

USO DO LÍQUIDO IÔNICO ACETATO DE 2-HIDROXIETANOLAMINA NO PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CAJU PARA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

REIS, C. L. B.(1), CAVALCANTE, K. C. (2), SILVA, L. M. A. (2), SANTIAGO-AGUIAR, R. S. (1), CANUTO, K. M. (2), ROCHA, M. V. P.(1)

¹ Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química

² Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais- Embrapa Agroindústria Tropical.
E-mail para contato: valderez.rocha@ufc.br; carlaluzia2910@gmail.com

RESUMO – *O bagaço de caju (BC), um resíduo lignocelulósico da agroindústria do caju, é um material resistente à hidrólise enzimática devido ao alto teor de lignina. Neste trabalho, foram testadas três metodologias de pré-tratamento (conduzidos em diferentes reatores e temperatura), utilizando-se o líquido iônico (LI) acetato de 2-hidroxi-etanolamina (2-HEAA) a fim de melhorar a acessibilidade do BC às enzimas celulases. A composição do BC in natura e pré-tratados com LI (BC-LI) foram determinadas segundo protocolo NREL. Em todas as condições de pré-tratamento aumentou o teor de celulose e diminuiu o teor de lignina do BC. Porém, BC-LI-B (conduzido em estufa/tempo reacional de 24 h) apresentou maior digestibilidade (95,8%), com rendimento de glicose de 747 mg/g_{BC-LI-B}. Em relação ao rendimento baseado nos sólidos recuperados após pré-tratamento o BC-LI-A (conduzido em estufa/ 3h) apresentou rendimento de 143 mg_{glicose}/g_{BC}, rendimento de 314 mg_{glicose}/g_{BC} para o BC-LI-B e o BC-LI-C (conduzido em autoclave/ 3h) apresentou rendimento de 335 mg_{glicose}/g_{BC}. A capacidade do 2-HEAA de remover lignina torna-o um potencial solvente verde para o pré-tratamento do BC, aumentando a eficiência da hidrólise e os carboidratos obtidos poderão ser aplicados em diferentes processos.*

1. INTRODUÇÃO

Materiais Lignocelulósicos representam uma matéria prima renovável promissora para a produção de açúcares fermentescíveis e biocombustíveis. Existem diversos materiais lignocelulósicos disponíveis no Brasil como, por exemplo, bagaço de cana-de-açúcar, palha de cana-de-açúcar e palha de trigo. Outro exemplo de material lignocelulósico é o bagaço de caju, um resíduo da agroindústria do caju, composto principalmente de celulose, hemicelulose e lignina, que formam uma estrutura complexa e intrincada, sendo essas características uma das maiores dificuldades para o aproveitamento dos resíduos lignocelulósicos por biotransformação, tanto microbiana e enzimática, o que limita seu uso e evita conversão economicamente viáveis em produtos de valor agregado (Correia *et al.*, 2013). Por isso vários tipos de pré-tratamentos têm sido estudados para modificar essa estrutura



XXI Congresso Brasileiro
de Engenharia Química

Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o
Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

(Rocha *et al.*, 2011; Rodrigues *et al.*, 2011; Correia *et al.*, 2013) e entre as tecnologias alternativas de pré-tratamento, uma que está ganhando força é a aplicação líquidos iônicos.

Os líquidos iônicos são sais fundidos à temperatura ambiente, formados por um cátion orgânico e um anion orgânico ou inorgânico, tornam-se vantajosos pois podem ser projetados de acordo com as características físico-químicas almeçadas através da combinação de diferentes cátions e ânions. Além disso, normalmente, apresentam pressão de vapor não mensurável e, geralmente, uma estabilidade térmica em uma ampla faixa de temperaturas (Feng *et al.*, 2010). Muitos estudos estão sendo realizados em relação à utilização de líquidos iônicos (LIs), devido à sua capacidade de quebrar a rede de ligações de hidrogênio dos polissacarídeos, promovendo a solubilização da celulose (Sáez *et al.*, 2013). Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar diferentes procedimentos de pré-tratamento do bagaço de caju utilizando o líquido iônico acetato de 2-hidroxietanolamina (2-HEAA), visando melhorar a acessibilidade do bagaço de caju às enzimas celulases.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Material lignocelulósico

