

AURIANE BUENO

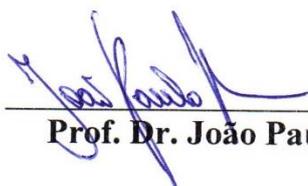
**PRÉ-TRATAMENTO E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA BIOMASSA
LIGNOCELULÓSICA DE MILHO EM REATOR BATELADA**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção de grau de Bacharel em Engenharia Ambiental e Sanitária da Universidade Federal da Fronteira Sul.

Orientador: **Prof. Dr. João Paulo Bender**

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em: 06 / 12 / 2018

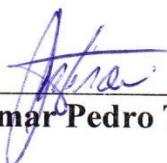
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. João Paulo Bender – UFFS



Prof. Dr. Guilherme Martinez Mibielli – UFFS



Prof. Dr. Siumar Pedro Tironi - UFFS

PRÉ-TRATAMENTO E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA DE MILHO EM REATOR BATELADA

Auriane Bueno*, Guilherme M. Mibielli**, João P. Bender**

RESUMO: A recente necessidade de diversificação da matriz energética mundial tem intensificado as pesquisas relacionadas à utilização de energias ditas renováveis, como as provenientes de resíduos agroindustriais. Diante disso, este estudo objetivou avaliar, em reator tipo batelada, a etapa de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, visando a obtenção de açúcares fermentescíveis. Para tanto, realizou-se um Planejamento Fatorial Completo, 2^2 , com triplicata no ponto central, para avaliar as variáveis de processo “concentração de glicerina” e “tipo de agente químico”. Posteriormente, realizou-se, a hidrólise enzimática da biomassa previamente tratada, utilizando os complexos enzimáticos Ctec2 e Htec2, nas porcentagens de 2 e 0,5% (v/m), respectivamente. Trabalhou-se com temperatura de 50°C e velocidade de agitação 8 do equipamento, por 24 horas. Por meio do planejamento, observou-se que a glicerina apresentou um efeito negativo no processo de obtenção de açúcares fermentescíveis, enquanto a adição dos agentes químicos hidróxido de cálcio e óxido de cálcio, apresentaram resultados positivos na quebra da rigidez estrutural da parede celular vegetal, obtendo um mosto com concentração de açúcares redutores próximos a 0,31 $\text{g}_{\text{açúcares}}/\text{g}_{\text{biomassa}}$ após a etapa de hidrólise enzimática, o que corresponde a aproximadamente 47,4% de rendimento em relação a quantidade das frações de celulose e hemicelulose presentes na biomassa. Diante da resposta positiva obtida, demonstrou-se que a biomassa residual do milho se apresenta como matéria-prima promissora para produção de bioetanol. Também, no que se refere a utilização de agitação mecânica para realização do processo, empregando impelidor do tipo hélice naval, foi possível afirmar que o mesmo manteve o meio homogêneo quando utilizada uma razão sólido/líquido de 60 g/L, sendo favorável à produção de bioetanol lignocelulósico em reator tipo batelada.

Palavras-chave: Açúcares fermentescíveis. Hélice naval. Resíduo. Bioetanol. Hidrólise Enzimática.

ABSTRACT: The recent need to diversify the energy matrix intensified research related to the use of renewable energies, such as those from agro-industrial waste. Therefore, this work had as objective to evaluate, in a batch reactor, the step of pre-treatment of the lignocellulosic biomass, aiming to the production of fermentable sugars. For this purpose, the Full Factorial Planning, 2^2 , with triplicate at the central point, was used to evaluate the process variables "glycerin concentration" and "type of chemical agent". Then, enzymatic hydrolysis of the biomass was carried out, using the enzymatic complexes Ctec2 and Htec2, in percentages of 2 and 0.5% (v/m), respectively. It was worked with temperature of 50°C and speed of agitation 8 of the equipment, for 24 hours. Through the planning, it was observed that glycerin had a negative effect on the process, while the addition of calcium hydroxide and calcium oxide resulted in a good reduction in the structural rigidity of the cell wall of the plant, obtaining a must with concentration of sugars around 0.31 $\text{g}_{\text{sugar}}/\text{g}_{\text{biomass}}$, corresponding to approximately 47.4% yield relative to the amount of cellulose and hemicellulose fractions present in the biomass. In view of the positive response obtained, the residual corn biomass was shown as a promising raw material for the production of bioethanol. In addition, with regard to the use of mechanical agitation, using impeller of the naval type, it was possible to affirm that it

*Discente do curso de Engenharia Ambiental e Sanitária, Universidade Federal da Fronteira Sul – *campus* Chapecó

**Docente do curso de Engenharia Ambiental e Sanitária, Universidade Federal da Fronteira Sul – *campus* Chapecó

maintained the homogeneous medium with the reason solid/liquid of 60 g/L, being favorable for the production of lignocellulosic bioethanol in a batch reactor.

Keywords: Fermentable sugars. Naval propeller. Residue. Bioethanol. Enzymatic Hydrolysis.

1. INTRODUÇÃO

A busca por alternativas renováveis de energia vem crescendo, sendo motivada principalmente pelo aumento no consumo energético e alta dependência dos combustíveis fósseis, que além de emitirem grande quantidade de compostos ambientalmente prejudiciais, têm suas fontes escassas e mal distribuídas, estando sempre sujeitos as oscilações de preços do mercado (CARVALHO, 2016).

A diversificação da matriz energética de forma sustentável é uma estratégia fundamental para enfrentar a questão da segurança energética, além de colaborar na construção de países mais competitivos e atentos ao desenvolvimento sustentável, principalmente no caso daqueles ditos emergentes, como o Brasil, que estão em processo de crescimento, mas ainda não alcançaram níveis satisfatórios de desenvolvimento econômico e social (REIS, 2015).

Uma alternativa limpa e renovável, capaz de suprir essa necessidade de forma eficaz, são os biocombustíveis obtidos a partir de resíduos agroindustriais, como o bioetanol produzido a partir da biomassa lignocelulósica residual, que oferecem flexibilidade e menor preço, além da consequente minimização dos problemas relacionados à disposição final desses materiais (RODRIGUES et al., 2017).

Grande parte desses resíduos lignocelulósicos são gerados pela produção de alimentos. Porém, por ser obtido a partir do residual de produção, o etanol de segunda geração (2G) não compete por matéria-prima com esse mercado. Além disso, pode ser produzido em larga escala sem que seja necessário um aumento na área plantada (CARVALHO, 2016).

Dentre os materiais lignocelulósicos passíveis de geração de bioetanol, a biomassa residual de milho apresenta destaque devido à sua expressiva produção no país. Segundo a Conab (2018), nas safras de 2016 a 2018, foram produzidas cerca de 190 mil toneladas de milho no Brasil, evidenciando a grande quantidade de resíduos gerados, que atualmente permanecem em campo após a colheita.

A obtenção do etanol a partir desse tipo de biomassa, ocorre por meio do processo de hidrólise de seus polissacarídeos constituintes, e posterior fermentação. Porém, esses materiais possuem estruturas rígidas e não reacionais, principalmente devido à presença da lignina, que está posicionada na parte exterior da parede celular, e fornece proteção à danos externos. Assim, uma etapa adicional de pré-tratamento é necessária para facilitar o acesso dos agentes hidrolíticos ao interior dessa estrutura, por meio da expansão da lignina e redução da cristalinidade da celulose (SANTOS, 2014; RABELO, 2010).

