p.741-761, 1996.

MARJOTTA-MAISTRO, Marta Cristina. Ajustes nos mercados de álcool e gasolina no processo de desregulamentação. 2002. 197 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Econômicas, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

MARTINS, F. L. **Caracterização do Complexo Celulásico de *Penicillium echinulatum***.139f. (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal do Paraná, Instituto de Química, Curitiba. 2005.

MENON, V.; RAO, M. Trends in bioconversion of lignocelluloses: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Progr. Energy Combust. Sci.* v. 38, p. 522-550,2012.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3):426-428, 1959.

MOUTTA, R.O.; CHANDEL, A.K.; RODRIGUES,R.C.L.B.; SILVA, M.B.; ROCHA, G.J.M.; SILVA, S.S. Statistical optimization of sugarcane leaves hydrolysis into simple sugars by dilute sulfuric acid catalyzed process. *Sugar tech.*, v. 14, p. 53-60, 2011.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M., Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, n. 96, p. 673–686, 2005.

PEREZ, J. A. Comparative analysis of corn stover components and non-conventional biomass feedstocks with dilute and concentrated acid hydrolysis. *AIChE Annual Meeting, Conference Proceedings, Nashville, TN, United States*, P Perez10/1-perez10/8. Nov. 8-13, 2009.

ROSSELL, C.E.V. Fermentação do hidrolisado. III Workshop Tecnológico sobre Hidrólise para Produção de Etanol. Projeto Programa de Pesquisa em Políticas Públicas. 2006.

SHEN, F.; SADDLER, J. N.; LIU, R.; LIN, L.; DENG, S.; ZHANG, Y.; YANG, G.; XIAO, H.; LI, Y. Evaluation of steam pretreatment on sweet sorghum bagasse for enzymatic hydrolysis and bioethanol production. *Carbohydrate Polymers*, v. 86, n. 4, p. 1542-1548, 2011.

ZHANG, H.P.Y., HIMMEL, M. E. MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**. n. 24, p. 452–481, 2006.