Utilizou-se neste estudo, como material lignocelulósico, o bagaço de caju, que foi gentilmente cedido pela Indústria de Processamento de Sucos Jandaia (Ceará, Brasil). Inicialmente o bagaço de caju (BC) foi lavado três vezes com água e seco em estufa (Tecnal, Modelo TE-394/1) com renovação de ar a 60 °C por 24 h. Em seguida, o BC foi triturado, peneirado e selecionado as partículas com diâmetro de 0,25–0,84 mm para a realização dos experimentos, sendo esse sólido nomeado de BC. BC foi estocado até seu uso a temperatura ambiente (aproximadamente 28 °C).

2.2. Síntese do Líquido Iônico

A síntese do líquido iônico foi realizada através de uma reação equimolar de neutralização ácido-base entre o ácido acético e monoetanolamina, de acordo com metodologia descrita por Álvarez (2010). A monoetanolamina foi adicionada em um balão de três bocas, equipado com um condensador de refluxo, um funil contendo o ácido acético e um termômetro. O ácido acético foi adicionado gota a gota à amina e o sistema foi mantido sob agitação a 35 °C por 24 h. A confirmação estrutural do produto da reação como sendo acetato de 2-hidroxietanolamina (2-HEAA) foi obtida por meios de espectros de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio e carbono-13 (RMN ¹H e ¹³C) conforme relatado no trabalho de Reis *et al.*, 2015.

2.3. Metodologias de pré-tratamento do Bagaço de Caju com Líquido Iônico

Foram avaliadas três metodologias de pré-tratamento do bagaço de caju, sendo descritas a seguir:

Metodologia A (adaptada do estudo realizado por Silva (2013)): o pré-tratamento foi conduzido a 120 °C em estufa com circulação de ar por 3 h, empregando-se 5 % m/m de bagaço de caju em

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO





XXI Congresso Brasileiro
de Engenharia Química

Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o
Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

líquido iônico 2-HEAA, adicionados em erlenmeyer de 250 mL. Em seguida, resfriou-se a mistura em banho de água e 10 mL de água destilada foram adicionados. Posteriormente, a fração sólida foi separada por centrifugação a 6500g por 20 min (Fanem- 280R) e o bagaço obtido do pré-tratamento foi denominado BC-LI-A.

Metodologia B: No Método B, o pré-tratamento do bagaço de caju (BC) foi realizado em estufa com circulação de ar a 130 °C por 24 h, em frascos erlenmeyer de 250 mL, e utilizando uma porcentagem de BC de 10 % m/v em líquido iônico 2-HEAA). Após esse período, o material foi retirado da estufa, mantido a 25 °C e sob agitação constante adicionou-se 10 mL de etanol 96 % v/v. Logo em seguida, separou-se por filtração e o precipitado foi lavado até pH 7. Os sólidos deste pré-tratamento foram denominados BC-LI-B.

Metodologia C (adaptada do estudo realizado por Perez-Pimenta *et al.* (2013)): os sólidos obtidos neste pré-tratamento foram denominados BC-LI-C. No procedimento experimental, foi utilizada uma razão de BC de 17,5 % em líquido iônico 2-HEAA e mantido em autoclave a 120 °C por 3 h em frasco erlenmeyer de 250 ml. Após isso, acrescentaram-se 12 mL de água destilada à mistura e então separou-se a fração sólida da líquida por centrifugação a 6500g por 20 min (Fanem-280R).

Todos os sólidos obtidos foram lavados até pH 7,0, secos em estufa com circulação de ar (Tecnal, TE-394/1), triturados em moinho de bolas (Tecnal, R-TE-250) e foram selecionadas partículas com diâmetro de 0,25–0,84 mm.

