

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CURSO DE ENGENHARIA AMBIENTAL E SANITÁRIA
CAMPUS CHAPECÓ

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO CAPIM-
ELEFANTE (*Pennisetum purpureum*) PARA OBTENÇÃO DE AÇÚCARES
FERMENTESCÍVEIS**

ALUNO: LUCAS PONSONI DE QUADROS

ORIENTADOR: PROF. DR. GUILHERME MARTINEZ MIBIELLI

Outubro - 2021

LUCAS PONSONI DE QUADROS

**PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA
DO CAPIM-ELEFANTE (*Pennisetum purpureum*) PARA
OBTENÇÃO DE AÇÚCARES FERMENTECÍVEIS**

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. Guilherme Martinez Mibielli**

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em: 18/10/2021

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Guilherme Martinez Mibielli - UFFS



Prof. Dr. João Paulo Bender - UFFS



Profa. Dra. Rosilea Garcia França - UFFS

PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO CAPIM-ELEFANTE (*Pennisetum purpureum*) PARA OBTENÇÃO DE AÇÚCARES FERMENTESCÍVEIS

Lucas Ponsoni de Quadros¹ e Guilherme M. Mibielli²

RESUMO

O esgotamento progressivo das reservas de combustíveis fósseis e a necessidade de proteção do meio ambiente demonstram a necessidade de uma mudança do cenário energético atual. Embora o Brasil seja o segundo maior produtor de etanol, ainda é necessário diversificar a matriz de produção, aumentando a parcela de combustíveis. O etanol de segunda geração é um processo considerado ainda novo, que produz significativas quantidades de açúcares redutores a partir das biomassas lignocelulósicas, e destaca-se por possibilitar a elevação da produção de bioetanol das usinas já instaladas, sem que haja aumento de áreas cultivadas, bem como promove o aproveitamento de resíduos agrícolas, grãos cereais e pastagens. Portanto, observa-se a necessidade de estudos com diferentes matérias-primas, principalmente biomassas de baixo custo, que apresentem grande disponibilidade e potencial de produção, como por exemplo, o capim-elefante (*Pennisetum purpureum*). Por outro lado, o processo da produção de bioetanol de segunda geração não pode ser agressivo ao meio ambiente e, por isso, deve-se buscar reduzir os agentes químicos utilizados, como por exemplo, o Hidróxido de Sódio (NaOH). Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi de estudar a melhor condição experimental para obtenção de açúcares fermentescíveis, visando a redução do agente químico. Para tanto, estudou-se diferentes condições dos parâmetros de processo do pré-tratamento químico alcalino, bem como do pré-tratamento físico. Assim, no presente trabalho verificou-se pelo teste de *Tukey* com 95% de confiança, que a concentração do agente químico NaOH utilizado pelo grupo de pesquisa em processos enzimáticos e microbiológicos (GPPEN) da Universidade Federal da Fronteira Sul (*Campus* Chapecó) pode ser reduzido de 0,20 para 0,15 g/g biomassa, obtendo-se os mesmos resultados. Não há necessidade de aumentar a pressão da autoclave de 1,1 para 1,3 bar, mas é necessário aumentar o tempo deste equipamento (de 0,5 para 1 hora) e o tempo de incubação (de 24 para 48 horas) ao reduzir a quantidade do agente químico NaOH

¹ Acadêmico do curso de graduação em Engenharia Ambiental e Sanitária da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS Chapecó. Endereço eletrônico: lucas_ponsoni7@hotmail.com.

² Professor Adjunto do Curso de Engenharia Ambiental e Sanitária da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS Chapecó.

em 25%.

Palavras-Chave: Biomassa lignocelulósica. Bioetanol. Agente químico. Pré-tratamento.

ABSTRACT

The progressive depletion of fossil reserves and the need to protect the environment demonstrate the need for a change in the current energy scenario. Although Brazil is the second largest producer of ethanol, it is still necessary to diversify the production matrix, expanding the portion of the parcel. Second-generation ethanol is still considered a new process, which produces quantities of reducing sugars from lignocellulosic biomass, and stands out for allowing the increase of bioethanol production in already installed plants, without an increase in cultivated areas, as well as how it promotes the use of agricultural residues, cereal grains and pastures. Therefore, there is a need for studies with different raw materials, especially low-cost biomass, which have great availability and production potential, such as elephant grass (*Pennisetum purpureum*). On the other hand, the second generation bioethanol production process cannot be aggressive to the environment and, therefore, it is necessary to reduce the chemical agents used, such as Sodium Hydroxide (NaOH). In this context, the objective of this work was to study the best experimental condition for obtaining fermentable sugars, reduction and reduction of the chemical agent. Therefore, different conditions of the process parameters of the alkaline chemical pretreatment were studied, as well as the physical pretreatment. Thus, in the present work it was verified by Tukey test with 95% confidence, that the concentration of the chemical agent NaOH used by the research group in enzymatic and microbiological processes (GPPEN) of the Federal University of Fronteira Sul (Campus Chapecó) can be reduced from 0,20 to 0,15 g / g biomass, obtaining the same results. There is no need to increase the autoclave pressure from 1,1 to 1,3 bar, but it is necessary to increase the time of this equipment (from 0,5 to 1 hour) and the incubation time (from 24 to 48 hours) when reducing the amount of chemical agent NaOH by 25%.

Keywords: Lignocellulosic biomass. Bioethanol. Chemical agent. Pre-treatment.

1 INTRODUÇÃO

Tendo em vista o esgotamento progressivo das reservas de combustíveis fósseis, os riscos ambientais ocasionados pela sua combustão incompleta e a necessidade de proteção do meio ambiente, cada vez mais se tem buscado utilizar biomassas fotossintéticas para a produção de combustíveis renováveis (FIGUEIREDO *et al.*, 2018). Assim, a produção de biocombustíveis como biodiesel e o bioetanol são meios alternativos com grande potencial para a substituição dos derivados do petróleo.

Os biocombustíveis, mais especificamente bioetanol, pode ser obtido por meio de qualquer biomassa que possua grandes quantidades de açúcares, amido ou celulose em sua composição. No Brasil, utiliza-se como matéria-prima principal para a produção do bioetanol os sacarídeos advindos do caldo da cana-de-açúcar, enquanto que nos Estados Unidos a biomassa mais utilizada é a proveniente do milho. Esses dois países são considerados os maiores produtores mundiais de bioetanol, de modo que correspondem a 84% da produção global (SANTOS, 2012; RFA, 2020).

Muito embora o Brasil seja um dos maiores produtores de etanol, ainda há a necessidade de promover a diversificação da matriz energética de produção para viabilizar a substituição dos combustíveis fósseis. Dessa forma, destaca-se o etanol de segunda geração, que é produzido a partir de biomassas lignocelulósicas com significativas quantidades de monômeros, como glicose e xilose, obtidos de polissacarídeos da composição da biomassa (FLORENCIO; BADINO; FARINAS, 2017).

A utilização do bagaço da cana-de-açúcar (biomassa lignocelulósica) permite, por exemplo, elevar a produção de bioetanol das usinas já instaladas, sem que haja necessidade do aumento da área cultivada. Além disso, o surgimento de usinas que operem com fontes de matérias-primas lignocelulósicas alternativas contribui para gerar uma maior produção desse biocombustível no país (FLORENCIO; BADINO; FARINAS, 2017). Dentre as matérias-primas possíveis, destacam-se os resíduos agrícolas e a biomassa de grãos cereais e pastagens, sendo que o capim-elefante vem se sobressaindo devido às suas características, ao baixo custo de produção e ao fato de não concorrer com a produção de alimentos quando comparado com matérias-primas, como a soja, o milho e a cana-de-açúcar (IYE; BILSBORROW, 2013; MORO, 2015; GRASEL *et al.*, 2017).

Introduzido no Brasil em 1920, o capim-elefante, também conhecido como *Napier*, é uma gramínea perene de origem africana, que foi disseminada nos países tropicais e subtropicais a fim de ser utilizado como pastagem, silagem e feno para o gado leiteiro

(GRASEL *et al.*, 2017; PASSOS, 1999, apud CAMPOS, 2015). Devido à elevada produtividade, a matéria-prima proveniente do capim-elefante tem despertado o interesse de inúmeros setores, dentre eles, o de biocombustíveis (CAMPOS, 2015).

A partir do cultivo do capim-elefante, é possível obter em apenas um ano, 45 toneladas de biomassa seca por hectare plantado, enquanto que o bagaço de cana-de-açúcar renderia cerca de 12 toneladas (GRASEL *et al.*, 2017). Além disso, a biomassa lignocelulósica de capim-elefante dispõe de altos teores de polissacarídeos, como celulose (50,5%) e hemicelulose (22,1%), a partir dos quais são produzidas glicose e xilose (monômeros), que são açúcares gerados do processo de hidrólise e, após, transformam-se em etanol por meio de processos fermentativos. Portanto, além de ser uma biomassa utilizada de diversas formas no meio rural, possui grande capacidade para a produção de etanol de segunda geração (LOPES *et al.*, 2019).

Todavia, esses polissacarídeos encontram-se intimamente associados à lignina, dificultando a ação hidrolítica devido a rigidez que este componente confere à parede das células. Outrossim, a biomassa lignocelulósica necessita passar por um processo de pré-tratamento físico e/ou químico para aumentar a porosidade do material, a fim de tornar a celulose e hemicelulose passível à hidrólise. Logo, o pré-tratamento é a etapa que apresenta maior potencial para melhorar a eficiência do sistema, uma vez que o rendimento em termos de açúcares está extremamente relacionado com a sua eficácia (SANTOS, 2014).

De acordo com FRASINELLI *et al.* (2015), os pré-tratamentos alcalinos apresentam vantagens, como a promoção de uma menor degradação de açúcares e formação de derivados do furano, além de permitirem a eliminação de parte da lignina da biomassa, o que melhora a reatividade dos polissacarídeos remanescentes e a eliminação de grupos acetila e outros substituintes em hemicelulose. O hidróxido de sódio (NaOH), por exemplo, vem se destacando para o uso em pré-tratamentos, porém, em escala industrial é importante que essa etapa seja, além de eficaz, simples e com baixo consumo de insumos e energia (RABELO, 2010; FRASINELLI *et al.*, 2015).

O agente químico NaOH, em contato com a água ou o solo, gera elevação do pH e pode provocar liberação de sais metálicos, descaracterizando o local e degradando o meio ambiente, com prejuízos à fauna, sendo extremamente tóxico, por exemplo, para organismos aquáticos. Assim, destaca-se a importância de estudos que visem a redução da concentração desse agente químico durante o processo de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica em escala industrial (CARBOCLORO, 2011; PROJESAN, 2021).

Dessa forma, é importante buscar a minimização dos riscos ao meio ambiente, sejam aqueles causados por possíveis contaminações em decorrência de vazamentos acidentais

durante o armazenamento ou, ainda, aqueles que ocorrem durante o manuseio do composto químico. O descarte dos resíduos contaminados também pode ser beneficiado com a redução da concentração do agente químico NaOH, pois contribui positivamente para redução de substâncias neutralizantes, que também causam riscos ao meio ambiente, quando utilizadas para tratar esses materiais antes do descarte ambientalmente adequado.

Considerando-se a importância em encontrar novas matérias-primas que possam diversificar a matriz energética e elevar a produção de bioetanol, de modo a atender a demanda mundial desse biocombustível e reduzir a dependência dos combustíveis fósseis, o capim-elefante surge como uma alternativa com grande potencial. Assim, o estudo foi conduzido com o objetivo de buscar maximizar as concentrações de açúcares fermentescíveis reduzindo a quantidade de agente químico NaOH empregado durante a etapa de pré-tratamento químico. Para isso, foi necessário avaliar as condições de processo das etapas de pré-tratamento físico e químico, variando-se as concentrações do agente químico e o tempo das etapas supracitadas.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATERIAIS

Biomassa

A biomassa empregada neste estudo (capim-elefante) é proveniente das áreas experimentais da Universidade Federal da Fronteira Sul - *Campus* Chapecó. Ela já havia sido preparada pelo grupo de pesquisa (GPPEN), ou seja, seca em estufa a 50 °C, triturada em moinho de facas e submetida ao processo de peneiramento, conforme procedimento padrão NREL “Determination of Total Solids in Biomass” (HAMES *et al.*, 2005), e encontrava-se armazenada no Laboratório de Resíduos. Dessa forma, o material utilizado para o estudo corresponde a biomassa, que estava armazenada em bolsas hermeticamente fechadas e passou pela peneira de 30 *mesh*, ou seja, com diâmetro inferior a 0,6 mm.

Enzimas

As preparações enzimáticas comerciais empregadas neste trabalho foram a Cellic CTec2 (complexo de celulasas) e NS22244 - Cellic HTec2 - (complexo de hemicelulasas), ambas provenientes da Novozymes A/S (Bagsvaerd, Dinamarca) e fornecidas pela Novozymes Latin America (Araucária, PR, Brasil).

2.2 MÉTODOS

Para a execução do estudo, seguiu-se a metodologia descrita por Dresch, Bender e Mibielli (2020), buscando-se utilizar as melhores condições experimentais obtidas no trabalho dos autores. No entanto, avaliou-se diferentes condições das variáveis de processo do pré-tratamento físico e químico, visando obter a maior concentração de açúcares fermentescíveis e a redução da concentração do agente químico possivelmente poluidor, o NaOH.

2.2.1 Pré-tratamento padrão

Aplicou-se um pré-tratamento básico utilizando o agente químico Hidróxido de Sódio (NaOH) e avaliou-se duas concentrações diferentes, 0,10 e 0,15 g/g biomassa. Para estudar essa etapa, realizou-se a análise estatística com auxílio do *software* Protimiza Experimental Design. Para tanto, elaborou-se dois planejamentos experimentais DCC (Delineamento Composto Central), com dois fatores investigados 2^2 , sem ponto central e com triplicata em todos os ensaios, com objetivo de avaliar os efeitos do tempo de autoclave (pré-tratamento físico) e tempo de incubação (pré-tratamento químico). Os níveis investigados para cada variável são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Planejamento experimental para a investigação das variáveis de processo “tempo de autoclave” e “tempo de incubação” para a etapa de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, utilizando as concentrações de 0,10 e 0,15 g NaOH/g biomassa.

Variáveis	Níveis	
	-1	1
Tempo Autoclave (h)	0,5	1
Tempo Incubação (h)	24	48

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para a execução dos ensaios, utilizou-se como biorreatores frascos de vidro tipo paralelepípedo retangular com tampa. Neles foram adicionadas 10 g de biomassa lignocelulósica e tratadas com uma solução de 0,10 g de agente químico/g de biomassa diluído em 100 mL água destilada, resultando em uma razão sólido/líquido de 100 g biomassa/L solução. Após serem homogeneizados, os frascos tratados com hidróxido de sódio foram levados à autoclave - para a realização da explosão à vapor (pré-tratamento físico) - a uma

temperatura de 121 °C e uma pressão de 1,1 bar, durante os tempos estabelecidos na Tabela 1.