Dessa forma, um dos desafios para tornar a produção de etanol de segunda geração economicamente viável é a otimização desse processo de pré-tratamento, tanto em termos de custo quanto em rendimento. Nesse sentido, além da adição de um composto químico responsável pelo processo, pesquisas recentes têm estudado a adição de outras substâncias, sendo uma delas a glicerina, composto residual da produção de biodiesel (SINGHABHANDHU; TEZUKA, 2010).

Com a obrigatoriedade da adição do biodiesel ao diesel no Brasil, o mercado de glicerol (glicerina bruta) está saturado, havendo a necessidade de pesquisas relacionadas ao reaproveitamento desse subproduto em outros processos. No caso do pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, o glicerol, sendo um solvente orgânico e tendo estrutura polar, pode

penetrar facilmente na estrutura vegetal, exercendo importante papel na quebra da lignina, e contribuindo com a reutilização desse composto (MARTIN et al., 2011).

Outras substâncias que têm ganhado destaque são os chamados surfactantes. Além de sua ação antiespumante, relatos recentes da literatura indicam que a adição de surfactantes não-iônicos melhora a conversão da biomassa em açúcares. Isso porque, segundo Zhang et al. (2017), a presença da substância no meio aumenta a atividade e estabilidade das celulases, intensificando as interações entre essas enzimas e seus substratos.

Além disso, após o processo de pré-tratamento, devido à natureza hidrofóbica desses compostos, pode haver a ligação destes à lignina, impedindo que ela se ligue às enzimas, o que diminuiria a quantidade de complexo enzimático presente no meio para reação. Segundo estudos realizados utilizando os surfactantes Tween 80 e BSA, a adição desses componentes pode aumentar em até 2,7 vezes o rendimento de açúcares após a hidrólise enzimática (ZHANG et al., 2017).

Outra dificuldade encontrada para ambas as etapas de conversão da biomassa em açúcares passíveis de fermentação é a eficiência do processo de transferência de calor e massa, variável que controla a velocidade da reação, e tem grande impacto no custo global do processo. Assim, a fim de promover uma mistura adequada e, por consequência, melhorar a transferência de calor e massa durante o processo, deve submeter-se o meio reacional à agitação. A agitação objetiva o máximo contato entre os substratos, para que as reações sejam aceleradas e o meio permaneça sempre homogêneo (CORRÊA, 2016).

Nesse sentido, industrialmente são utilizados agitadores mecânicos, constituídos por impelidores acoplados a uma haste, que impõem movimento ao fluido, sendo que sua eficiência reflete diretamente no sucesso do processo, e no seu custo final. Os sistemas de agitação podem operar em regime contínuo, onde a alimentação é feita o tempo todo e não há interrupções no processo, ou em batelada, quando o reator é alimentado, o processo ocorre no interior dele, e somente após os produtos serem retirados é que se inicia uma nova produção (CORRÊA, 2016).

Tendo, portanto, como desafio atual o melhoramento das etapas de pré-tratamento e hidrólise enzimática dos resíduos lignocelulósicos, assim como, levando em conta a importância de se estudar ambos os processos em uma unidade experimental voltada a utilização na indústria, o presente trabalho teve como objetivo buscar a maximização na obtenção de açúcares fermentescíveis, em reator batelada, via agitação mecânica.

2. METODOLOGIA

2.1. MATERIAIS

2.1.1 Biomassa lignocelulósica

A biomassa utilizada foi obtida nas áreas experimentais da Universidade Federal da Fronteira Sul – *Campus* Chapecó, e corresponde ao híbrido de milho DKB 177 Pro 2. Depois de retirados os materiais indesejáveis, como terra e outras vegetações, a mesma foi seca em estufa a 50°C, por 48h. Em seguida, a biomassa passou por moagem em moinho de facas e peneiramento em peneira com abertura de 30 mesh, resultando em partículas de tamanhos inferiores à 0,6 mm. Cabe salientar que se utilizou, para os ensaios experimentais, a fração correspondente ao caule do milho.

2.1.2. Enzimas

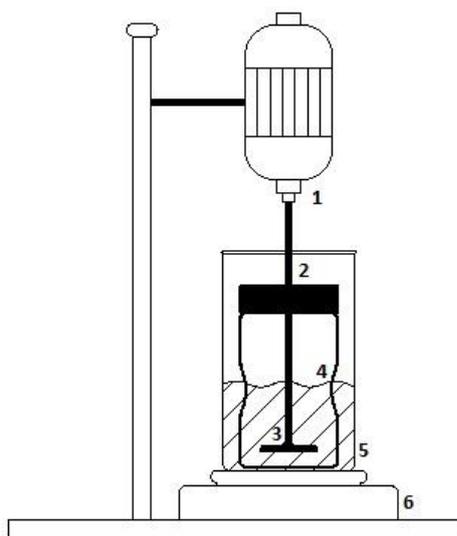
Os complexos enzimáticos utilizados na etapa de hidrólise enzimática correspondem às preparações comerciais Cellic Ctec2 e Htec2, provenientes da Novozymes A/S (Bagsvaerd, Dinamarca) e fornecidas pela Novozymes Latin America (Araucária – PR, Brasil).

A preparação Cellic Ctec2 é um complexo celulásico, com elevada quantidade de β -glucosidases, para degradação da celulose em seus açúcares fermentescíveis. A mesma é compatível com diferentes matérias-primas e tipos de pré-tratamento, assim como é tolerante aos inibidores gerados no processo. Sua temperatura e pH ideais correspondem a 45 – 50°C e 5,0 – 5,5, respectivamente. A Cellic Htec2 é uma endoxilanase específica para quebra da hemicelulose, com temperatura ideal entre 45 – 50°C e pH 5,0 (NOVOZYMES, 2010).

2.1.3. Aparato experimental

Para a execução dos testes de pré-tratamento e hidrólise enzimática, visando maior aproximação do processo de agitação utilizado industrialmente, foi adaptada uma unidade experimental (Figura 1), composta por um reator tipo tanque agitado com volume de trabalho de 500 mL (volume total de 700 mL), um agitador mecânico (Fisatom, modelo 711) acoplado à um impelidor com três hélices do tipo naval, e um banho de óleo, para controle de temperatura, aquecido por chapa aquecedora (GoStirrer modelo MS-H-S). Foram consideradas chicanas as curvaturas presentes em ambos os lados do tanque utilizado.

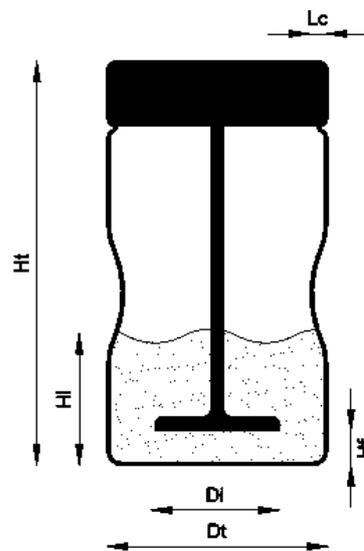
Figura 1 – Representação esquemática do aparato experimental: (1) motor de agitação; (2) Reator; (3) Impelidor; (4) Chicanas; (5) Banho de óleo e; (6) Chapa aquecedora



Fonte: Próprios autores, 2018.

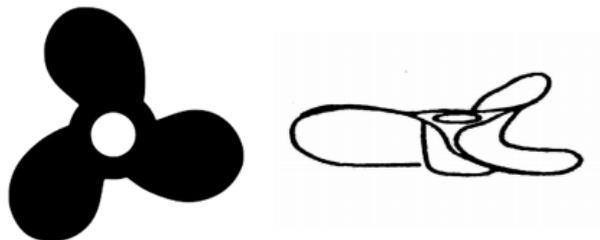
Na Figura 2 são detalhadas as medidas do reator em questão, enquanto na Figura 3 é apresentado o impelidor utilizado para o estudo, do tipo hélice naval.