2.4. Caracterização química do bagaço de caju pré-tratado com líquido iônico e *in natura*: segundo protocolo da NREL e RMN ¹³C

A análise composicional do bagaço de caju (BC) *in natura* e pré-tratados com líquido iônico (BC-LI) foi realizada segundo as metodologias padrões desenvolvidas pela organização Norte-Americana de Energias Renováveis - NREL (National Renewable Energy Laboratory) com algumas modificações. Além disso, a técnica de RMN ¹³C no estado sólido CP-MAS, que combina polarização cruzada e giro no ângulo mágico foi empregada para se obter informações estruturais das referidas amostras. As análises dos materiais foram conduzidas em um espectrômetro Agilent DD2 de 600 MHz (para núcleo de ¹H), equipado com uma sonda de sólidos de 4 mm de diâmetro interno. Para este experimento foram empregados os seguintes parâmetros: tempo de contato de 1 ms, pulso composto de alta potência (Spinal 64) com 6500 varreduras em uma janela espectral de 487,37 ppm, 4 s de tempo de relaxação entre cada aquisição e 1216 pontos. Todos os experimentos foram realizados com 14 kHz de rotação no ângulo mágico e os espectros foram adquiridos e processados através do software VNMRJ TM 4.0. Além disso, o adamantano foi utilizado como referência externa. A partir dos espectros de RMN, pode-se calcular o índice de cristalinidade de acordo com Liitiä *et al.* (2001).

2.5. Hidrólise enzimática

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO



A hidrólise enzimática foi realizada segundo a metodologia preconizada no protocolo da NREL/TP-510-42629 (Selig *et al.*, 2008) com algumas modificações. A hidrólise foi efetuada em frascos Erlenmeyers de 50 mL com volume reacional de 10 mL e 0,1 g da fração rica em celulose. A carga enzimática foi 30 FPU/g celulose o complexo Celulase de *Trichoderma reesei* (Novozymes NS 22074) com atividade de 154,77 FPU.mL⁻¹. A hidrólise foi conduzida a 45 °C, 150 RPM por 72 h. Em intervalos pré-determinados foram retiradas alíquotas da mistura reacional, filtradas e analisadas por cromatografia líquida segundo a metodologia descrita por Correia *et al.* (2013), para determinação de glicose, xilose e arabinose. Após, determinaram-se a digestibilidade e o rendimento de glicose baseada na massa inicial do bagaço de caju *in natura* e dos sólidos pré-tratados.

3. RESULTADOS

3.1. Caracterização e composição química do bagaço de caju pré-tratado com líquido iônico e *in natura*

A composição química do bagaço de caju *in natura* e do bagaço de caju pré-tratado com líquido iônico (BC-LI), utilizando as diferentes metodologias, estão apresentados na Tabela 1. Como referência, foi determinada a composição do bagaço de caju não tratado (BC) e obteve-se 18,16 ± 0,8% de celulose, 12,83 ± 2,0% de hemicelulose e 43,28 ± 4,2% de lignina. Estes valores obtidos corroboram com a faixa de valores encontrados na literatura (Correia *et al.*, 2013; Rodrigues *et al.*, 2011).

Tabela 1 - Composição química do bagaço de caju *in natura* (BC) e pré-tratado com líquido iônico acetato de 2-hidroxietanolamina (2- HEAA) utilizando três diferentes metodologias.

<i>Material</i>	<i>Sólidos remanescentes (%)</i>	<i>Celulose (%)</i>	<i>Hemicelulose(%)</i>	<i>Lignina (%)</i>	<i>Extraíveis(%)</i>	<i>Cinzas(%)</i>
<i>In natura</i>	100,0 ± 0,0	18,16 ± 0,8	12,83 ± 2,0	43,28 ± 4,2	5,89 ± 0,3	3,32 ± 0,7
BC-LI-A	53,40 ± 0,2	40,29 ± 0,2	19,59 ± 0,4	23,02 ± 3,6	6,85 ± 0,4	1,38 ± 0,4
BC-LI-B	41,11 ± 1,5	41,43 ± 0,8	17,87 ± 0,2	7,57 ± 1,1	15,72 ± 0,0	0,37 ± 0,1
BC-LI-C	61,28 ± 0,2	47,47 ± 0,2	18,69 ± 0,4	25,95 ± 0,7	5,67 ± 0,1	2,19 ± 0,4