Findado o tempo das amostras em autoclave, todos os ensaios foram levados à Incubadora modelo Shaker SL - 223 da marca SOLAB, para a realização do pré-tratamento químico, a uma temperatura de 70 °C, 200 rpm, variando apenas o período de tempo de incubação, conforme definido no planejamento. O mesmo procedimento descrito acima também foi realizado para os ensaios com soluções com concentrações de 0,15 g de NaOH/ g biomassa.

2.2.2 Pré-tratamento com aumento de pressão

Com o intuito de buscar melhores resultados de açúcares totais, comparando com os obtidos pelo GPPEN (0,30 g AT/ g biomassa, 0,20 g NaOH/g biomassa e condições padrão de pré-tratamento), realizou-se dois experimentos aumentando a pressão da autoclave de 1,1 bar para 1,3 bar, com concentrações de NaOH de 0,15 e 0,20 g/g biomassa. Na Tabela 2 visualiza-se as condições utilizadas nestes dois ensaios, onde os mesmos foram realizados em triplicata. A execução dos ensaios foram efetuadas seguindo os procedimentos experimentais detalhados no item 2.2.1.

Tabela 2 - Condições experimentais do pré-tratamento com aumento de pressão.

Ensaio	[] NaOH (g/g biomassa)	P Autoclave (bar)	T Autoclave (h)	T Incubação (h)
9	0,15	1,3	0,5	24
10	0,20	1,3	0,5	24

Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: []: concentração do agente químico; P: pressão; T: tempo.

2.2.3 Hidrólise enzimática

Concluída a etapa de pré-tratamento, corrigiu-se o pH do meio tratado utilizando uma solução de Ácido Cítrico (1M), até atingir a faixa de pH ótimo das enzimas, entre 5,0 a 5,5. Posteriormente, adicionou-se as preparações enzimática Cellic CTec2 e HTec2 nas proporções de 2% e 0,5% mL/g biomassa, respectivamente. Devida à alta viscosidade das enzimas, ambas preparações foram diluídas (relação 1:10 v/v) em tampão de acetato (0,05 M) antes do complexo ser inserido nos recipientes experimentais. Por fim, os mesmos foram novamente adicionados

na incubadora SHAKER SL - 223 a 50 °C e 200 rpm, por 24 horas.

Ao fim da hidrólise enzimática, adicionou-se uma alíquota de cada frasco em tubos Falcon de 50 mL e foram centrifugadas a 6000 rpm por 6 minutos e filtradas em vials, utilizando filtros de *nylon* não estéril com poros de 0,45 µm (Milipore) e PVDF não estéreis de 0,22 µm, para leitura dos açúcares, acetato, furfural e hidroximetilfurfural em HPLC (carboidratos e inibidores), conforme metodologia expressa nos itens 2.3.2 e 2.3.3.

2.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

2.3.1 *Quantificação dos açúcares redutores totais (ART)*

Executou-se a quantificação dos açúcares redutores totais pelo método de Colorimetria (DNS) descrita por Miller (1959). Para tanto, as amostras foram diluídas com água destilada nas proporções 1:30 e 1:40 e adicionadas 0,5 mL de cada amostra em tubos de ensaio, juntamente com mais 0,5 mL de uma solução pronta de DNS. Na sequência, ferveu-se os tubos por 5 minutos a 100°C e, em seguida, submergiu-os em banho de gelo durante 5 minutos para cessar a reação. Após, adicionou-se 8 mL da solução de tartarato de sódio e potássio (15,1 g/L) para a fixação da cor e, por fim, realizou-se a leitura em espectrofotometria a 580 nm.

O objetivo de realizar a análise dos açúcares pelo método DNS, antes da realização pelo método de HPLC, foi para se ter uma ideia dos resultados obtidos a fim de que fosse possível dar sequência às próximas etapas dos estudos, haja vista que tal método fornece resultados mais rápidos. Contudo, os dados apresentados neste trabalho serão todos a partir dos obtidos em HPLC.

2.3.2 *Determinação de açúcares e o ácido acético*

Realizou-se a análise dos açúcares totais e o ácido acético por HPLC (LC-MS 2020 da marca SHIMADZU). Para tanto, utilizou-se a coluna Aminex HPX-87H para quantificação de glicose, xilose, celobiose e ácido acético com o detector RID-10A. As concentrações de cada componente foram determinadas com o auxílio das curvas de calibração, obtidas inicialmente com padrões analíticos.

Teve-se como condições de análise o volume de injeção de 10 µL, utilizando como fase móvel uma solução aquosa com ácido sulfúrico (5 mM) na taxa de fluxo de 0,6 mL/minuto, com temperatura do forno de 50 °C e temperatura do detector de 40 °C em 25 minutos de execução.

2.3.3 *Determinação de Furfural e Hidroximetilfurfural:*

Utilizou-se o sistema de HPLC (LC-MS 2020 da marca SHIMADZU) equipado com a coluna NST-18 e o detector SPD-M20A. As concentrações de cada componente foram determinadas com o auxílio das curvas de calibração, obtidas inicialmente com padrões analíticos.

As condições de análise foram de 20 μ L para o volume de injeção, utilizando como fase móvel uma solução de água ultrapura com acetonitrila na relação de (85:15 v/v) acidificada com ácido acético (1% v/v). Aplicou-se uma taxa de fluxo de 0,8 mL/minuto na temperatura do forno e do detector- SPD - M20A (Diodo Array Detector)/Shimadzu de 40 °C, em 15 minutos de execução.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 PRÉ-TRATAMENTO

O pré-tratamento é essencial para a bioconversão dos materiais lignocelulósicos, uma vez que tais materiais apresentam várias barreiras físicas e químicas rígidas que acabam inibindo o processo de hidrólise, o que gera processos lentos de conversão. Sendo assim, faz-se necessário a execução de um pré-tratamento da biomassa para modificar a estrutura lignocelulósica, a fim de aumentar a exposição das fibras de celulose e hemicelulose tornando-as acessíveis à atividade química das enzimas, que resultando em maior rendimento de açúcares fermentescíveis (TOSCAN, 2013; FERREIRA, 2016).

3.1.1 Pré-tratamento com hidróxido de sódio 10%

Para avaliar as condições de pré-tratamento da biomassa utilizando uma concentração de 0,10 g/g biomassa do agente químico NaOH, realizou-se um planejamento experimental conforme descrito no item 2.2.1. Na Tabela 3 podem ser consultados os resultados obtidos em termos de AT (HPLC).

Tabela 3 - Rendimento glicosídico do resíduo lignocelulósico do campim-elefante após os processos de pré-tratamento e hidrólise enzimática (concentração de 10% de agente químico).