Figura 2 – Medidas do reator utilizado



Fonte: Próprios autores, 2018.

Figura 3 – Impelidor tipo hélice naval



Fonte: Buller e Ortega, 2012.

Na Tabela 1 estão dispostos os valores para as dimensões do tanque agitado e do impelidor.

Tabela 1 – Dimensões do tanque agitado e impelidor

Parâmetro	Nomenclatura	Dimensão (mm)
Altura do tanque	Ht	170,0
Altura do líquido	Hl	30,0
Diâmetro do tanque	Dt	70,0
Diâmetro do impelidor	Di	60,0
Distância entre o impelidor e o fundo do tanque	Df	15,0
Largura da chicana	Lc	13,0

Fonte: Próprios autores, 2018.

O agitador mecânico utilizado possui marcação analógica, com velocidade variando de 1 a 8. Cada um dos pontos corresponde a aproximadamente 225 rpm, quando utilizado somente água como fluido a ser agitado. Na Tabela 2 é apresentado o valor de rotações por minuto para cada uma das marcações do equipamento.

Tabela 2 – Valores de rotações por minuto para cada marcação de velocidade apresentada pelo agitador mecânico utilizado

Marcação do equipamento	Rotações por minuto correspondente (rpm)
1	225
2	450
3	675
4	900
5	1125
6	1350
7	1575
8	1800

Fonte: FISATOM, 2018.

2.2. PROCEDIMENTOS

2.2.1. Caracterização da biomassa

A caracterização da biomassa utilizada neste estudo foi realizada por Bohn et al. (2018). Foram determinados os teores de umidade, cinzas, extrativos, lignina total, celulose e hemicelulose, utilizando a metodologia descrita por Rabelo (2010).

2.2.2. Testes preliminares

Com o objetivo de avaliar o sistema reacional para a realização dos ensaios de pré-tratamento e hidrólise enzimática em reator batelada, realizaram-se testes preliminares para a obtenção de um meio homogêneo. Os parâmetros avaliados foram: razão sólido/líquido; tempo de pré-tratamento e; velocidade de agitação.

Primeiramente, avaliaram-se as razões sólido/líquido de 100 e 60 g biomassa/L de solução, utilizando 20 e 12 g de biomassa, respectivamente. Para avaliação do melhor tempo de pré-tratamento, realizou-se um ensaio aumentando o tempo de processo, que no teste anterior foi de 12 horas, para 24 horas. No tocante a avaliação da velocidade de agitação, foram realizados testes aumentando a mesma para a máxima rotação do equipamento, correspondente a velocidade 8. Realizaram-se ensaios para os tempos de 12 e 24 horas de pré-tratamento.

Para os testes, 12 g de biomassa foram pesadas (exceto para o teste de 100 g/L, que utilizou 20 g) e tratadas com 200 mL de solução contendo 2% de hidróxido de cálcio (% m/m de biomassa). Tais valores iniciais para a solução de pré-tratamento foram fundamentados na

melhor condição obtida por Bohn et al. (2018), utilizando agitação orbital em shaker. Após a adição da solução para pré-tratamento, as amostras foram colocadas em agitador mecânico Fisatom, modelo 711, a 70°C e velocidade 4 - exceto para o teste com aumento da agitação - pelo período de pré-tratamento supracitado. Após transcorrido o processo, a etapa de hidrólise seguiu conforme descrito no item 2.2.4 (Hidrólise enzimática).

2.2.3. Pré-tratamento

A partir das melhores condições definidas nos testes preliminares, empregou-se um planejamento experimental fatorial completo 2^2 , com triplicata no ponto central, objetivando identificar o efeito de diferentes agentes químicos na etapa de pré-tratamento, que resultasse na maior disponibilização dos constituintes da celulose e hemicelulose para a etapa de hidrólise enzimática.

Para tanto, investigaram-se os parâmetros “concentração de glicerina” e “tipo de agente químico” utilizado para o pré-tratamento. Foram realizados ensaios com óxido de zinco, óxido de cálcio e hidróxido de cálcio. Os tratamentos e níveis investigados estão dispostos na Tabela 3.

Tabela 3 – Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 , com triplicata no ponto central, empregado para avaliar o efeito de diferentes substâncias adicionadas para pré-tratamento.

Ensaio	Concentração de glicerina (mL)	Óxido de Cálcio/Hidróxido de Cálcio (g)
1	0,0 (-1)	2,4/0,0 (-1)
2	2,4 (+1)	2,4/0,0 (-1)
3	0,0 (-1)	0,0/2,4 (+1)
4	2,4 (+1)	0,0/2,4 (+1)
5	1,2 (0)	1,2/1,2 (0)
6	1,2 (0)	1,2/1,2 (0)
7	1,2 (0)	1,2/1,2 (0)

Fonte: Próprios autores, 2018.

Para os ensaios, amostras de 12 g de biomassa foram pesadas e tratadas segundo o definido no planejamento experimental, conforme Tabela 3. Também foi adicionado agente Tween 80 na concentração de 2,5% (v/v de solução). Posteriormente, as amostras foram colocadas sob a influência do agitador mecânico, a 70°C e velocidade 8 do equipamento, por 12 horas.

2.2.4. Hidrólise enzimática

Transcorrido o tempo de pré-tratamento, as amostras foram neutralizadas com solução de ácido cítrico (1 M) até pH ótimo (5,0). As enzimas foram adicionadas na concentração de 2% para Ctec2 e 0,5% para Htec2 (volume de enzima/m de biomassa), diluídas 1:10 em tampão acetato de sódio (0,05 mol/L e pH 4,8). As amostras foram novamente colocadas sob agitação

mecânica, a 50°C e velocidade conforme o descrito anteriormente para cada teste, por 24 horas.

Após o processo, os hidrolisados foram centrifugados a 10000 rpm por 10 minutos em centrífuga SIGMA 3-16KL. Alíquotas foram filtradas em filtros de membrana GS não estéril, da marca Tedia, tipo PVDF, com poros de 0,22 Milipore, e diluídas 1:2 em água destilada, sendo analisadas em equipamento HPLC modelo LC-MS 2020, da marca SHIMADZU, conforme as seções 2.3.1 (Conteúdo de carboidratos) e 2.3.2 (Conteúdo de inibidores).

2.3. MÉTODOS ANALÍTICOS

Para a determinação da concentração de carboidratos e inibidores presentes nas amostras após os processos de pré-tratamento e hidrólise utilizou-se equipamento HPLC modelo LC-MS 2020, da marca SHIMADZU. Primeiramente, elaborou-se uma curva padrão, gerada utilizando soluções de concentrações conhecidas da substância de interesse, correlacionadas com suas respectivas áreas, obtidas após injeção no cromatógrafo. Assim, foi possível calcular concentrações desconhecidas de açúcares a partir de uma dada área. Foram preparadas soluções padrões de celobiose, glicose, xilose, ácido acético, furfural e 5-hidroximetilfurfural (HMF).

2.3.1. Conteúdo de carboidratos

Após a etapa de hidrólise enzimática, uma alíquota de cada amostra filtrada e diluída foi injetada no cromatógrafo, juntamente com os padrões, utilizando-se para análise a Coluna SHODEX ASAHIPAK NH2P-50 4E, com detector padrão ELSD – LTII (Low Temperature-Evaporative Light Scattering Detector)/Shimadzu, para glicose, xilose e celobiose.