A partir da Tabela 1 é possível observar que o BC-LI-A e o BC-LI-C apresentaram os maiores percentuais de lignina: 23,02 ± 3,6% e 25,95 ± 0,7%, respectivamente, quando comparados com os sólidos obtidos pelo Método B que apresentou teor de lignina de 7,57 ± 1,1%. Possivelmente isso se deve ao baixo tempo reacional nos métodos A e B que não proporcionou efetiva atuação e interação do líquido iônico prótico (2-HEAA) com o BC. Observa-se também o aumento no percentual celulose de todos os materiais pré-tratados, elevando de 18,16% (BC *in natura*) para 40,29 (BC-LI-A), 41,43 (BC-LI-B) e 47,47% (BC-LI-C), devido a remoção da lignina a parte celulósica do BC ficou mais acessível. O percentual de deslignificação de 46,81 (BC-LI-A) e 40,11 (BC-LI-C) foi eficaz quando comparados aos resultados obtidos por Perez-Pimenta *et al.*, 2013, que obtiveram

16,6% e 8,2% de deslignificação para o bagaço de agave e switchgrass, respectivamente, após pré-tratamento de 3 h, 120 °C, em autoclave e utilizando o líquido iônico comercial acetato de 1-etil-3-metilimidazólio. Os mesmos autores (Perez-Pimenta et al., 2013), obtiveram resultados de deslignificação semelhantes aos obtidos pelos métodos A e C, quando conduziram o pré-tratamento em temperaturas mais elevadas (160 °C).

A técnica de RMN ^{13}C CP/MAS (Vide Figura 1) foi empregada para investigar as mudanças estruturais dos principais componentes (celulose, hemicelulose e lignina) após o pré-tratamento com 2-HEAA. A região do espectro entre 62,6 e 68,9 ppm é referente ao carbono C6 da celulose e é considerada importante, pois indica o ordenamento das estruturas celulósicas (cristalinidade). Os sinais dos carbonos C2, C3 e C5 da celulose aparecem na região entre 70,95 a 83,90 ppm; enquanto o carbono C4, também utilizado como indicativo de ordenamento das cadeias celulósicas entre 83,9 a 91,6 ppm. Adicionalmente, o sinal do carbono anomérico (C1) da celulose é observado entre 97,23 a 117,86 ppm (Bernardinelli *et al.*, 2015).

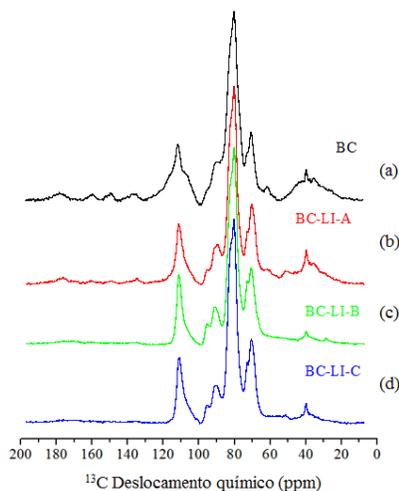


Figura 1 - Espectros de ^{13}C CP/MAS RMN: Bagaço de caju *in natura* (a); BC-LI-A (b); BC-LI-B (c) e BC-LI-C (d).

No espectro do BC (Figura 1a) observa-se claramente os deslocamentos químicos correspondentes aos grupos funcionais aromáticos da lignina (região entre 128,37 a 166,8 ppm). Contudo, após os tratamentos com o líquido iônico 2-HEAA, verifica-se, de maneira geral, a redução destes sinais (Figuras 1 b-d).