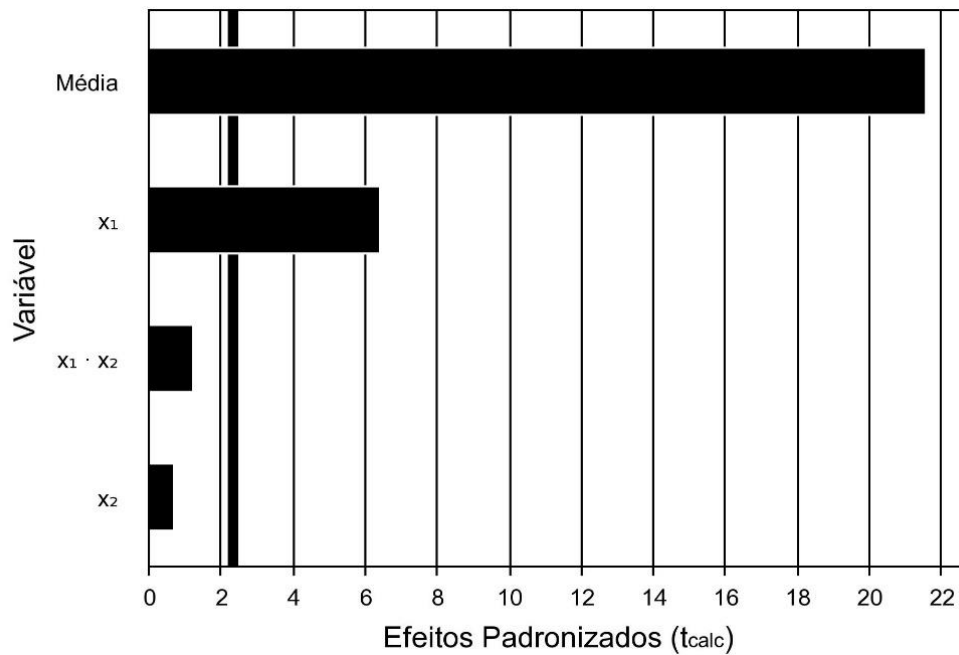
Ensaio	T autoclave (h)	T incubação (h)	g AT / g biomassa
1	(-) 0,5	(-) 24	0,14 ± 0,05
2	(+) 1	(-) 24	0,23 ± 0,02
3	(-) 0,5	(+) 48	0,13 ± 0,02
4	(+) 1	(+) 48	0,26 ± 0,01

Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: (T): tempo; (AT): açúcares totais (glicose, xilose e celobiose);

Como pode ser observado na Tabela 3, os melhores resultados em termos de açúcares totais foram para o ensaio 4, em que as amostras permaneceram na autoclave por um tempo de 1 hora, e na incubadora Shaker por 48 horas (valores referentes aos níveis superiores do planejamento), gerando os resultados 0,26 g AT/g biomassa. Pelo gráfico de Pareto (Figura 1), nota-se que a diferença entre as condições de pré-tratamento estão relacionadas apenas com o efeito do tempo de autoclave (x_1), ou seja, apenas esta variável foi significativa no processo (p -valor < 0,05).

Figura 1 - Gráfico de Pareto para os açúcares totais com os efeitos padronizados segundo o DCC para os experimentos com a concentração de 10% do agente químico NaOH.



Fonte: Elaborada pelo autor.

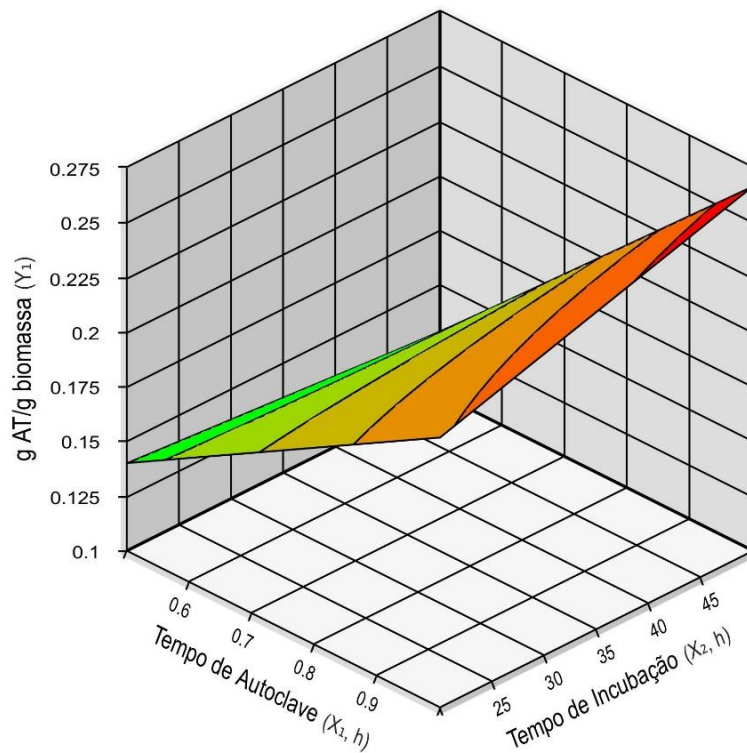
Legenda: Média: AT (g/g biomassa); x₁: Tempo de autoclave; x₂: Tempo de incubação; x₁.x₂: Interação entre o tempo de autoclave e tempo de incubação.

Os resultados apresentados na Tabela 3 para os açúcares totais foram submetidos à análise de variância (ANOVA), a qual validou o modelo matemático codificado de primeira ordem a 95% de confiança, Equação (1). O coeficiente de correlação obtido foi de $R^2 = 0,8427$ e o $F_{\text{calculado}}$ foi de 14,29, quase quatro vezes maior que F_{tabelado} , possibilitando a obtenção dos gráficos de contorno e de superfície de resposta com as variáveis investigadas (Figura 2 e 3).

$$g \text{ AT/g biomassa} = 0,19 + 0,06 x_1 + 0,01 x_2 + 0,01 x_1 x_2 \quad (2)$$

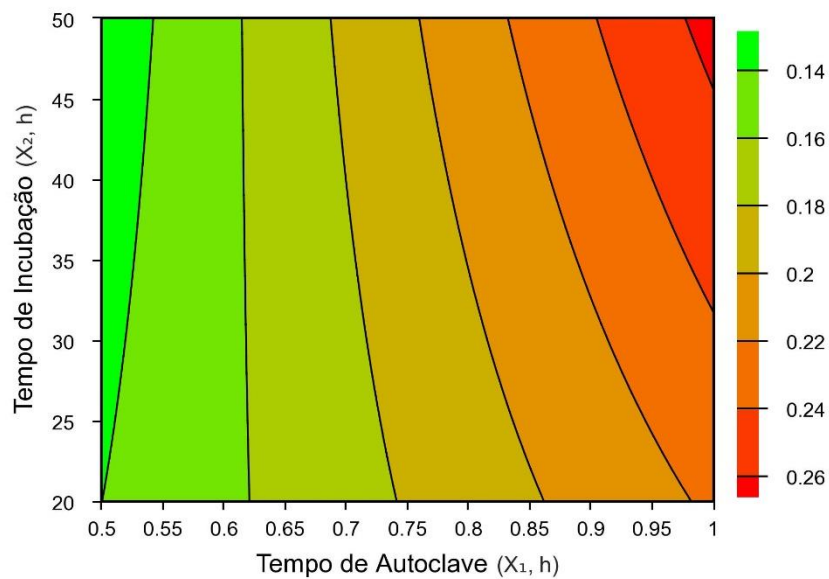
Onde: AT = açúcares totais (g/g biomassa); x₁ = tempo de autoclave (h); x₂ = tempo de incubação (h).

Figura 2 - Gráfico de superfície 3D para os açúcares totais em função tempo de autoclave e tempo de incubação (concentração de 10% de agente químico).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 3 - Gráfico de contorno para os açúcares totais em função tempo de autoclave e tempo de incubação (concentração de 10% de agente químico).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Nas Figuras 2 e 3 são apresentados os gráficos de contorno e de superfície de resposta para as variáveis tempo de autoclave e tempo de incubação utilizando 0,10 g/g biomassa do agente químico NaOH, onde observa-se que as maiores quantidades de produção de açúcares fermentescíveis são alcançados quando o processo ocorre com um tempo de autoclave de 1 hora e 48 horas de incubação, chegando na faixa de 0,26 g AT/g biomassa.

Percebe-se que, apesar de o tempo de incubação (x_2) não ser significativo pelo gráfico de Pareto, ao avaliar os gráficos das Figuras 2 e 3, bem como os resultados dos ensaios 2 e 4 (Tabela 3), verifica-se que existe uma tendência de se obter uma maior quantidade de açúcares fermentescíveis para o maior tempo dessa variável (48 horas), haja vista a que na condição de 24 horas de incubação proporciona uma produção inferior de açúcares totais, na faixa de 0,22 a 0,24 g AT/g biomassa.

Sob o ponto de vista dos gastos energéticos, a condição do ensaio 2 possivelmente é uma boa opção, porém, este trabalho não visou a redução de tais gastos na produção, mas sim a maximização do rendimento de açúcares fermentescíveis utilizando a menor concentração do agente químico poluidor NaOH. Por essa razão, avaliou-se que as condições de processo do ensaio 4 foram melhores.

No que se refere aos componentes inibitórios, eles podem se originar da própria composição da biomassa durante as etapas de pré-tratamento ou hidrólise, ou podem ser produzidos por condições extremas de temperatura e pressão durante o processo, liberando substâncias como ácido acético (durante a hidrólise do polissacarídeo hemicelulose), bem como furfural e hidroximetilfurfural (TOSCAN, 2013). Na Tabela 4 são apresentados os produtos inibidores gerados para cada condição experimental do planejamento.

Tabela 4 - Inibidores gerados durante o processo de pré-tratamento e hidrólise enzimática (concentração de 10% de agente químico).

Ensaio	T autoclave (h)	T incubação (h)	AA (g/L)	F (g/L)	IT (g/L)	g IT/g biomassa
1	(-) 0,5	(-) 24	1,97 ± 0,61	0,01 ± 0,00	1,98 ± 0,61	0,02
2	(+) 1	(-) 24	2,72 ± 0,11	0,01 ± 0,00	2,73 ± 0,11	0,03
3	(-) 0,5	(+) 48	1,78 ± 0,20	0,01 ± 0,00	1,79 ± 0,31	0,02
4	(+) 1	(+) 48	2,90 ± 0,06	0,01 ± 0,00	2,92 ± 0,06	0,03

Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: (T): tempo; (AA): ácido acético; (F): furfural; (IT): inibidores totais.

De acordo com os resultados da Tabela 4, apesar de o ensaio 4 apresentar alto rendimento glicosídico, gerou uma maior quantidade de Inibidores Totais (2,90 g/L), formado a partir do ácido acético e uma baixa quantidade do composto Furfural. Contudo, esse valor mais expressivo de ácido acético é um indicativo de que o processo de pré-tratamento e hidrólise enzimática foi efetivo, haja vista que é gerado pela quebra da estrutura da hemicelulose.

Segundo Bellissimi *et al.* (2009), o ácido acético é tóxico devido a sua capacidade de penetração no citoplasma da levedura, o que causa acidificação intra-celular, e afeta o sistema motriz de transporte na célula e, por consequência, prejudica o processo fermentativo para obtenção do bioetanol. Contudo, segundo o autor, os efeitos negativos do ácido acético é observado apenas quando a concentração dessa substância ultrapassa 3,0 g/L, logo, não haverá problemas para as condições de processo do ensaio 4.

3.1.2 Pré-tratamento com hidróxido de sódio 15%

Conforme a discussão dos resultados anteriores, avaliou-se as condições de pré-tratamento da biomassa utilizando-se, agora, uma concentração de 0,15 g/g biomassa do agente químico NaOH. Realizou-se um planejamento experimental, conforme descrito no item 2.2.1. Na Tabela 5 podem ser verificados os resultados obtidos em termos de AT (HPLC).

Tabela 5 - Rendimento glicosídico do resíduo lignocelulósico do campim-elefante após os processos de pré-tratamento e hidrólise enzimática (concentração de 15% de agente químico).

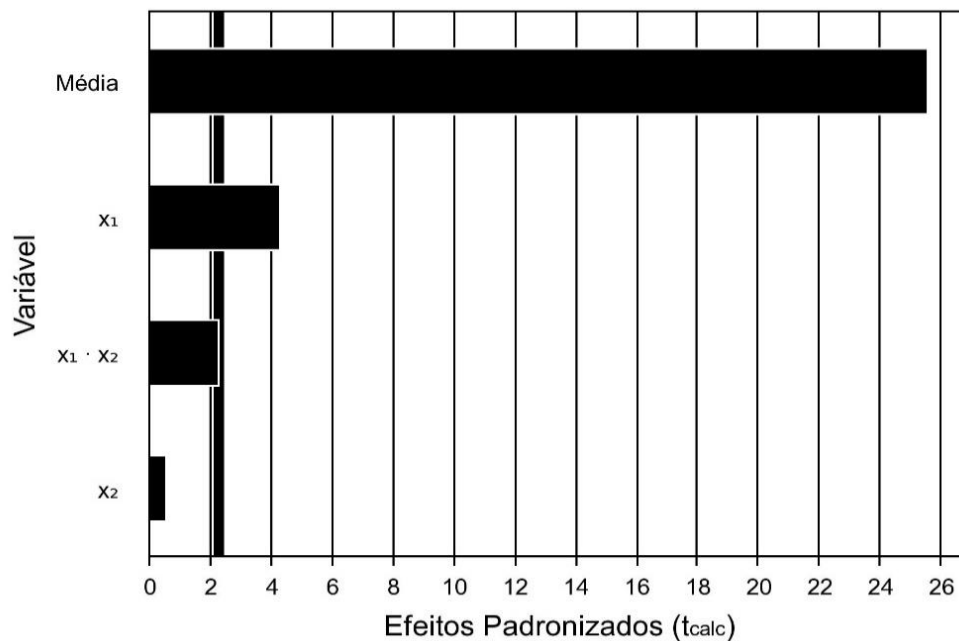
Ensaio	T autoclave (h)	T incubação (h)	g AT / g biomassa
5	(-) 0,5	(-) 24	0,22 ± 0,06
6	(+) 1	(-) 24	0,25 ± 0,01
7	(-) 0,5	(+) 48	0,17 ± 0,02
8	(+) 1	(+) 48	0,28 ± 0,01

Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: (T): tempo; (AT): açúcares totais (glicose, xilose e celobiose).

Analisando os resultados da Tabela 5, observa-se que os melhores resultados em termos de açúcares totais - pelo método de análise por HPLC - também foram para o ensaio 8, em que as amostras permaneceram na autoclave por um tempo de 1 hora e na incubadora Shaker por 48 horas (valores referentes aos níveis superiores do planejamento), gerando os resultados de 0,28 g AT/g biomassa. Pelo gráfico de Pareto (Figura 4), também nota-se que a diferença entre as condições de pré-tratamento estão relacionadas apenas com o efeito do tempo de autoclave (x_1), ou seja, apenas esta variável foi significativa no processo (p -valor $< 0,05$).

Figura 4 - Gráfico de Pareto para os açúcares totais com os efeitos padronizados segundo o DCC para os experimentos com a concentração de 15 % do agente químico NaOH.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Média: AT (g/g biomassa); x_1 : tempo de autoclave; x_2 : tempo de incubação; $x_1 \cdot x_2$: interação entre o tempo de autoclave e tempo de incubação.