Para as análises, as condições foram de 15 µL de volume de injeção, fase móvel com solução de acetonitrila e água ultrapura (75:25), taxa de fluxo de 0,8 mL/min, temperatura do forno de 30°C, temperatura do detector de 52°C e 25 minutos de tempo de execução.

A quantidade total de açúcares presentes na amostra foi calculada conforme a Equação 1 (RABELO, 2010).

$$\text{Total de açúcares (g/g}_{\text{biomassa}}) = \frac{C_{gl} + C_{xil} + C_{cel}}{m} \quad (1)$$

Onde: C_{gl} é concentração de glicose, C_{xil} a concentração de xilose, C_{cel} a concentração de celobiose, e m é a razão sólido/líquido utilizada nos processos de pré-tratamento e hidrólise (todas em g/L de solução).

2.3.2. Conteúdo de inibidores

São considerados inibidores no processo o ácido acético, furfural e 5-hidroximetilfurfural (HMF).

Para quantificação do ácido acético, as amostras já filtradas e diluídas foram injetadas, utilizando-se a Coluna NST-18 com detector padrão RID – 10A. Para as análises, as condições foram de 20 µL de volume de injeção, fase móvel com solução de água ultrapura acidificada

com H₃PO₄ (0,1%), taxa de fluxo de 0,8 mL/min, temperatura do forno e detector de 40°C, e 15 minutos de tempo de execução.

Para as análises de furfural e 5-hidroximetilfurfural (HMF), as amostras também filtradas e diluídas foram injetadas em Coluna NST-18, com detector padrão SPD – M20A (Diodo Array Detector)/Shimadzu. As condições de análise foram de 20 µL de volume de injeção, fase móvel com solução de água ultrapura e acetonitrila (85:15) acidificada com ácido acético (1%), taxa de fluxo de 0,8 mL/min, temperatura do forno e detector de 40°C, e 20 minutos de tempo de execução.

A quantificação do total de inibidores presentes foi calculada conforme Equação 2 (RABELO, 2010).

$$\text{Inibidores totais (g/g}_{\text{biomassa}}) = \frac{C_{ac} + C_{HMF} + C_{fur}}{m} \quad (2)$$

Onde: C_{ac} é a concentração de ácido acético, C_{HMF} a concentração de 5-hidroximetilfurfural, C_{fur} a concentração de furfural e m é a razão sólido/líquido utilizada nos processos de pré-tratamento e hidrólise (todas em g/L de solução).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.2. CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA

A caracterização da biomassa é uma etapa essencial do trabalho, pois fornece informações quanto a constituição do material, com o intuito de obtenção do máximo rendimento glicosídico posteriormente nas etapas de pré-tratamento e hidrólise.

Conforme indicado por Bohn et al. (2018), a fração do caule do milho utilizada neste estudo apresenta 28,44% de hemicelulose, 37,01% de celulose e 17,46% de lignina total. A literatura sugere que, no geral, os valores para essas frações se encontram na faixa de 40 – 60% para celulose, 15 – 50% para hemicelulose e 10 – 30% para lignina. Salienta-se que normalmente não são encontrados valores fixos, já que cada biomassa passa por variações diferentes de clima, pH do solo, pragas e etc., o que influencia na sua composição final (CARVALHO, 2016; RABELO, 2010). Assim, aproximadamente 65% da biomassa, correspondente aos teores de celulose e hemicelulose, é passível de conversão em açúcares fermentescíveis.

No que se refere aos teores de extrativos, o autor aponta um valor de 25,36% para a biomassa. Esses são componentes orgânicos de baixo peso molecular e grande variedade estrutural, pertencentes a parede celular da biomassa, sendo também responsáveis por barrar ações externas contra as células. Dessa forma, esses compostos podem ser considerados inibitórios, já que podem inibir a ação enzimática mediante a imposição dessa barreira. Assim, quanto menor a presença de extrativos, maior será o acesso das enzimas a estrutura interna da biomassa, aumentando sua ação (BOHN et al., 2018; ANDRADE, 2014).

Por fim, o percentual de cinzas apresentado é de 2,86%. Segundo Rabelo (2010), a proporção de resíduos não orgânicos, na qual se encontram as cinzas, varia significativamente segundo a espécie, idade e condições de crescimento da planta utilizada.

3.3. TESTES PRELIMINARES

Para melhor entendimento do comportamento da solução frente a agitação mecânica imposta ao meio reacional, o primeiro teste realizado foi para definição da melhor razão sólido/líquido. Os resultados em termos de carboidratos para as razões estudadas estão expressos na Tabela 4. O rendimento dos ensaios foi calculado com base na porcentagem de celulose e hemicelulose presentes na biomassa (65,45%).

Tabela 4 – Rendimento glicosídico para diferentes razões sólido/líquido, com pré-tratamento de 12 horas

Ensaio	Razão S/L (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Celobiose (g/L)	CT (g/L)	g CT/g biomassa	Rendimento (%) *
1	100	9,49 ± 1,30	5,06 ± 0,82	1,09 ± 0,13	15,65 ± 2,25	0,16 ± 0,02	23,91 ± 3,44
2	60	7,57 ± 0,43	3,56 ± 0,20	0,70 ± 0,05	11,83 ± 0,68	0,20 ± 0,01	30,12 ± 1,73

(S/L): Sólido/líquido; (CT): Carboidratos totais; (*): Percentual de celulose e hemicelulose convertido.

Fonte: Próprios autores, 2018.

Com os resultados dos testes apresentados na Tabela 4, observa-se que há um incremento no rendimento da reação com a redução da razão sólido/líquido de 100 para 60 g/L. Tal comportamento está diretamente relacionado a viscosidade do meio reacional, já que uma redução na concentração de sólidos reduz a viscosidade do meio e, por consequência, facilita o processo de homogeneização. Também, segundo Buller e Ortega (2012), a hélice utilizada nos ensaios, do tipo naval, não é recomendada para meios com alta viscosidade, como o caso da mistura inicial dos testes com 100 g/L, que é mais espessa e tem grande quantidade de sólidos em suspensão.

Na Tabela 5 são apresentados os resultados em termos de inibidores obtidos nos ensaios 1 e 2.

Tabela 5 – Geração de inibidores para diferentes razões sólido/líquido, com pré-tratamento de 12 horas

Ensaio	Razão S/L (g/L)	Ácido acético (g/L)	HMF (g/L)	Furfural (g/L)	IT (g/L)	g IT/g biomassa
1	100	3,63 ± 0,40	ND	ND	3,63 ± 0,40	0,04 ± 0,00
2	60	1,50 ± 0,09	ND	ND	1,50 ± 0,09	0,02 ± 0,00

(S/L): Sólido/líquido; (ND): Não detectado; (HMF): 5-hidroximetilfurfural; (IT): Inibidores totais.