Na Tabela 2 estão apresentados os índices de cristalinidade, obtidos pela razão entre a integral da região cristalina da celulose (91,19 ppm– 96,35 ppm) pela integral da região amorfa da celulose (80 ppm - 93 ppm). Esta abordagem tem sido utilizada por outros que avaliam a influência da cristalinidade da celulose e digestibilidade após pré-tratamentos (Mansfield *et al.*, 2003; Pu *et al.*, 2013, Bernardinelli *et al.*, 2015).

Tabela 2- Cristalinidade da celulose do bagaço de caju *in natura* e o do material pré-tratado por diferentes procedimentos (BC-LI-A, BC-LI-B e BC-LI-C) obtida por ^{13}C CP/MAS RMN.

Material	Cristalinidade (%)
<i>In natura</i>	9,49 ± 1,6
BC-LI-A	17,46 ± 1,8
BC -LI-B	22,39 ± 0,6
BC -LI-C	22,79 ± 0,1

Observa-se que a cristalinidade dos sólidos, após pré-tratamento com líquido iônico 2-HEAA, aumentou quando comparada com o bagaço de caju *in natura*. Husson *et al.*, 2011 reportaram que o pré-tratamento da celulose com líquido iônico 1-etil-3-metimidazólio também levou ao aumento da cristalinidade. De acordo com Mansfield *et al.*, 1999, alguns pré-tratamentos como explosão a vapor aumentam a cristalinidade da celulose devido a remoção ou redução da celulose amorfa e pré-tratamentos que utilizam pH elevados apresentam menor efeito ou até mesmo a redução da cristalinidade.

3.2. Hidrólise enzimática do bagaço de caju pré-tratado com líquido iônico e *in natura*

A hidrólise enzimática foi o parâmetro de avaliação do desempenho de cada um dos pré-tratamentos que foram empregados nesta pesquisa. O perfil da digestibilidade da celulose e rendimento de glicose em $\text{mg}_{\text{glicose}}/\text{g}_{\text{BC-LI}}$ na hidrólise enzimática dos sólidos previamente tratados com líquido iônico prótico 2-HEAA é demonstrado na Figura 2, que revela que os sólidos BC-LI-A, BC-LI-B e BC-LI-C foram eficazes na conversão de celulose em glicose.

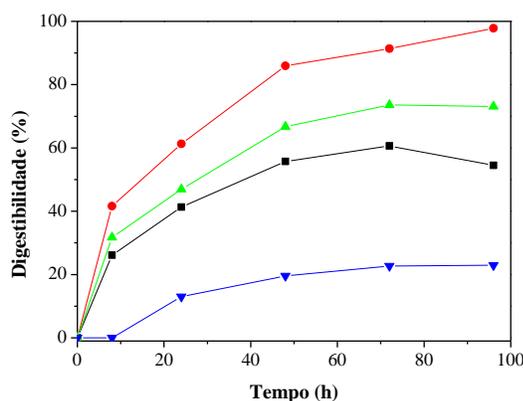


Figura 2–Perfil da digestibilidade da celulose na hidrólise enzimática do BC, BC-LI-A, BC-LI-B e BC-LI-C, conduzida a 45 °C, 150 rpm, pH 4,8 por 96 h e utilizando a enzima do complexo Celulase de *Trichoderma reesei* (30 FPU/g celulose). (▼) Bagaço de caju *in natura* - BC; (■) BC-LI-A; (●) BC-LI-B e (▲) BC-LI-C.