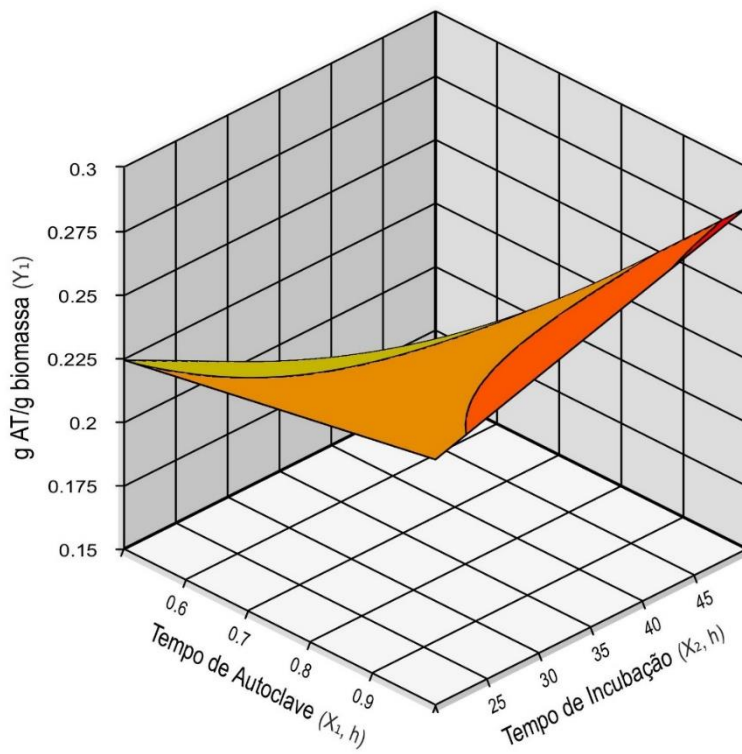
Os resultados apresentados na Tabela 5 para os açúcares totais também foram submetidos à análise de variância (ANOVA), a qual validou o modelo matemático codificado de primeira ordem a 95% de confiança, Equação (2). O coeficiente de correlação obtido foi de $R^2 = 0,7462$ e o $F_{calculado}$ foi de 7,84, quase duas vezes maior que $F_{tabelado}$, possibilitando a obtenção de uma superfície de resposta com as variáveis investigadas (Figura 5 e 6).

$$\text{g AT/g biomassa} = 0,23 + 0,04 x_1 - 0,01 x_2 + 0,02 x_1 x_2 \quad (2)$$

Onde: AT = açúcares totais (g/g biomassa); x_1 = tempo de autoclave (h); x_2 = tempo de

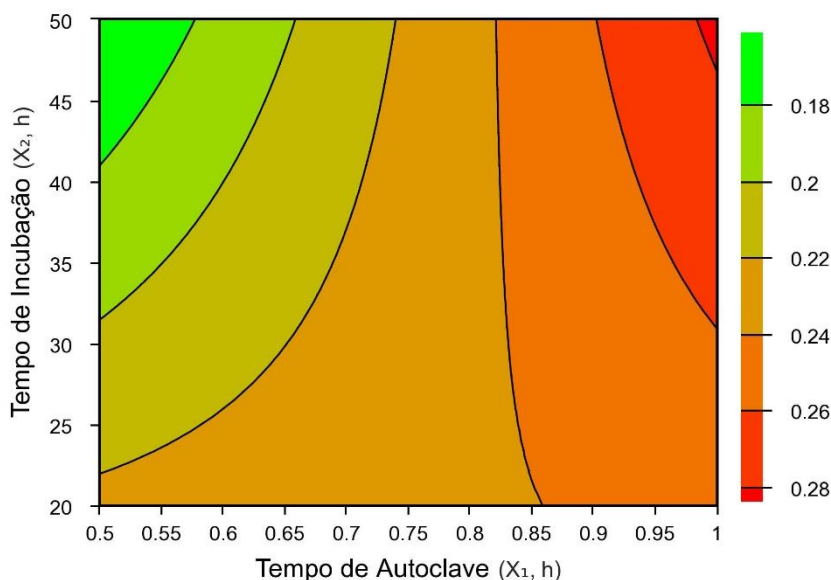
incubação (h).

Figura 5 - Gráfico de superfície 3D para os açúcares totais em função tempo de autoclave e tempo de incubação (concentração de 15% de agente químico).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 6 - Gráfico de contorno para os açúcares totais em função tempo de autoclave e tempo de incubação (concentração de 15% de agente químico).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Nos gráficos de contorno e superfície de resposta, para as variáveis tempo de autoclave e tempo de incubação, utilizando 0,15 g/g biomassa do agente químico NaOH (Figura 5 e 6), também visualiza-se que as maiores quantidades de produção de açúcares fermentescíveis são alcançadas quando o processo ocorre em um tempo de autoclave de 1 hora e 48 horas de incubação, chegando na faixa de 0,28 g AT/g biomassa.

Percebe-se, ademais, que apesar de o tempo de incubação (x_2) não ser significativo pelo gráfico de Pareto, ao avaliar os gráficos das Figuras 5 e 6, bem como os ensaios que sofrem influência do tempo de autoclave (6 e 8), também verifica-se que existe uma tendência de se obter uma maior quantidade de açúcares fermentescíveis para o maior tempo dessa variável (48 horas), haja vista que na condição de 24 horas de incubação há uma produção inferior de açúcares totais, na faixa de 0,24 a 0,26 g AT/g biomassa. Pensando nos gastos energéticos, talvez a melhor condição seria a do ensaio 6, porém pelos mesmos motivos citados no item 3.1.1, avaliou-se que as condições de processo do ensaio 8 foram melhores.

No que se refere aos componentes inibitórios, na Tabela 6 são apresentados os produtos gerados para cada condição experimental do planejamento.

Tabela 6 - Inibidores gerados durante o processo de pré-tratamento e hidrólise enzimática (concentração de 15% de agente químico).

Ensaio	T autoclave (h)	T incubação (h)	AA (g/L)	F (g/L)	IT (g/L)	g IT/g biomassa
5	(-) 0,5	(-) 24	2,35 ± 0,61	0,01 ± 0,00	2,36 ± 0,61	0,03
6	(+) 1	(-) 24	2,54 ± 0,18	0,01 ± 0,00	2,55 ± 0,18	0,03
7	(-) 0,5	(+) 48	1,79 ± 0,30	0,01 ± 0,00	1,80 ± 0,31	0,02
8	(+) 1	(+) 48	2,84 ± 0,11	0,01 ± 0,00	2,84 ± 0,11	0,03

Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: (T): tempo (AA): ácido acético; (F): furfural; (IT): inibidores totais;

De acordo com os resultados da Tabela 6, apesar de o ensaio 8 apresentar alto rendimento glicosídico, também gerou uma maior concentração de inibidores totais (2,84 g/L - ácido acético em maior quantidade e uma pequena quantidade do composto furfural). A quantidade de ácido acético também indica que o processo de pré-tratamento e hidrólise enzimática foram efetivos para esta condição de processo devido à quebra efetiva da estrutura da hemicelulose. Além disso, a concentração produzida por esse composto foi menor que 3,0 g/L, portanto, também não prejudicará o processo posterior de fermentação para a obtenção do bioetanol.

3.1.3 Pré-tratamento com aumento de pressão

Seguem abaixo os resultados obtidos a partir dos experimentos realizados, utilizando concentrações de 0,15 e 0,20 g/g biomassa do agente químico NaOH, aumentando a pressão da autoclave de 1,1 para 1,3 bar. Na Tabela 7 são apresentados os resultados de açúcares totais, enquanto na Tabela 8 os resultados das concentrações de inibidores. Os experimentos também foram executados conforme as condições descritas no item 2.2.1. “Pré-tratamento padrão”.

Tabela 7 - Rendimento glicosídico do resíduo lignocelulósico do campim-elefante após os processos de pré-tratamento e hidrólise enzimática (pressão da autoclave de 1,3 bar e concentrações de 15% e 20% de agente químico).

Ensaio	T autoclave (h)	T incubação (h)	g AT / g biomassa
9 (15%)	0,5	24	0,26 ± 0,01
10 (20%)	0,5	24	0,28 ± 0,01

Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: (T): tempo; (AT): açúcares totais (glicose, xilose e celobiose).

Tabela 8 - Inibidores gerados durante o processo de pré-tratamento e hidrólise enzimática com pressão da autoclave de 1,3 bar (concentrações de 15% e 20% de agente químico).