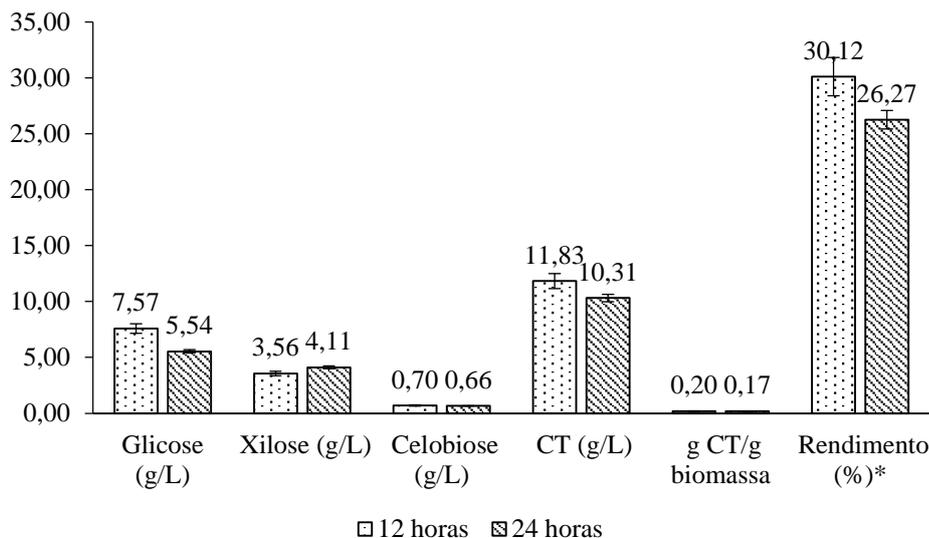
Fonte: Próprios autores, 2018.

Em relação aos componentes inibitórios, prejudiciais principalmente à fermentação, etapa final da produção de etanol, é possível perceber maior formação na condição de maior razão sólido/líquido. Isso pode dever-se ao fato de que, esta maior concentração de biomassa

aumentou a presença de hemicelulose no meio, que quando quebrada gerou maior quantidade ácido acético, um dos seus constituintes.

Assim, a condição para a razão sólido/líquido do meio ficou estabelecida em 60 g/L. Em seguida, um novo ensaio foi realizado (ensaio 3) para o estudo do tempo de pré-tratamento, aumentando o período de processo para 24 horas. Os resultados foram comparados com o ensaio anterior (ensaio 2), com 12 horas de pré-tratamento, como demonstrado na Figura 4.

Figura 4 – Rendimento glicosídico para diferentes tempos de pré-tratamento



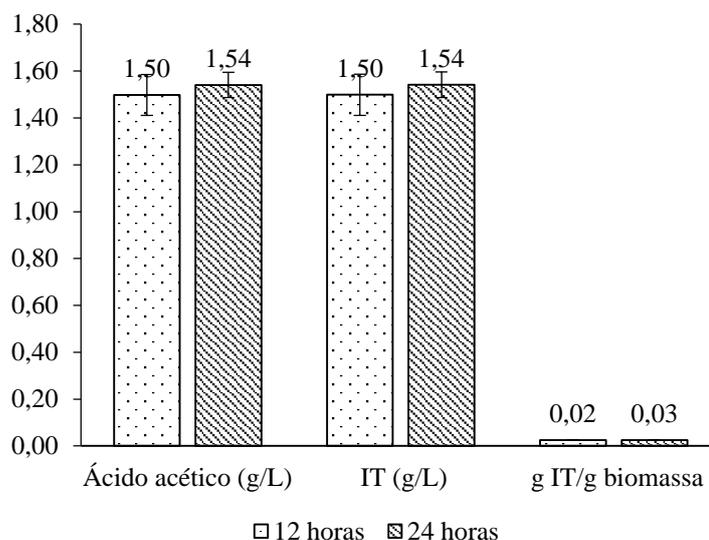
(CT): Carboidratos totais; (*): Percentual de celulose e hemicelulose convertido.

Fonte: Próprios autores, 2018.

A variável tempo é importante ao processo já que, se for inferior ao exigido, pode não resultar em um bom rendimento glicosídico e, quando superior, encarecerá o produto final devido ao gasto com energia. Observa-se que a conversão em açúcares foi menor no caso do pré-tratamento de 24 horas, apesar de muito próxima. Os resultados similares não significam que o tempo não é significativo ao processo, mas sim que a partir de 12 horas as enzimas já conseguiram hidrolisar a maior parte da biomassa passível de conversão em açúcares, nas condições do teste.

Também, quanto maior o tempo de reação, maior a possibilidade de decomposição dos açúcares gerados, o que pode ocasionar uma redução no rendimento glicosídico, conforme apresentado na Figura 4, e aumento na geração de inibidores. Entretanto, conforme observado na Figura 5, o aumento na formação de compostos inibitórios para o teste de 24 horas foi muito pequeno, não sendo detectada presença de HMF e furfural. Apesar disso, podem ter sido formados outros tipos de compostos que não foram quantificados, tais como compostos fenólicos e ácidos orgânicos, como o ácido levulinico e o ácido fórmico.

Figura 5 – Geração de inibidores para diferentes tempos de pré-tratamento



(IT): Inibidores totais.

Fonte: Próprios autores, 2018.

Por meio dos resultados obtidos nos ensaios com 12 horas de processo, foi possível combinar um menor gasto energético e uma maior conversão final em açúcares fermentescíveis. Além disso, optando pelo pré-tratamento de 12 horas, é possível produzir o dobro de produto em relação ao processo de 24 horas. Contemplando essas vantagens, estabeleceu-se o tempo de pré-tratamento como sendo de 12 horas.

O último teste preliminar realizado foi para avaliação da velocidade de agitação do equipamento. Os testes anteriormente citados foram realizados com velocidade 4, em função do não conhecimento da capacidade do agitador em trabalhar por um período superior a 24 horas. A partir da resposta positiva do equipamento, pôde-se aumentar essa velocidade para a máxima, correspondendo a marcação 8. Assim, foram realizados novos testes para os tempos de pré-tratamento de 12 e 24 horas. Os resultados estão dispostos na Tabela 6.

Tabela 6 – Rendimento glicosídico com velocidade 8 de agitação, para 12 e 24 horas de pré-tratamento

Ensaio	Tempo de PT (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Celobiose (g/L)	CT (g/L)	g CT/g biomassa	Rendimento (%) *
4	24	6,14 ±	3,09 ±	0,86 ±	10,08 ±	0,17 ±	25,68 ±
		0,14	0,03	0,01	0,17	0,00	0,44
5	12	14,47 ±	6,74 ±	ND	21,21 ±	0,35 ±	54,00 ±
		0,10	0,05		0,15	0,00	0,39

(PT): Pré-tratamento; (ND): Não detectado; (CT): Carboidratos totais; (*): Percentual de celulose e hemicelulose convertido.

Fonte: Próprios autores, 2018.

Como é possível observar segundo a Tabela 6, o rendimento glicosídico apresentou grande aumento a partir de uma maior velocidade de agitação, para o tempo de 12 horas de pré-tratamento. Isso se deve ao fato de que, com o aumento da velocidade, há um acréscimo na eficiência da agitação e uma consequente melhora na mistura das fases presentes, aumentando a interação entre agente químico e biomassa, na etapa de pré-tratamento, e entre o catalisador enzimático e as estruturas da hemicelulose e celulose, na etapa de hidrólise enzimática.

No que se refere ao ensaio 4, com período de 24 horas de pré-tratamento, segundo teste Tukey realizado com 95% de confiança, não houve diferença significativa em relação ao teste anterior (ensaio 3), com velocidade 4, que resultou em 26,27% de rendimento. Isso pode ser explicado devido a aceleração do processo de degradação dos compostos com o aumento da velocidade. Assim, um possível acréscimo na produção de açúcares pode ter sido compensado por um aumento na taxa de degradação dos mesmos. Apesar de os resultados em termos de inibidores, expressos na Tabela 7, não terem apresentado esse aumento na degradação, podem ter sido produzidos outros compostos não quantificados, como o ácido levulinico, ácido fórmico e compostos fenólicos.

Tabela 7 – Geração de inibidores com velocidade 8, para 12 e 24 horas de pré-tratamento

Ensaio	Tempo de PT (h)	Ácido acético (g/L)	HMF (g/L)	Furfural (g/L)	IT (g/L)	g IT/g biomassa
4	24	1,99 ± 0,03	ND	ND	1,99 ± 0,03	0,03 ± 0,00
5	12	1,62 ± 0,01	ND	ND	1,62 ± 0,01	0,03 ± 0,00

(PT): Pré-tratamento; (HMF): 5-hidroximetilfurfural; (ND): Não detectado; (IT): Inibidores totais.

Fonte: Próprios autores, 2018.

Por fim, foi realizada a repetição do ensaio 5, que apresentou melhor rendimento, para verificar a repetitividade dos resultados. Os valores obtidos para carboidratos e inibidores estão dispostos na Tabela 8. Não foi detectada a presença de celobiose, HMF e furfural.

Tabela 8 – Rendimento glicosídico para repetição do ensaio com melhor rendimento

Ensaio	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	CT (g/L)	g CT/g biomassa	Rendimento (%) *	Ácido Acético (g/L)	g IT/g biomassa
6	13,44 ± 0,04	6,43 ± 0,01	19,87 ± 0,05	0,33 ± 0,00	50,59 ± 0,13	1,54 ± 0,01	0,03 ± 0,01

(CT): Carboidratos totais; (*): Percentual de celulose e hemicelulose convertido; (IT): Inibidores totais.

Fonte: Próprios autores, 2018.

Como observado na Tabela 8, os resultados foram repetidos em relação ao teste com melhor rendimento realizado anteriormente (ensaio 5), sendo definida esta como sendo a condição para os próximos ensaios: razão sólido/líquido de 60 g/L, pré-tratamento de 12 horas e máxima agitação do equipamento, correspondente a velocidade 8.

A importância dessa etapa de testes preliminares fica evidenciada se forem comparados

os rendimentos do primeiro teste (ensaios 1), feito com a variação da razão sólido/líquido, e do último (ensaio 5), com o aumento da velocidade, partindo de um rendimento inicial de 30,12% para 51,91%, respectivamente.

3.4. PRÉ-TRATAMENTO E HIDRÓLISE

Primeiramente, os ensaios do planejamento fatorial completo foram realizados utilizando Óxido de Zinco (ZnO). Contudo, houve insucesso na realização dos mesmos, que não apresentaram bons resultados na conversão em açúcares em nenhuma das três tentativas realizadas. Isso pode ter ocorrido devido a formação de grande quantidade de espuma durante o processo, o que pode ter impedido o contato da enzima com o substrato, impossibilitando sua ação. Essa contrariedade também não foi solucionada após a adição de um agente antiespumante, Tween 80, na proporção de 2,5% (v/v solução). Assim, optou-se por substituir o Óxido de Zinco pelo composto Óxido de Cálcio (CaO).

Os resultados em termos de rendimento glicosídico, obtidos por meio da técnica de planejamento de experimentos, para avaliar o efeito das variáveis “concentração de glicerina” e “tipo de agente químico”, estão dispostos na Tabela 9. Também é apresentado o valor de rendimento para cada ensaio, calculado com base na concentração de celulose e hemicelulose presente na biomassa (65,45%), segundo a caracterização realizada por Bohn et al. (2018).

Tabela 9 – Rendimento glicosídico obtido com a variação dos agentes de pré-tratamento por meio de planejamento experimental

Ensaio	Glicerina mL/g)	CaO/ Ca(OH) ₂ (g/g)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Celobiose (g/L)	CT (g/L)	g CT/g biomassa	Rendimento (%) *
1	0,0 (-)	2,4/0,0 (-)	15,97 ± 0,06	7,64 ± 0,03	ND	23,61 ± 0,09	0,39 ± 0,00	60,12 ± 0,23
2	2,4 (+)	2,4/0,0 (-)	14,72 ± 0,30	4,43 ± 0,03	ND	19,15 ± 0,31	0,32 ± 0,01	48,76 ± 0,80
3	0,0 (-)	0,0/2,4 (+)	13,31 ± 1,39	6,10 ± 0,49	ND	19,41 ± 1,87	0,32 ± 0,03	49,42 ± 4,77
4	2,4 (+)	0,0/2,4 (+)	12,85 ± 1,10	3,83 ± 0,34	0,54 ± 0,06	17,23 ± 1,49	0,29 ± 0,02	43,86 ± 3,78
5	1,2 (0)	1,2/1,2 (0)	11,75 ± 0,67	3,31 ± 0,21	0,69 ± 0,05	15,75 ± 0,93	0,26 ± 0,02	40,12 ± 2,36
6	1,2 (0)	1,2/1,2 (0)	11,77 ± 0,59	4,45 ± 0,85	0,73 ± 0,01	16,94 ± 1,44	0,28 ± 0,02	43,14 ± 3,66
7	1,2 (0)	1,2/1,2 (0)	11,76 ± 0,01	3,88 ± 0,80	0,71 ± 0,03	16,35 ± 0,84	0,27 ± 0,01	41,63 ± 2,14

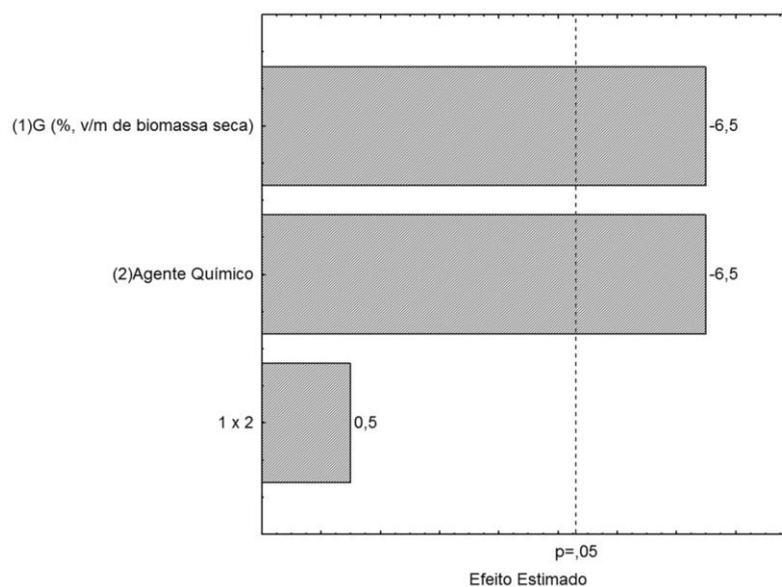
(ND): Não detectado; (CT): Carboidratos totais; (*): Percentual de celulose e hemicelulose convertido.

Fonte: Próprios autores, 2018.

Analisando os resultados da Tabela 9, observa-se que a melhor condição encontrada foi no ensaio 1, com 0,39 g de açúcares obtidos por grama de biomassa, correspondendo a um rendimento de 60,12%. Seguido desse ponto, estão os ensaios 3 e 2, que apresentaram 0,32 g CT/g biomassa.

Analisando o gráfico de pareto, exibido pela Figura 6, é possível perceber que as duas variáveis estudadas apresentaram efeito significativo negativo. Isso revela que, no caso da glicerina, quanto menor for a concentração adicionada, melhor a conversão. Para o parâmetro agente químico, o tratamento negativo representa o Óxido de Cálcio, o que significa que esse composto apresenta melhores resultados em termos de rendimento glicosídico frente à utilização do Hidróxido de Cálcio. Quanto a interação entre os fatores, é possível notar que os mesmos são independentes entre si, sendo o efeito da interação não significativo.

Figura 6 – Gráfico de pareto para as diferentes variáveis do pré-tratamento



Fonte: Próprios autores, 2018.

No que se refere aos inibidores, apresentados na Tabela 10, houve uma maior geração de tais compostos nos testes do planejamento, principalmente nos pontos centrais, novamente referentes apenas ao ácido acético.

A partir dos resultados encontrados, tendo como melhor condição o pré-tratamento sem adição de glicerina e com a utilização do Óxido de Cálcio, realizou-se uma triplicata de ensaios visando a repetição do resultado do ensaio 1 (--) que obteve 0,39 g CT/g biomassa, sendo os valores encontrados apresentados na Tabela 11. Não foi detectada presença de HMF e furfural.

Analisando a Tabela 11, é possível perceber que o melhor resultado obtido no planejamento não foi repetido nos testes seguintes. Assim, comparando a média dos quatro ensaios realizados com Óxido de Cálcio, e seus respectivos intervalos de confiança ($\alpha=0,05$), com os resultados do ensaio 3 do planejamento, realizado com Hidróxido de Cálcio, é possível observar que, estatisticamente, não existe variação significativa entre os dois compostos, já que há sobreposição dos valores. Essa comparação pode ser observada no Figura 7.

O mesmo pode ser concluído se forem comparados o valor médio de rendimento do pré-tratamento utilizando CaO (0,31 g CT/g biomassa), com o valor médio obtido nos ensaios 5 e 6 dos testes preliminares com Ca(OH)₂, que resultaram em 0,34 g CT/g biomassa.

Tabela 10 – Formação de inibidores com a variação dos agentes de pré-tratamento

Ensaio	Glicerina (mL/m)	CaO/Ca(OH) ₂ (m/m)	Ácido acético (g/L)	HMF (g/L)	Furfural (g/L)	IT (g/L)	g IT/g biomassa
1	0,0 (-)	2,4/0,0 (-)	2,80 ± 0,24	ND	ND	2,80 ± 0,24	0,03 ± 0,00
2	2,4 (+)	2,4/0,0 (-)	1,91 ± 0,01	ND	ND	1,91 ± 0,01	0,03 ± 0,00
3	0,0 (-)	0,0/2,4 (+)	2,88 ± 0,42	ND	ND	2,88 ± 0,42	0,05 ± 0,01
4	2,4 (+)	0,0/2,4 (+)	1,53 ± 0,13	ND	ND	1,53 ± 0,13	0,03 ± 0,00
5	1,2 (0)	1,2/1,2 (0)	3,08 ± 0,20	ND	ND	3,08 ± 0,20	0,05 ± 0,00
6	1,2 (0)	1,2/1,2 (0)	3,61 ± 0,25	ND	ND	3,61 ± 0,25	0,06 ± 0,00
7	1,2 (0)	1,2/1,2 (0)	3,35 ± 0,38	ND	ND	3,35 ± 0,38	0,06 ± 0,01

(ND): Não detectado; (HMF): 5-hidroximetilfurfural; (IT): Inibidores totais.

Fonte: Próprios autores, 2018.

Tabela 11 – Rendimento glicosídico para repetição da melhor condição encontrada no planejamento (ensaio 1)

Ensaio	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Celobiose (g/L)	CT (g/L)	g CT/g biomassa	Rendimento (%) *	AA (g/L)	g IT/g biomassa
1	10,95 ± 0,92	5,25 ± 0,81	ND	16,20 ± 1,72	0,27 ± 0,03	41,26 ± 4,38	2,53 ± 0,21	0,04 ± 0,00
2	12,51 ± 1,35	6,55 ± 0,72	ND	19,06 ± 2,07	0,32 ± 0,03	48,54 ± 5,27	2,11 ± 0,33	0,04 ± 0,01
3	10,73 ± 0,37	4,53 ± 0,05	0,57 ± 0,02	15,83 ± 0,36	0,26 ± 0,01	40,30 ± 0,91	3,17 ± 0,26	0,05 ± 0,00

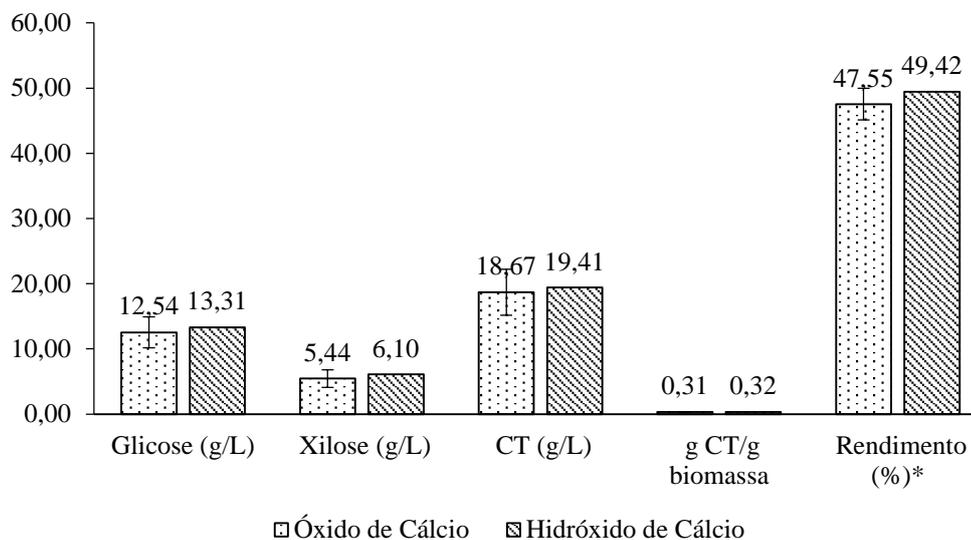
(ND): Não detectado; (CT): Carboidratos totais; (*): Percentual de celulose e hemicelulose convertido; (AA): Ácido acético; (IT): Inibidores totais.

Fonte: Próprios autores, 2018.

Ainda que o melhor resultado do planejamento não tenha se repetido, a média de rendimento dos quatro testes realizados com o Óxido de Cálcio (0,31 g CT/g biomassa) pode ser considerada positiva, assim como o resultado de 0,32 g CT/g biomassa obtido pelo Hidróxido de Cálcio no planejamento experimental, pois estão próximos dos valores encontrados na literatura.

Rabelo (2010), que estudou as etapas de pré-tratamento e hidrólise enzimática utilizando bagaço de cana-de-açúcar, ambos os processos realizados com agitação orbital em shaker, chegou a um valor final de 0,35 g CT/g biomassa, muito próximo ao relatado no presente estudo, frente a nova configuração do sistema.

Figura 7 – Comparação entre os resultados de rendimento glicosídico para os ensaios com utilização de CaO e Ca(OH)₂



(CT): Carboidratos totais; (*): Percentual de celulose e hemicelulose convertido.

Fonte: Próprios autores, 2018.

Bohn et al. (2018) e Bueno et al. (2018), que realizaram trabalhos semelhantes, visando a maximização na obtenção de açúcares fermentescíveis da biomassa residual de milho, utilizando como agente pré-tratante também o Hidróxido de Cálcio e com ensaios realizados em shaker, obtiveram resultados de 0,36 e 0,31 g CT/g biomassa, respectivamente.

Também, vale destacar que o aparato experimental utilizado para realização dos ensaios não foi dimensionado levando em consideração as características do processo, mas adaptado segundo os equipamentos disponíveis.

A escolha dos impelidores, por exemplo, segundo Corrêa (2016), deve levar em conta o tipo de mistura, a capacidade do reator e seu formato, além das propriedades do fluido, principalmente sua viscosidade. O trabalho realizado pelo autor, utilizando bagaço de cana-de-açúcar, com o dimensionamento do tanque de agitação e o estudo de diferentes configurações de impelidores, resultou em um rendimento de 75,7% em açúcares, o que ressalta a influência dessas variáveis.

Além disso, atualmente não é possível converter toda a celulose contida na biomassa vegetal em açúcares fermentescíveis, já que há uma fração dessa celulose que possui índice de cristalinidade muito elevado, o que impede a quebra do polissacarídeo em seus monômeros. Assim, uma alternativa que vêm sendo estudada para a reutilização do resíduo sólido gerado após as etapas de pré-tratamento e hidrólise enzimática, é a produção de nanocristais de celulose (NCCs), que são utilizados principalmente pelas indústrias de embalagens (CAMARGO, 2015).

Nesse novo processo, é realizada uma purificação do resíduo gerado após a hidrólise enzimática, sendo posteriormente feita uma hidrólise ácida, que resulta na extração dos NCCs. Camargo (2015), estudou a utilização do resíduo gerado pelo bagaço da cana-de-açúcar, obtendo um rendimento de 30% na conversão do bagaço residual em NCCs. Dessa forma, essa pode ser mais uma opção para agregação de valor ao etanol lignocelulósico, já que a atual dificuldade no mercado de NCCs está justamente na pouca disponibilidade do material.

4. CONCLUSÕES

Através dos resultados apresentados, foi possível observar que a fração de biomassa residual de milho utilizada no presente trabalho é matéria-prima promissora para produção de bioetanol, apresentando percentual de 65,45% de celulose e hemicelulose.

No planejamento experimental, realizado para definição do melhor composto pré-tratante, concluiu-se que ambos os agentes químicos Hidróxido de Cálcio e Óxido de Cálcio são eficientes na quebra da rigidez estrutural da biomassa, resultando em valores de 0,32 e 0,31 g CT/g biomassa após hidrólise enzimática, respectivamente.

Por fim, também é possível afirmar que a utilização do sistema mecânico de agitação é conveniente aos processos de pré-tratamento e hidrólise enzimática, não resultando em alterações significativas nas estruturas da biomassa e das enzimas, desnaturação dos complexos enzimáticos na etapa de hidrólise ou aceleração dos processos de degradação dos carboidratos, sendo favorável ao avanço das pesquisas relacionadas a produção de etanol lignocelulósico em larga escala.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, Liliane Pires. **Estudo da influência da matéria-prima no processo de produção de etanol a partir de bagaço de cana**. 2014. 98 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP, 2014.

BRAZ, Carlos Eduardo Mendes. **Caracterização de biomassa lignocelulósica para uso em processos térmicos de geração de energia**. 2014. 115 f. Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de Química. Universidade Estadual Paulista. Araraquara – SP, 2014.

BOHN, Leticia Renata et al. Obtenção de açúcares fermentescíveis a partir da biomassa lignocelulósica de milho para produção de bioetanol. **Anais da VIII Jornada de Iniciação Científica e Tecnológica**, Realeza, v. 8, n. 1, set. 2018. Disponível em: <<https://periodicos.uffs.edu.br/index.php/JORNADA>>. Acesso em: 14 nov. 2018.

BUENO, Auriane et al. Hidrólise enzimática da biomassa de milho para obtenção de açúcares fermentescíveis. **Anais da VIII Jornada de Iniciação Científica e Tecnológica**, Realeza, v. 8, n. 1, set. 2018. Disponível em: <<https://periodicos.uffs.edu.br/index.php/JORNADA>>. Acesso em: 14 nov. 2018.

BULLER, Luz Selene; ORTEGA, Enrique. **Agitação e Mistura**. Campinas, 2012. 54 slides, P&B. Disponível em: <http://www.unicamp.br/fea/ortega/aulas/aula14_Agitacao.pdf>. Acesso em: 14 nov. 2018.

CAMARGO, Lais Angelica de. **Obtenção de nanocristais de celulose a partir do resíduo da produção de etanol do bagaço de cana-de-açúcar pela rota enzimática**. 2015. 74 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de São Carlos. São Carlos – SP, 2015.

CARVALHO, Livia Luísa Melo de. **Estudo da hidrólise e fermentação de resíduos de milho (*zea mays*) para produção de etanol de segunda geração**. 2016. 67 f. Dissertação (Mestrado

em Engenharia Química). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de Alagoas. Maceió – AL, 2016.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). **Acompanhamento da safra brasileira: Grãos**. Brasília, v.5 – Safra 2017/18, n. 4 – Quarto levantamento, p. 72-80, jan. 2018.

CORRÊA, Luciano Jacob. **Estudos de melhorias no processo de hidrólise enzimática de biomassas para produção de etanol**. 2016. 131 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos – SP, 2016.

FISATOM Equipamentos Científicos LTDA. Agitadores mecânicos. Disponível em: <<http://www.fisatom.com.br/>>. Acesso em: 18 maio 2018.

JOAQUIM JUNIOR, Celso Fernandes et al. **Agitação e mistura na indústria**. Rio de Janeiro: LTC, 2012.

MARTIN, C. et al. Effect of glycerol pretreatment on component recovery and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. **Cellulose Chemistry and Technology**. [s.l.], v. 45, 487–494, 2011.

MARTINI, Tiago Luis de. **Influência dos impelidores e condições de mistura na produção de insumos químicos para o setor coureiro**. 2010. 39 f. TCC (Graduação em Engenharia Química). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre – RS, 2010.

NOVOZYMES. **Cellic® CTec2 and HTec2 - Enzymes for hydrolysis of lignocellulosic materials**. 2010. Disponível em: <<http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/engineering/chair/chem010/manual/Ctec2.pdf>>. Acesso em: 15 nov. 2018.

RABELO, Sarita Cândida. **Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração**. 2010. 447 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP, 2010.

REIS, Ciro Marques. **Diversificação da Matriz Energética Brasileira: Caminho para a Segurança Energética em Bases Sustentáveis**. Rio de Janeiro: CEBRI, 2015.

RODRIGUES, Cristine et al. Materiais lignocelulósicos como matéria-prima para a obtenção de biomoléculas de valor comercial. **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria - Vol. 4**. p. 283 -314. São Paulo: Blucher, 2017.

SCHIMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**. Vol. 2. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2001.

SILVA, Jefferson Luiz Grangeiro da. **Análise crítica das correlações e parâmetros em sistemas de agitação**. 2002. 193 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP, 2002.

SINGHABHANDHU, Ampaitopin; TEZUKA, Tetsuo. A perspective on incorporation of glycerin purification process in biodiesel plants using waste cooking oil as feedstock. **Energy**, [s.l.], v. 35, n. 6, p.2493-2504, jun. 2010.

SPOGIS, Nicolas. **Metodologia para determinação de curvas de potência e fluxos característicos para impelidores axiais, radiais e tangenciais utilizando a fluidodinâmica computacional**. 2002. 189 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP, 2002.

ZHANG, Hongdan et al. Enhanced enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse with ferric chloride pretreatment and surfactant. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 229, p.96-103, abr. 2017.