Após 96 h de hidrólise, O BC *in natura* apresentou somente $23,13 \pm 0,6\%$ de digestibilidade da celulose inicial, que foi bem inferior à digestibilidade dos sólidos após pré-tratamento com líquido iônico 2-HEAA. O sólido pré-tratado que exibiu maior digestibilidade de celulose foi o BC-LI-B ($98 \pm 0,5\%$), o qual continha menor percentual de lignina (vide Tabela 1). A presença de lignina é um fator que limita a hidrólise enzimática, devido a várias razões como: a lignina atua como uma barreira física limitando a acessibilidade das enzimas celulases e hemicelulases ao substrato adsorção das celulases à lignina (Qi *et al.*, 2011) e a lignina também pode inibir diretamente as enzimas hidrolíticas (Van Dyk e Pletscke, 2012). Os sólidos pré-tratados BC-LI-A e BC-LI-C apresentaram digestibilidade de $60,65 \pm 2,9\%$ e $73,10 \pm 0,2\%$, respectivamente.

Após pré-tratamento do BC com LI, observou-se o aumento da cristalinidade dos sólidos (Vide Fig. 1 e Tab. 2) quando comparados com o BC *in natura*. No entanto, os sólidos pré-tratados apresentaram elevado rendimento de glicose ($301,29 \text{ mg}_{\text{glicose}}/\text{g}_{\text{BC-LI-A}}$, $747,72 \text{ mg}_{\text{glicose}}/\text{g}_{\text{BC-LI-B}}$ $541,84 \text{ mg}_{\text{glicose}}/\text{g}_{\text{BC-LI-C}}$), em relação ao BC *in natura* ($24,09 \text{ mg}_{\text{glicose}}/\text{g}_{\text{BC}}$). Estes resultados indicam que a eficiência da hidrólise enzimática não está exclusivamente ligada à cristalinidade, como sugerido por diversos autores (Fosto *et al.*, 2011; Pu *et al.*, 2013), mas é influenciada por outros parâmetros como, a relação lignina/celulose, morfologia, porosidade, grau de polimerização, distribuição da lignina e hemicelulose (Bali *et al.*, 2015). De acordo com os sólidos BC-LI-A e BC-LI-B foreneceram os maiores rendimentos de glicose: $314 \text{ mg}_{\text{glicose}}/\text{g}_{\text{BC}}$ (BC-LI-B) e $335 \text{ mg}_{\text{glicose}}/\text{g}_{\text{BC}}$, respectivamente

Qiu *et al.* (2012) reportaram a digestibilidade da celulose do bagaço da cana-de-açúcar (mesmas condições de hidrólise enzimática deste trabalho) de 87% utilizando no pré-tratamento o líquido iônico aprótico acetato de 1-etil-3-metilimidazólio [Emim][Ac]. Por outro lado, Silva (2013) utilizando o mesmo líquido iônico aprótico no pré-tratamento do bagaço de cana obtiveram digestibilidade de 98%. Portanto, estes valores corresponderam à mesma faixa de digestibilidade da celulose do BC obtidos nesta pesquisa utilizando um líquido iônico prótico, cujas principais vantagens são o baixo custo e a praticidade da sua síntese.

5. CONCLUSÃO

O uso do líquido iônico acetato de 2- hidroxietilamonina (2-HEAA) aumentou em 2-4 vezes a digestibilidade do bagaço de caju , proporcionando rendimento de glicose de até $720,92 \text{ mg}_{\text{glicose}}/\text{g}_{\text{BC-LI}}$. Diante dos resultados apresentados, pode-se considerar o líquido iônico prótico 2-HEAA um potencial solvente verde no pré-tratamento do bagaço de caju.

6. REFERÊNCIAS

- ALVAREZ, V. Bronsted Ionic Liquids for Sustainable Processes: Synthesis and Physical Properties. **Chemical Engineering Journal**, v. 55, p, 625–632, 2010.
- BALI G.; MENG, X.; DENEFF J. I.; SUN, Q.; RAGAUSKAS, A. J. The effect of alkaline pretreatment methods on cellulose structure and accessibility. **ChemSusChem**, v. 8, p.275–279, 2015.
- BERNARDINELLI, O. D.; LIMA, M. A.; REZENDE, C. A.; POLIKARPOV, I.; AZEVEDO E. R. Quantitative ^{13}C MultiCP solid-state NMR as a tool for evaluation of cellulose crystallinity index measured directly inside sugarcane biomass. **Biotechnol Biofuels**, v. 8, p.110, 2015.



