

# Obtención de azúcares fermentables a partir de pasto elefante (*Pennisetum purpureum*)

Production of fermentable sugar from elephant grass (*Pennisetum purpureum*).

Recibido 30-10-2014 Aceptado 28-11-2014

Marcelo Alexander Guancha Chalapud<sup>1</sup>  
Brandon Guerrero Olave<sup>2</sup>  
Katheryn Mondragón Escobar<sup>3</sup>  
Juan David Caicedo Salazar<sup>4</sup>  
Leydi Johana Aponza Munera<sup>5</sup>  
Lesly Johana Briceño Barona<sup>6</sup>

## Resumen

En el presente artículo se muestran, los resultados de la obtención de azúcares fermentables utilizando como materia prima pasto elefante (*Pennisetum purpureum*). Se evaluó el efecto de la concentración del ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) y el clorito de sodio ( $\text{NaClO}_2$ ) sobre la eliminación del complejo lignina hemicelulosa. Se realizó una comparación del método utilizando pretratamientos básicos con hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ ) y peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). La etapa de sacarificación se cumplió utilizando el método de hidrólisis enzimática y con el uso de celulasa y  $\beta$ -glucosidasa. Los resultados muestran que empleando el pretratamiento con  $\text{CH}_3\text{COOH}$  y  $\text{NaClO}_2$  presenta un porcentaje de sacarificación del 80,87% en comparación con el pretratamiento con  $\text{NaOH}$  con un porcentaje de 56,82% y del peróxido de hidrógeno con un porcentaje de 44,75%.

**Palabras clave:** Lignina, hidrólisis, lignocelulosa, pasto elefante, etanol.

## Abstract

The present study shows the results of obtaining fermentable sugars using elephant grass (*Pennisetum purpureum*) feedstock. The concentration effect of acetic acid ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) and sodium chlorite ( $\text{NaClO}_2$ ) was assessed on the removal of lignin hemicellulose complex. A comparison was made about method, using basic pretreatment with sodium hydroxide ( $\text{NaOH}$ ) and hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). The Saccharification step is carried out by enzymatic hydrolysis method that is performed using cellulase and  $\beta$ -glucosidase. The results show in the case of pretreatment with  $\text{NaClO}_2$  and  $\text{CH}_3\text{COOH}$  a percentage of saccharification of 80.87% compared to  $\text{NaOH}$  pretreatment with a percentage 56.82% and hydrogen peroxide with a percentage of 44.75%.

**Key words:** Lignin, pretreatment, enzymatic hydrolysis, elephant grass, ethanol.

<sup>1</sup> Colombiano Ingeniero. Químico de la Universidad Nacional de Colombia. Instructor del Centro Nacional de Asistencia Técnica a la Industria - Sena. marceloguancha@misena.edu.co.

<sup>2</sup> Colombiano Tecnólogo Químico del Centro Nacional de Asistencia Técnica a la Industria - Sena. branguerrero@misena.edu.co.

<sup>3</sup> Colombiano Tecnólogo Químico del Centro Nacional de Asistencia Técnica a la Industria - Sena. k-theryn@misena.edu.co.

<sup>4</sup> Colombiano Tecnólogo Químico del Centro Nacional de Asistencia Técnica a la Industria - Sena. jdcaicedo9@misena.edu.co.

<sup>5</sup> Colombiana Tecnóloga Química del Centro Nacional de Asistencia Técnica a la Industria - Sena. ljaponzam@misena.edu.co.

<sup>6</sup> Colombiana Tecnóloga Química del Centro Nacional de Asistencia Técnica a la Industria - Sena. lbriceno@misena.edu.co.

## Introducción

El petróleo y sus subproductos son considerados actualmente como uno de los mayores contaminantes a nivel mundial. La producción y utilización de combustibles fósiles generan grandes cantidades de dióxido de carbono; éstos a su vez, son emitidos a la atmósfera y son la causa del cambio climático y el calentamiento global. Por tanto, es necesario investigar alternativas encaminadas a la obtención de biocombustibles como compromiso al cumplimiento de la ley 693 del 2001 “por el cual se dictan normas sobre el uso de alcoholes carburantes, se crean estímulos para su producción, comercialización y consumo”, (Secretaría General de la Alcaldía Mayor de Bogotá D.C, 2001). Existen actualmente tecnologías que integran un sistema para la producción de etanol; sin embargo uno de los problemas de la producción de etanol de primera generación está enfocado en la seguridad alimentaria (FAO, 2012), lo que ha generado una gran controversia frente al riesgo que se origina entre la producción de etanol y la alimentación; por lo cual, actualmente, se buscan alternativas para obtener biocombustibles de segunda generación, ya que Colombia presenta un gran potencial en cuanto a disponibilidad y variedad de recursos naturales, como son los materiales lignocelulósicos. En general, los materiales lignocelulósicos son resistentes para la bioconversión a etanol debido a la presencia del complejo lignina. Por tanto se requiere un pretratamiento para incrementar su digestibilidad y hacer la celulosa más accesible para la obtención de azúcares simples. De la combinación de hemicelulosa y lignina resulta una compleja estructura alrededor de la celulosa, que debe ser removida o modificada para una eficiente hidrólisis de celulosa. Para esto se utilizan pretratamientos acuosos ácidos o básicos (Singh *et al.*, 2014).

En este trabajo se emplea como materia prima la especie *Pennisetum purpureum*, cuyas ventajas con otros materiales lignocelulósicos consiste en que es una especie que muestra adaptación en diversos tipos de suelos. Además, su estructura está compuesta fundamentalmente por celulosa cubierta por una red de lignina y hemicelulosa, alto contenido de biomasa las dimensiones del tallo alcanzan de 1,5 a 2,0 cm de diámetro y puede hasta llegar a 3 metros de altura (Basso *et al.*, 2014).

En esta investigación se propuso el método de deslignificación con clorito de sodio en medio ácido ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), ya que presenta ventajas frente a ácidos inorgánicos pues su recuperación es más sencilla, tiene bajo costo y puede ser obtenido por procesos biotecnológicos. El clorito de sodio a su vez, degrada la lignina a productos solubles; es importante mencionar que este reactivo es muy

severo, con lo que ocurre cierto grado de degradación de las cadenas de celulosa. Se realizó, además, una comparación de efectividad del pretratamiento utilizando Hidróxido de sodio y peróxido de Hidrógeno en condiciones reguladas de concentración y temperatura.

## Materiales y métodos

### Materiales

El pasto elefante (*Pennisetum purpureum*) se obtuvo en el municipio de Guacarí, Valle del Cauca, en la hacienda El Edén, a orillas del río Guabas. Luego del proceso de recolección, el material fue transportado al laboratorio para su respectiva adecuación y procesamiento.

### Adecuación de la materia prima

Inicialmente, el pasto elefante fue lavado con agua a temperatura ambiente, filtrado y secado a 60°C hasta su peso constante para la remoción de impurezas. Posteriormente, se llevó a cabo la reducción del tamaño de partícula con un molino de cuchillas, hasta obtener un tamaño de partícula de 53  $\mu\text{m}$ .

### Pretratamiento ácido acético/clorito de sodio

Para los ensayos de pretratamiento  $\text{CH}_3\text{COOH}$  y  $\text{NaClO}_2$  se utilizó un diseño factorial  $2^3$  con dos replicas, los factores considerados son: concentración de ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) 3M y 6M, concentración de clorito de sodio ( $\text{NaClO}_2$ ) 2,0% y temperatura. El pasto fue tratado con soluciones de  $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{NaClO}_2$  en proporción 1:1; se trabajó una relación sólido - líquido 1:15, el pretratamiento por 4 horas, en autoclave de acuerdo con la metodología propuesta por Siqueira (Siqueira *et al.*, 2012).

Las muestras tratadas se filtraron y lavaron con agua destilada hasta pH neutro, se secaron a 50°C hasta peso constante; el material resultante se almacenó en bolsas plásticas herméticas en un desecador. En la Tabla 1 se muestran los ensayos realizados.

**Tabla 1.** Ensayos pretratamiento con  $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{NaClO}_2$

Muestra	Concentración		Temperatura [°C]
	$\text{NaClO}_2$ [%]	$\text{CH}_3\text{COOH}$ [mol/L]	
1	2,0	3,0	100
2	2,0	6,0	100
3	0,5	3,0	100
4	0,5	6,0	100
5	2,0	3,0	120
6	0,5	6,0	120
7	2,0	6,0	120
8	0,5	3,0	120

## Pretratamiento alcalino y oxidante

El pretratamiento alcalino se desarrolló según la metodología propuesta por Cardona (Cardona *et al.*, 2014). El pasto elefante se trató con hidróxido de sodio en solución durante 4 horas en autoclave, manejando una relación sólido-líquido de 1:15. Cada ensayo se hizo por duplicado, los diferentes pretratamientos se muestran en la Tabla 2. Posterior al tratamiento alcalino las muestras se filtraron, se lavaron con agua destilada hasta pH neutro, se secaron a 50°C hasta peso constante y se almacenaron en bolsas plásticas herméticas en un desecador. El mismo procedimiento se utilizó con peróxido de hidrógeno cuyas concentraciones fueron 2,0% y 4,0% durante 4 horas, a una temperatura de 40°C en autoclave, el pH de la solución se fijó a un valor aproximado de 11 con hidróxido de sodio 10,0M.

Tabla 2. Ensayos pretratamiento con hidróxido de sodio

Muestra	NaOH [%]	Temperatura [°C]
1	1,0	100
2	2,0	100
3	1,0	100
4	2,0	120

## Composición química de las muestras

Se desarrollaron análisis acerca del contenido de humedad porcentaje de sustancias extractivas y el contenido de lignina de las muestras tratadas y no tratadas teniendo en cuenta la norma NREL/TP-510-42618. Para determinar el porcentaje de extractivos se empleó un equipo Soxhlet con aproximadamente 600 ml de solvente acetona, se pesaron muestras de 2 g en papel filtro No.41 de 150mm y se colocó en el extractor. Los reflujos de extracción se realizaron durante 6 horas (Schoening, A., y Johansson, G., 2006; Sluiter *et al.*, 2008).

Para la determinación de lignina se tomó 0,3 g de muestra anhidra libre de extraíbles, en un vaso de precipitado de 100 ml; y se le agregó 3 ml de ácido sulfúrico al 72% y se dejó reaccionar durante una hora, luego se agregó agua destilada, hasta disminuir la concentración de ácido al 4%. La muestra se llevó a la autoclave durante una hora, a temperatura de 120 °C. Posteriormente, la muestra se separó a través de un filtro Gooch número 3. Para determinar la lignina insoluble, la muestra, se neutralizó con agua destilada y se secó a 100 °C hasta alcanzar peso constante. Para determinar lignina soluble en las aguas del filtrado se hicieron lecturas de absorbancia a 205nm, utilizando como patrón ácido sulfúrico al 4% y un coeficiente de extinción molar de 1100 ml.AU/g. (Schoening, A., y Johansson, G., 2006; Siqueira *et al.*, 2012; Sluiter *et al.*, 2008).

Para la determinación de celulosa se adicionó a 1,0g de muestra anhidra libre de extractos, una mezcla formada por etanol y ácido nítrico concentrado en una relación 4:1, se llevó a reflujo en baño maría durante 30 minutos y se filtró. El residuo: se lavó con agua destilada caliente durante una hora y posteriormente con una solución saturada de acetato de sodio, seguido de agua destilada caliente; se secó a una temperatura de 105 °C; se enfrió en un desecador y se pesó (Hernado *et al.*, 2009).

## Propiedades térmicas

A las muestras se les hizo un análisis termo gravimétrico: pasto elefante sin pretratatar, pretratado con CH<sub>3</sub>COOH/NaClO<sub>2</sub>, NaOH y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Además, para tener un criterio de comparación se realizó un análisis termo gravimétrico de una muestra de celulosa microcristalina comercial.

Los termogramas se obtuvieron en un equipo DSC/TGA 2STAR SYSTEM, Mettler Toledo, con un rango de temperatura desde 30 °C hasta 600°C a una velocidad de calentamiento de 10 °C min<sup>-1</sup>, con un suministro de nitrógeno (20 ml min<sup>-1</sup>) y crisoles de alúmina con 8mg de muestra aproximadamente (Solorza *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014).

## Hidrólisis enzimática

Para la hidrólisis enzimática se utilizó β-glucosidasa, Sigma Aldrich 49290 con actividad enzimática 6 UI/ g (Unidades Internacionales) y celulasa *Trichoderma reesei* ATCC 26921 con una actividad enzimática de 700EGU/g (unidades de endoglucansa).

La hidrolisis tuvo lugar en un baño termostático a 50°C en tubos de ensayo de 20ml. Se toman 0,5g de muestras pretratadas con NaOH, CH<sub>3</sub>COOH/NaClO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y una muestra de celulosa comercial, se adicionaron 1000μl de enzima celulasa y 0,5 ml (500μl) de enzima β-glucosidasa y se llevó a volumen de 10 ml con tampón citrato (50 mM) y pH de 4,8. Cada ensayo se hizo por triplicado.

Para determinar los azúcares reductores totales se tomaron periódicamente alícuotas de 500 μl a: 1, 2, 3, 6, 12, 24, 48 y 72 horas (Cuadros y Celis, 2007). La concentración de azúcares reductores totales se determinó por, el método DNS (Acido 3,5-Dinitrosalicílico) con glucosa como patrón. La concentración de azúcares reductores se determinó por absorbancia utilizando una longitud de onda de 540nm, de acuerdo a la metodología propuesta en el 2010, por Rabelo (Rabelo, 2010)

## Resultados y discusión

### Composición de las muestras

En la Tabla 3 se muestra la composición de celulosa y lignina de las muestras tratadas y no tratadas, se reportan los pretratamientos realizados a la mayor concentración y temperatura. La fracción que corresponde a “otros” incluye compuestos tales como grupos de ácido urónico, acetil y trazas, incluyendo minerales, ceras, grasas, resinas y gomas (Cardona *et al.*, 2014; Cuadros y Celis, 2007).

**Tabla 3.** Composición de las muestras

Muestra	Celulosa [%]	Lignina [%]	Extractivos [%]	Otros (%)
Sin pretratar	35,29	31,11	16,32	17,28
CH <sub>3</sub> COOH 6M/NaClO <sub>2</sub> 2%	58,42	11,68	10,23	19,68
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (4%,40°C)	59,62	11,43	10,94	18,02
NaOH (2%,120 °C)	62,20	8,44	3,91	25,45

Según los resultados de la Tabla 3 se observa aumento en el contenido de celulosa para las muestras pretratadas, debido a la hidrólisis parcial de la lignina y hemicelulosa, (Rabelo, 2010; Cuadros y Celis, 2007). Las muestras pretratadas con NaOH presentaron un contenido de celulosa del (62,20%) en comparación con las muestras pretratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (59,62%) y CH<sub>3</sub>COOH/NaClO<sub>2</sub> (58,42%). Dicho aumento en el contenido de celulosa, durante los pretratamientos alcalinos, resultó más eficiente debido a la alta eliminación de lignina ya que actúan sobre los enlaces éster y cadenas N-glicosídicas de la lignina (Cuadros y Celis. 2007; Rabelo, 2010).

### Resultados del Pretratamiento con CH<sub>3</sub>COOH/NaClO<sub>2</sub> alcalino y oxidante

En la Tabla 4 se muestran los resultados de la remoción de lignina de los ensayos realizados a las muestras de pasto elefante con CH<sub>3</sub>COOH/NaClO<sub>2</sub>. En la Tabla 5 se observan los resultados de la remoción de lignina de los ensayos realizados con NaOH y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Los resultados de la remoción de lignina del pasto elefante con utilización CH<sub>3</sub>COOH/NaClO<sub>2</sub> muestran que el porcentaje de remoción es mayor (62,46% y 72,73%) a concentraciones de 6,0M de CH<sub>3</sub>COOH y temperaturas de 120 °C. Similares resultados arrojaron el tratamiento con NaOH (72,86%) y con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (63,26%). Todos concuerdan con los obtenidos por Cardona (Cardona *et al.*, 2014), cuyos

porcentajes de remoción de lignina se hallan en un rango de 76,2% a 88,4%.

**Tabla4.** Resultados remoción de lignina pretratamiento con CH<sub>3</sub>COOH/NaClO<sub>2</sub>

Muestra	NaClO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> COOH [mol/L]	Temperatura [°C]	Lignina [%]	Lignina removi-da [%]
1	0,5	6,0	100	17,1	45,00
2	2,0	6,0	100	12,24	60,67
3	0,5	3,0	100	12,84	58,72
4	2,0	3,0	100	16,57	46,73
5	0,5	6,0	120	8,48	72,73
6	2,0	6,0	120	11,68	62,46
7	0,5	3,0	120	10,96	64,77
8	2,0	3,0	120	13,67	56,07

**Tabla 5.** Resultados remoción de lignina pretratamiento alcalino

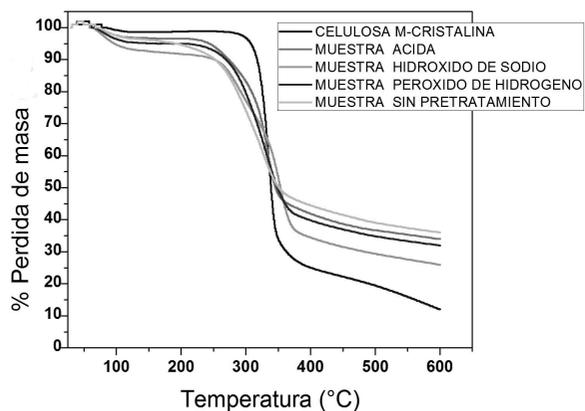
Trat	Concen-tración [%]	Temp [°C]	Lignina [%]	Lignina Remo-vida [%]
NaOH	1	100	10,99	64,66
	2	100	10,57	66,03
	1	120	10,04	67,74
	2	120	8,44	72,86
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2	40	14,23	54,27
	4	40	11,43	63,26

### Propiedades térmicas

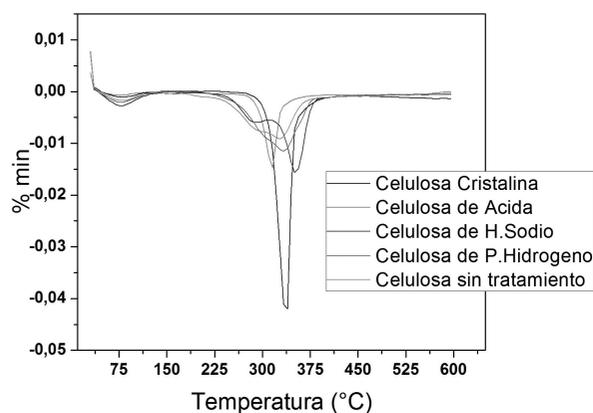
En la Figura 1 (a), se muestran curvas de descomposición térmica de celulosa comercial y de muestras pretratadas con ácido acético/clorito de sodio a 3,0 M y 6,0 M, y la muestra sin pretratar. En la Figura 1 (b) se observa un análisis térmico diferencial (b) obtenido por pretratamiento ácido (CH<sub>3</sub>COOH 6,0M, clorito de sodio 0,5%, temperatura 120 °C), pre tratamiento alcalino (NaOH al 2% y 120 °C), peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 4% y 40°C) y de una muestra comercial de celulosa.

Se puede observar en la Figura 1 (b) que la pérdida de masa para cada una de las muestras pretratadas se inicia a partir de 75°C, lo que indica pérdida de agua, a excepción de la celulosa comercial. El pico más alto temperatura para

la celulosa comercial es de 340 °C, que es la temperatura de degradación de celulosa. Las muestras obtenidas en esta investigación tienen una menor temperatura de degradación debido a la presencia de trazas de hemicelulosa que no se eliminó durante el pretratamiento (Zhang *et al.*, 2014).



(a)



(b)

Figura 1 (a) Análisis termogravimétrico celulosa pasto elefante tratamiento con ácido (b) análisis térmico diferencial

Los resultados de los ART en función de tiempo de hidrólisis enzimática de las muestras pretratadas, sin pretratar y celulosa comercial se muestran en la figura 2.

La mayor conversión de celulosa a glucosa se dio con las muestras tratadas con NaOH; la sacarificación presentó mayor rendimiento en las muestras tratadas con CH<sub>3</sub>COOH/NaClO<sub>2</sub> (80,87%) en comparación con el pretratamiento con NaOH (56,82%).

Tabla 6. Porcentaje de sacarificación de las muestras pretratadas

Muestra	ART [%]
CH <sub>3</sub> COOH/NaClO <sub>2</sub>	80,87
NaOH	56,82
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	57,06
Sin pretratar	44,75
Celulosa cristalina	93,94

La celulosa está acompañada de ramificaciones denominadas hemicelulosas que le da lugar a una estructura amorfa a este material (Rabelo *et al.*, 2011). La hemicelulosa es de carácter hidrófilo, soluble en medios básicos y fácilmente hidrolizable en medios ácidos. La lignina que es la capa externa es un polímero que contiene compuestos alifáticos y aromáticos, es un polímero totalmente amorfo e hidrófobo, soluble en medios básicos (Wörmeyer *et al.*, 2011), (Zhang *et al.*, 2014).

Por tanto, si la hemicelulosa es fácilmente hidrolizable en medios ácidos este pretratamiento puede contribuir a un aumento en la concentración de azúcares reductores totales.

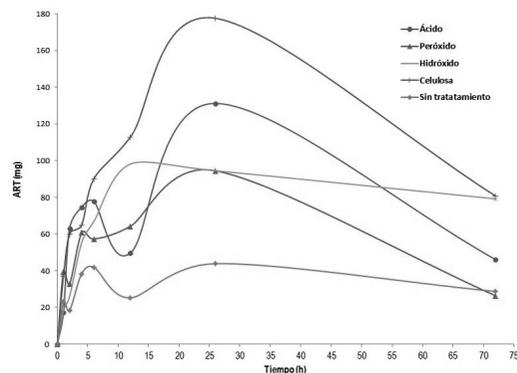


Figura 2. Variación de los ART con el tiempo de hidrólisis enzimática

## Conclusiones

De acuerdo a los pretratamientos CH<sub>3</sub>COOH/NaClO<sub>2</sub> y NaOH los porcentajes de mayor remoción de lignina se presentaron a altas concentraciones de ácido, de hidróxido y a temperaturas (120°C).

Los resultados evidencian que aunque los tratamientos ácidos permitieron una buena deslignificación con un resultado de 72,73% de lignina removida a 120°C, los mayores porcentajes de lignina removida se obtuvieron a partir de los tratamientos realizados con un agente alcalino

y peróxido de hidrógeno, demostrando mayor contenido de celulosa a hidrolizar en las muestras pretratadas con hidróxido de sodio (62,20%) en comparación con las muestras pretratadas con peróxido de hidrógeno (59,62%) y ácido acético /clorito de sodio (58,42%).

El pre tratamiento ácido acético - clorito de sodio presenta resultados similares en cuanto a remoción de lignina en comparación con el pretratamiento con hidróxido de sodio (72% de lignina removida). Para el caso del ácido acético el grado de sacarificación es del (80,8%) y para el Hidróxido de sodio es del 56,0%, lo que indicaría que el pretratamiento con ácido y clorito de sodio además de la remoción de lignina hay un aumento de la regiones amorfas del de la celulosa del pasto elefante lo que conlleva a aumento de la sacarificación.

## Agradecimientos

Los autores agradecen a los miembros del Grupo de Investigación en de Desarrollo de Materiales y Productos (GIDEMP) del Centro ASTIN – Sena. Al Grupo de investigación, innovación y desarrollo tecnológico - SENNOVA por el apoyo financiero por medio de la convocatoria denominada Primer concurso de micro, nano y biotecnología Sena 2013-2014. A la Subdirectora del Centro – ASTIN, Ingeniera Aura Elvira Narvaez.

## Referencias

Basso, V., Machado, J., Da Silva, F., Da Costa, J., Fontana, R., Dillon, AL, and Camassola, M. (2014). Different elephant grass (*Pennisetum purpureum*) accessions as substrates for enzyme production for the hydrolysis of lignocellulosic materials. *Biomass and bioenergy*, 71: 155 – 161.

Cardona, E., Rios, J. Peña, J., and Rios, L. (2014). Effects of the pretreatment method on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentability of the cellulosic fraction from elephant grass. *Fuel*, 118: 41–47.

Cuadros J.F y Celis O.J. (2007). *Efectos del pretratamiento con ácido diluido e hidrólisis enzimática del bagazo de caña para la producción de glucosa*. Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

Hernado, L., Rojas, D., y Giraldo, G. (2009). *Cuantificación de celulosa proveniente de la industria del Mueble. Ingeniera de Recursos Naturales y del Medio Ambiente ocho*. Universidad del Quindío.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2014). *Los biocombustibles y su efecto sobre la seguridad alimentaria*. Recuperado de: <http://www.fao.org/>.

Rabelo, S. (2010). *Avaliacao e otimizacao de pré-tratamentos enzimática do bagaco e Hidrolise de cana de açúcar para a producao de etanol de segunda geracao*. Campinas . Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil.

Secretaría General De la Alcaldía Mayor de Bogotá D.C. (2001). Ley 693 de 2001. *Diario Oficial* 44564.

Singh, R., Shukla, A., Tiwari, S., and Srivastava, Monika (2014). A review on delignification of lignocellulosic biomass for enhancement of ethanol production potential. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 32: 713–728

Siqueira, G, Várnai, A. Ferraz, A., and Milagres, A. (2013) Enhancement of cellulose hydrolysis in sugarcane bagasse by the selective removal of lignin with sodium chlorite. *Applied Energy*, 102: 399–402.

Sluiter A, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D. (2008). *Determination of determination of extractives in biomass, laboratory analytical procedure (LAP) NREL/TP-510-42618* Revised July 2011: National Renewable Energy Laboratory.

Schoening, A. and Johansson, G. (2006). *Acid-insoluble lignin in wood and pulp* (Reaffirmation of T 222 om-02).

Rabelo, S., Amezquita, N., Andrade A., Filho R., Costa A. (2011). Ethanol production from enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse pretreated with lime and alkaline hydrogen peroxide. *Biomass and Bioenergy*, 35: 2600-2607

Wörmeyer, K., Ingram, T., Saake., B. Brunner, G. Smirnova, I. (2011). Comparison of different pretreatment methods for lignocellulosic materials. Part II: Influence of pretreatment on the properties of rye straw lignin. *Bioresource Technology*, 102: 4157–4164.

Zhang, J., Feng, L., Wang, Zhang, D., Ruihong G., and Cheng, G., (2014). Thermogravimetric analysis of lignocellulosic biomass with ionic liquid pretreatment. *Bioresource Technology* 153:379–382