Ensaio	TA (h)	TI (h)	AA (g/L)	HMF (g/L)	F (g/L)	IT (g/L)	g IT / g biomassa
9 (15%)	0,5	24	2,73 ± 0,11	3,96 E-04 ± 0,00	0,01 ± 0,00	2,73 ± 0,11	0,03 ± 0,00
10 (20%)	0,5	24	2,62 ± 0,16	4,05 E-04 ± 0,00	0,01 ± 0,00	2,63 ± 0,17	0,03 ± 0,00

Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: (TA): tempo de autoclave; (TI): tempo de incubação; (AA): ácido acético; (HMF): hidroximetilfurfural; (F): furfural; (IT): inibidores totais;

As médias de açúcares totais (AT) obtidas para os experimentos com aumento da pressão da autoclave foram de 0,26 e 0,28 g/ g biomassa para 15% e 20% de agente químico, respectivamente. Observa-se que os resultados foram iguais aos melhores alcançados através dos planejamentos experimentais com pressão da autoclave de 1,1 bar, sendo 0,26 g/g biomassa para 10% de agente químico e 0,28 g/g biomassa para 15% de agente químico. Logo, cabe realizar uma avaliação estatística relacionando as médias dos melhores resultados dos planejamentos com os obtidos pelos experimentos com aumento de pressão.

Quanto aos inibidores, verifica-se que foi obtido uma maior quantidade de ácido acético e uma pequena quantidade de furfural, assim como nos ensaios dos planejamentos experimentais. Porém, diferentemente dos ensaios realizados anteriormente (com pressão padrão de 1,1 bar), nestes formou-se o subproduto hidroximetilfurfural a partir da quebra da estrutura da celulose e formação de glicose. No entanto, a quantidade desse inibidor é muito

pequena, ou seja, assim como os outros inibidores obtidos, não prejudicaria o processo posterior de fermentação para obtenção do bioetanol.

3.1.4 Avaliação dos resultados alcançados

Na Tabela 9 apresentam-se os resultados dos ensaios dos planejamentos experimentais que obtiveram os melhores rendimentos glicosídicos utilizando as concentrações de 0,10 e 0,15 g/g biomassa do agente químico NaOH. Também constam em tal tabela os ensaios que empregaram as concentrações de 0,15 e 0,20 g/g biomassa, à pressão de 1,3 bar e condições padrão de tempo de autoclave e incubadora Shaker, bem como os melhores resultados obtidos pelo GPPEN para o capim-elefante, utilizando 0,20 g/g biomassa de NaOH (condições padrão de processo). Assim, realizou-se uma análise de *Tukey* para os cinco ensaios a fim de verificar se existe diferença estatística entre as médias dos resultados alcançados (AT) para cada condição de processo realizada.

Tabela 9 - Análise de *Tukey* para os resultados obtidos pelo planejamento experimental, pelo pré-tratamento padrão com aumento de pressão e os alcançados pelo GPPEN.

Ensaio	NaOH (%)	T autoclave (h)	P autoclave (bar)	T incubação (horas)	g AT / g biomassa	Média (g AT / g biomassa)
					0,274	
4	10%	1	1,1	48	0,258	0,263 ± 0,010 ^b
					0,257	
					0,275	
8	15%	1	1,1	48	0,286	0,282 ± 0,010 ^{ab}
					0,283	
					0,255	
9	15%	0,5	1,3	24	0,263	0,261 ± 0,010 ^b
					0,266	
					0,264	
10	20%	0,5	1,3	24	0,277	0,276 ± 0,012 ^b
					0,288	
					0,299	
*	20%	0,5	1,1	24	0,306	0,302 ± 0,004 ^a

0,301

Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: (*): melhor resultado obtido pelo grupo de pesquisas utilizando o capim-elefante; (T): tempo; (P): pressão; (AT): açúcares totais - triplicata obtida dos ensaios; (Média): é a média das triplicatas de cada ensaio; Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente, segundo teste de *Tukey* ($p > 0,05$).

Ao aplicar o teste de *Tukey* com 95% de confiança, não obteve-se diferença significativa entre a média dos resultados do ensaio 8 (processo com 15% de agente químico, pressão de 1,1 bar, tempo de autoclave de 1 hora e 48 horas de incubadora Shaker) e as médias dos demais ensaios realizados neste trabalho. Nota-se que também não há diferença entre o resultado obtido da melhor condição experimental utilizando 10% de agente químico (pressão de 1,1 bar, tempo de autoclave de 1 hora e 48 horas de incubadora Shaker) e os ensaios realizados com concentrações maiores de NaOH (15 e 20%), pressão de 1,3 bar e condições padrão de autoclave e incubação. Só há diferença significativa entre o resultado obtido pelo GPPEN e os ensaios 4, 9 e 10.

Sendo assim, como não há diferença significativa entre o resultado do ensaio 8 e o do grupo de pesquisa realizado com 20% de agente químico NaOH e condições padrão de pré-tratamento, ou seja, 0,5 horas de autoclave a pressão de 1,1 bar (pré-tratamento físico) e 24 horas de processo na incubadora Shaker (tratamento químico), conclui-se que é possível reduzir a concentração do agente químico utilizado para 15% e obter os mesmos resultados. Ou seja, não é necessário aumentar a pressão da autoclave, mas é necessário aumentar o tempo deste equipamento e o tempo de incubação ao reduzir a concentração do agente químico NaOH.

4 CONCLUSÃO

No presente trabalho desenvolvido os melhores resultados obtidos pelo planejamento experimental com 10 e 15% de agente químico NaOH foram de 0,26 e 0,28 g AT/g biomassa, em que as amostras permaneceram na autoclave pelo tempo de 1 hora à pressão padrão de 1,1 bar, e na incubadora Shaker por 48 horas. Verificou-se que a diferença entre as condições de pré-tratamento avaliadas estão relacionadas apenas com o efeito do tempo de autoclave.

Dessa forma, ao analisar a variável não significativa “tempo de incubação”, de 24 e 48 horas, para os ensaios processados com 1 hora de autoclave, determinou-se que as melhores condições de processo foram as que apresentaram maior produção de açúcares fermentescíveis. Os gastos energéticos não foram considerados, uma vez que este trabalho não visou a redução

deles, mas sim a maximização do rendimento de açúcares utilizando a menor concentração do agente químico poluidor NaOH.

Por fim, comparou-se os melhores resultados do planejamento experimental com os obtidos do pré-tratamento padrão e aumento de pressão, além dos alcançados pelo grupo de pesquisa. Verificou-se pelo teste de *Tukey* com 95% de confiança, que a concentração do agente químico utilizado pelo grupo de pesquisa pode ser reduzido de 20% para 15%, obtendo-se os mesmos resultados. Não há necessidade de aumentar a pressão da autoclave, mas é necessário aumentar o tempo deste equipamento e o tempo de incubação ao reduzir a concentração do agente químico NaOH em 25%.

Vale ressaltar que, apesar do sucesso em reduzir a concentração do agente químico atualmente empregado, ocorrerá perda energética nesse novo processo devido ao aumento de tempo da autoclave e Shaker, devendo-se, portanto, aprimorar os estudos sobre essas variáveis a fim de otimizar cada vez mais o processo e garantir que haja a máxima redução dos custos energéticos. Também destaca-se a importância em realizar mais estudos sobre a significância do tempo de incubação, o que pode ser feito por meio de mais testes com tempo de 24 horas para que se tenha a obtenção de mais dados, aumentando a confiabilidade da análise estatística.