XXI Congresso Brasileiro
de Engenharia Química

Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o
Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

- CORREIA, J. A. C.; JÚNIOR, J. E. M.; GONÇALVES, L. R. B.; ROCHA, M. V. P. Alkaline Hydrogen Peroxide Pretreatment of Cashew Apple Bagasse for Ethanol Production: Study of Parameters. **Bioresource Technology**, v. 139, p. 249-156, 2013.
- FENG, R.; ZHAO, D.; GUO, YONGJUN. Revisiting characteristics of ionic liquids: A review for further application development. *Journal of Environmental Protection*, v. 1, p. 95-104, 2010.
- LIITIÄ, T.; MAUNU, S. L.; HORTLING, B. Solid state NMR studies on in homogeneous structure of fibre wall in kraft pulp. **Holzforschung: international journal of the biology, chemistry, physics and technology of wood**, v. 55, p. 503–510, 2001.
- MANSFIELD S.D., MEDER R. Cellulose hydrolysis - the role of monocomponent cellulases in crystalline cellulose degradation. **Cellulose**, v.10, p.159–169, 2013.
- PEREZ-PIMENTA, J. A.; LOPEZ-ORTEGA, M. G.; VARANASI, P.; STAVILA, V.; CHENG, G.; SINGH, S.; SIMMONS, B. A. Comparison of the impact of ionic liquid pretreatment on recalcitrance of agave bagasse and switchgrass. **Bioresource Technology**, v. 127, p.18-24, 2013.
- REIS, C. L. B; PALITOT, D. R. T.; SANTIAGO-AGUIAR, R. S.; RODRIGUES, T. H. S.; CANUTO, K. M.; ROCHA, M. V. P. Pretreatment of cashew apple bagasse using ionic liquids: study of different methods. *Anais do VII congresso Argentino de Engenharia Química*. 2015.
- RODRIGUES, T. H. S., ROCHA, M. V. P., MACEDO, G.R., GONÇALVES, L.R.B. Ethanol Production from Cashew Apple Bagasse: Improvement of Enzymatic Hydrolysis by Microwave-Assisted Alkali Pretreatment. **Appl. Biochem. Biotechnol.** v. 164, p. 929-943, 2011.
- PU Y, HU F, HUANG F, DAVISON B, RAGAUSKAS A. Assessing the molecular structure basis for biomass recalcitrance during dilute acid and hydrothermal pretreatments. **Biotechnol Biofuels**, p. 6-15, 2013.
- QI B, CHEN X, WAN Y. Pretreatment of wheat straw by nonionic surfactant-assisted dilute acid for enhancing enzymatic hydrolysis and ethanol production. **Bioresour. Technol.** v. 101, p. 4875–83,2010.
- ROCHA, M. V. P.; RODRIGUES, T. H. S.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, L. R. B.; MACEDO, G. R. Cashew apple bagasse as a source of sugars for ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* CE025. **Journal of industrial microbiology e biotechnology**, v. 38, p. 1099-1107, 2011.
- SÁEZ, F., BALLESTEROS, M., BALLESTEROS, I., MANZANARES, P., OLIVA, J. M., NEGRO, M. J. Enzymatic Hydrolysis from Carbohydrates of Barley Straw Pre-treated by Ionic Liquids. **Journal of Chemical Technology and Biotechnol**, v. 88, p. 937 –941. 2013.
- SELIG, M.; WEISS, N.; JI Y. Enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. Laboratory Analytical Procedure (LAP), Technical report, NREL, 2008.
- SILVA, A. S.; Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com líquidos iônicos: efeito na desestruturação da parede celular e na eficiência da hidrólise enzimática. **Tese de Doutorado**. Programa de Pós-graduação em Bioquímica. Rio de Janeiro. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2013.
- VAN DYK, J. S.; PLETSCHKE, B. I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes—Factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnol. Advances**, v. 30, p. 1458–1480, 2012.

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO

