

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

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**FERMENTAÇÃO EM BATELADA DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA DE CAPIM  
ELEFANTE (*Pennisetum purpureum*) PARA PRODUÇÃO DE ETANOL 2G**

ACADÊMICA: ANA CAROLINA GIACOMELLI VARGAS

ORIENTADOR Prof.: Dr. João Paulo Bender

Abril - 2022

**ANA CAROLINA GIACOMELLI VARGAS**

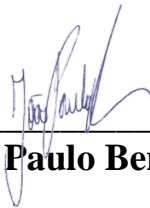
**FERMENTAÇÃO EM BATELADA DA BIOMASSA  
LIGNOCELULÓSICA DE CAPIM ELEFANTE (*Pennisetum  
purpureum*) PARA PRODUÇÃO DE ETANOL 2G**

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. João Paulo Bender**

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em: 08/04/2022

**BANCA EXAMINADORA**



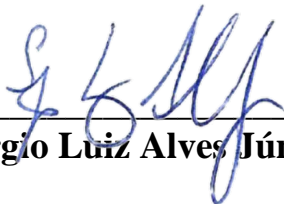
---

**Prof. Dr. João Paulo Bender – UFFS**



---

**Prof. Dr. Guilherme Martinez Mibielli - UFFS**



---

**Prof. Dr. Sérgio Luiz Alves Júnior - UFFS**

# FERMENTAÇÃO EM BATELADA DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA DE CAPIM ELEFANTE (*Pennisetum purpureum*) PARA PRODUÇÃO DE ETANOL 2G

Ana Carolina Giacomelli Vargas<sup>1</sup>, João Paulo Bender<sup>2</sup>

## RESUMO

A demanda sólida e crescente por combustíveis, associada às inúmeras variações positivas no valor do barril de petróleo nas últimas décadas, evidencia, a cada década, a necessidade da diversificação da matriz energética dos países. O Brasil, por exemplo, possui uma demanda interna de aproximadamente 32,6 bilhões de litros de etanol por ano, devido, principalmente, ao seu uso obrigatório na mistura de combustíveis para transporte. Nesse sentido, o presente trabalho propôs realizar ensaios de pré-tratamento, hidrólise enzimática e fermentação em batelada da biomassa de capim elefante (*Pennisetum purpureum*) – cultura lignocelulósica competitiva para a obtenção de etanol em função dos baixos custos de produção e dos altos níveis de produtividade agrícola. Para este trabalho foram realizadas duas metodologias de pré-tratamento alcalino seguido de hidrólise enzimática (2 % (v/m) Cellic Ctec2 e 0,5 % (v/m) Cellic Htec2) para obtenção de açúcares fermentescíveis. Os pré-tratamentos se mostraram eficientes na disponibilização da celulose e remoção do conteúdo de lignina. Os hidrolisados obtidos apresentaram 19,9 e 25,6 g/L de açúcares totais. Em seguida, três condições de fermentação em cada hidrolisado foram realizadas: (i) fermentação realizada pela cepa de levedura selvagem *Meyerozyma caribbica* (CHAPE-096), isolada da palha de milho em decomposição; (ii) fermentação realizada pela cepa industrial de *Saccharomyces cerevisiae* (PE-02) e; (iii) por uma combinação das cepas *Saccharomyces cerevisiae* (PE-02) e *Meyerozyma caribbica* (CHAPE-096) na proporção 1:1 (v/v). Alcançou-se uma concentração máxima de etanol de 0,42 g<sub>etanol</sub>/g<sub>glicose</sub> através da combinação das cepas *S. cerevisiae* e *M. caribbica*, representando 83 % de rendimento máximo teórico (0,511 g<sub>etanol</sub>/g<sub>glicose</sub>). Obteve-se ainda nesse estudo o subproduto xilitol, com concentração máxima de 0,61 g<sub>xilitol</sub>/g<sub>xilose</sub> a partir da xilose consumida pela cepa industrial *S. cerevisiae*.

**Palavras-chaves:** Capim elefante; Pré-tratamento; Hidrólise enzimática; Fermentação; Etanol 2G.

## ABSTRAT

The solid and growing demand for fuels, associated with the numerous positive variations in the price of a barrel of oil in recent decades, evidences, with each decade, the need to diversify the energy matrix of countries. Brazil, for example, has an internal demand of approximately 32.6 billions liters of ethanol per year, mainly due to its mandatory use in the mixture of fuels for transport. In this sense, the present work proposed to carry out pre-treatment tests, enzymatic hydrolysis and batch fermentation of elephant grass (*Pennisetum purpureum*) biomass – a competitive lignocellulosic culture for obtaining ethanol due to low production costs and high levels of agricultural productivity. For this work, two alkaline pretreatment methodologies were carried out followed by enzymatic hydrolysis (2 % (v/m) Cellic Ctec2 and 0.5 % (v/m) Cellic Htec2) to obtain fermentable sugars. The pre-treatments proved efficient in making cellulose available and removing the lignin content. The hydrolysates obtained showed 19.9 and 25.6 g/L

<sup>1</sup> Discente do Curso de Engenharia Ambiental e Sanitária, Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), *Campus* Chapecó, SC, Brasil. E-mail: anacarolina.giacomelli99@gmail.com

<sup>2</sup> Docente do Curso de Engenharia Ambiental e Sanitária, Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), *Campus* Chapecó, SC, Brasil. E-mail: joão.bender@uffs.edu.br

of total sugars. Then, three fermentation conditions were carried out in each hydrolyzate: (i) fermentation carried out by the wild yeast strain *Meyerozyma caribbica* (CHAPE-096), isolated from decomposing corn husk; (ii) fermentation carried out by the industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* (PE-02) and; (iii) by a combination of *Saccharomyces cerevisiae* (PE-02) and *Meyerozyma caribbica* (CHAPE-096) strains in a 1:1 (v/v) ratio. A maximum ethanol concentration of 0.42 g<sub>etanol</sub>/g<sub>glucose</sub> was reached through the combination of *S. cerevisiae* and *M. caribbica* strains, representing 83% of maximum theoretical yield (0.511 g<sub>etanol</sub>/g<sub>glucose</sub>). The sub-product xylitol was also obtained in this study, with a maximum concentration of 0.61 g<sub>xylitol</sub>/g<sub>xylose</sub> from the xylose consumed by the industrial strain *S. cerevisiae*.