REFERÊNCIAS

- BELLISSIMI, E. et al. V. Effects of acetic acid on the kinetics of xylose fermentation by an engineered, xylose-isomerase-based *Saccharomyces cerevisiae* strain. **FEMS Yeast Research**, 9, 358-364. 2009. Disponível em: Efeitos do ácido acético na cinética da fermentação da xilose por uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae*, baseada em xilose-isomerase, | FEMS Leveduras Research | Oxford Academic (oup.com). Acesso em: 19 out. 2020.
- CAMPOS, Breno Barcellos. **Produção de etanol em biomassa de capim-elefante por *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2015. Disponível em: https://www.locus.ufv.br/bitstream/123456789/8471/1/texto_completo.pdf. Acesso em: 15 out. 2020.
- CARBOCLORO. Ficha de informações de segurança de produto químico. **Soda cáustica líquida**. São Paulo, 2011. Disponível em: https://www.santos.sp.gov.br/static/files_www/conteudo/DadosAbertos/FISPQ%20Soda%20C3%A1ustica.pdf. Acesso em: 30 set. 2021.
- DRESCH, A. P.; BENDER, J. P.; MIBIELLI, G. M. **Caracterização, pré-tratamento e hidrólise enzimática da biomassa capim elefante**. Anais da X JIC, Chapecó, 2020. Disponível em: <https://portaleventos.uffs.edu.br/index.php/JORNADA/article/view/13941>. Acesso em: 29 set. 2021.
- FERREIRA, Adriana Dilon. **Produção eficiente de Etanol 2G a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar: otimizando condições de cultivo e operacionais**. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) - Universidade de São Paulo, Lorena, 2016. Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/97/97132/tde-29032017-102500/publico/BIT16006_O.pdf. Acesso em: 29 nov. 2020.
- FIGUEIREDO, Rafael de et al. Mapeamento prospectivo das tecnologias envolvidas na produção de bioetanol. **Cadernos de Prospecção**, Salvador, v. 11, n. 1, p. 127-136, jan./mar., 2018. Disponível em: <https://periodicos.ufba.br/index.php/nit/article/view/23202/23202n>. Acesso em: 1 nov. 2020.
- FLORENCIO, Camila; BADINO, Alberto Colli; FARINAS, Cristiane Sanchez. Desafios relacionados à produção e aplicação das enzimas celulolíticas na hidrólise da biomassa lignocelulósica. **Química Nova**, São Paulo, v. 40, n. 9, p. 1082-1093, 2017. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/BCFKK84CypLv83dXPK6jFBN/?lang=pt>. Acesso em: 1 nov. 2020.
- FRASINELLI, L.P. et al. **Avaliação do pré-tratamento alcalino do bagaço de cana-de-açúcar com hidróxido de cálcio visando-se ao aumento da digestibilidade enzimática da celulose**. XI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, Campinas, 2015. Disponível em: <http://pdf.blucher.com.br.s3-sa-east-1.amazonaws.com/chemicalengineeringproceedings/cobeqic2015/376-33987-261128.pdf>. Acesso em: 29 set. 2021.

GRASEL, F. S. et al. Inovação em Biorrefinarias I. Produção de Etanol de Segunda Geração a partir de Capim-Elefante (*Pennisetum purpureum*) e Bagaço de Cana-de-Açúcar (*Saccharum officinarum*). **Revista Virtual de Química**, Curitiba, v. 9, n. 3, 2017. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Fabio_Grasel3/publication/311739501_Innovation_in_Biorefineries_I_Production_of_Second_Generation_Ethanol_from_Elephant_Grass_Pennisetum_purpureum_and_Sugarcane_Bagasse_Saccharum_officinarum/links/5858fa3708aeffd7c4fd531/Innovation-in-Biorefineries-I-Production-of-Second-Generation-Ethanol-from-Elephant-Grass-Pennisetum-purpureum-and-Sugarcane-Bagasse-Saccharum-officinarum.pdf. Acesso em: 15 out. 2020.

HAMES, B. et al. **Preparation of Samples for Compositional Analysis**. National Renewable Energy Laboratory (NREL), 1-12, 2005. Disponível em: <https://www.nrel.gov/docs/gen/fy08/42620.pdf>. Acesso em: 28 set. 2021.

LOPES, Wenderson Brito et al. Capim-elefante tratado com compostos alcalinos. **Revista Brasileira de Saúde Animal**, v.10, n.3, p. 714-722, 2019. Disponível em: <https://docplayer.com.br/48815828-Capim-elefante-tratado-com-compostos-alcalinos-elephant-grass-treated-with-alkali.html>. Acesso em: 15 out. 2020.

MILLER, Gail Lorenz. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem*, 31: 426-429, 1959. Disponível em: https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwjLkte0tbzzAhW0q5UCHSGpDokQFnoECB8QAQ&url=https%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Fprofile%2FMohammad-Homayonzadeh%2Fpost%2FHow_to_properly_measure_reducing_sugars_in_seeds%2Fattachment%2F5c629bda3843b0544e65798e%2FAS%253A725425382772753%25401549966297941%2Fdownload%2FDinitrosalicylic%2Bacid2.pdf&usq=AOvVaw1fMPhLqYftdLYCkQ-UCrIH. Acesso em: 28 set. 2021.

MORO, Mariana Kuster. **Pré-tratamento da biomassa de cana de açúcar por extrusão com dupla rosca**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <https://docplayer.com.br/69515402-Pre-tratamento-da-biomassa-de-cana-de-acucar-por-extrusao-com-dupla-rosca-mariana-kuster-moro.html>. Acesso em: 1 dez. 2020.

PROJESAN. Ficha de informações de segurança de produto químico. **Hidróxido de sódio solução**. 2021. Disponível em: https://www.projesan.com.br/images/arquivos/fispq/commodities/fispq_soda_caustica_liquida_50.pdf. Acesso em: 30 set. 2021.

RABELO, S. C. **Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas – Unicamp, Faculdade de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Campinas, 2010. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/266933>. Acesso em: 5 jan. 2021.

RENEWABLE FUELS ASSOCIATION (RFA). **Annual Fuel Ethanol Production**. 2020. Disponível em: <https://ethanolrfa.org/markets-and-statistics/annual-ethanol-production>.

Acesso em: 16 jan. 2021.

SANTOS, Fernando A. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**. v. 35, n. 5, p. 1004 – 1010, jan., 2012. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/39pFr9k5VPS9hqhs4yTjdbr/?lang=pt>. Acesso em: 2 dez. 2020.

SANTOS, Martha Suzana Rodrigues dos. Estudo de pré-tratamentos de palha e sabugo de milho visando a produção de etanol 2G. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Alagoas – UFAL. Maceió – AL. 2014. Disponível em: <http://www.repositorio.ufal.br/bitstream/riufal/1204/1/Estudo%20de%20pr%C3%A9%20tratamentos%20de%20palha%20e%20sabugo%20de%20milho%20visando%20a%20produ%C3%A7%C3%A3o%20de%20etanol%202G.pdf>. Acesso em: 1 out.

TOSCAN, Andréia. **Efeito do pré-tratamento hidrotérmico no rendimento da hidrólise enzimática do capim-elefante**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa de PósGraduação em Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2013. Disponível em: <https://1library.org/document/y6xxw2gy-efeito-tratamento-hidrotermico-rendimento-hidrolise-enzimatica-campim-elefante.html>. Acesso em: 23 nov. 2020.

IYE, Edward; BILSBORROW, Paul. **Cellulosic ethanol production from agricultural residues in Nigeria**. **Energy Policy**, 63: 207–214, 2013. Disponível em: https://econpapers.repec.org/article/eeeeenepol/v_3a63_3ay_3a2013_3ai_3ac_3ap_3a207-214.htm. Acesso em: 15 out. 2020.