**Keywords:** Elephant grass; Pretreatment; Enzymatic hydrolysis; Fermentation; 2G Ethanol.

## 1. INTRODUÇÃO

O Programa Nacional do Álcool, o Proálcool, foi uma resposta do governo brasileiro à instabilidade do preço dos barris de petróleo devido à crise do petróleo na década de 1970. O Proálcool criou mercado para o etanol como substituto parcial ou total da gasolina nos automóveis gerando uma sólida demanda interna de etanol em função do uso obrigatório de 22% na gasolina, corroborando para o crescimento da indústria alcooleira (KUPCZYK et al., 2019; BRASIL, 2001).

O Brasil possui os recursos e condições necessárias para a expansão energética sustentável, ou seja, a expansão de culturas alternativas sem a exploração de novos territórios através das plantações entre safras, uma alternativa de plantação que não compete as plantações de alimentos e possibilita a flexibilização da produção de etanol. Além disso, devido a sua alta radiação solar, diversidade de zonas climáticas e biodiversidade, tem um alto potencial em termos de disponibilidade e variedade de culturas lignocelulósicas. Essas vantagens permitem uma fácil adaptação de diferentes culturas para a produção de etanol (CARDONA et al., 2013).

O capim elefante (*Pennisetum purpureum*) é uma cultura lignocelulósica encontrada em regiões tropicais, possui alto rendimento (45 ton/ha comparada a 21 ton/ha da cana de açúcar, principal cultura energética no Brasil), fácil cultivo e versatilidade, prosperando em solos ácidos e de baixa fertilidade, crescimento rápido e ciclo de produção mais curto, podendo ser cultivada entre safras (possibilidade de corte aos 150 dias de crescimento) o que a torna uma competitiva matéria-prima para a obtenção etanol de segunda geração (KONGKEITKAJORN et al., 2020; CARDONA et al., 2013; MENEGOL et al., 2014; SAMSON et al., 2005; FERREIRA et al., 2021). Ademais, a composição do capim elefante não tratado contém aproximadamente 36 % de celulose e cerca de 22,5 % hemicelulose, carboidratos passíveis de serem utilizados para a sacarificação em açúcares fermentáveis (MENEGOL et al., 2016), semelhante a composição

do bagaço da cana-de-açúcar, com cerca de 41 % de celulose e 25 % de hemicelulose (CARVALHO et al., 2020).

A produção do etanol de segunda geração a partir de materiais lignocelulósicos requer três etapas: pré-tratamento, hidrólise e fermentação. A primeira etapa, o pré-tratamento, é de suma importância para a quebra da estrutura lignocelulósica, deixando as frações de celulose e hemicelulose acessíveis para a enzima (VASIĆ et al., 2021). A formação de compostos indesejáveis, como ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural, deve ser considerada como um aspecto relevante na escolha do pré-tratamento devido aos seus efeitos inibitórios na etapa de fermentação (OLIVA et al., 2008). Entre as abordagens de pré-tratamento, os pré-tratamentos alcalinos suaves levam a menor formação de compostos inibidores (JÖNSSON e MARTÍN, 2016).

A segunda etapa, a hidrólise enzimática, tem por finalidade a quebra da celulose e da hemicelulose em moléculas menores. A hidrólise libera os monômeros de glicose e xilose, açúcares que servem como substrato na fermentação microbiana para a produção de etanol (KONGKEITKAJORN et al., 2020). Na etapa final, os açúcares fermentescíveis obtidos na hidrólise são fermentados em etanol pela levedura empregada. A tecnologia de produção do etanol comumente utilizada é a fermentação em batelada (SHF) (CHOHAN et al., 2020).

Nesse contexto, esse estudo objetiva realizar o pré-tratamento, a hidrólise enzimática e a fermentação em batelada da biomassa de capim elefante, de modo a alcançar elevados rendimentos de álcool e avaliá-la como uma possível rota para a produção de etanol, associando essa às demais rotas de produção de biocombustíveis.

## **2. METODOLOGIA**

### **2.1. Materiais**

A biomassa de capim elefante é proveniente da área experimental agrícola da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS, Campus Chapecó - Santa Catarina – Brasil (27°11' S e 52°70' W). Para os procedimentos analíticos, a matéria-prima foi seca em estufa (65 ° C por 48 h), trituradas em moinho Wiley e peneirada na faixa de valores de 30 a 40 mesh.

As preparações enzimáticas comerciais Cellic CTec2 (complexo de celulases) e NS22244-Cellic HTec2 (complexo de hemicelulases) empregadas são ambas provenientes da Novozymes A/S (Bagsvaerd, Dinamarca) e fornecidas pela Novozymes Latin America (Araucária, PR, Brasil).

Utilizou-se a levedura industrial *Saccharomyces cerevisiae* (PE-02) fornecida pela empresa Fermentec (Piracicaba/SP) (BASSO et al., 2008). Com o objetivo de ampliar a base de conhecimento sobre leveduras selvagens, também utilizou-se a levedura *Meyerozyma caribbica* (CHAPE-096) isolada da palha de milho em decomposição, pertencente à coleção do Grupo de Pesquisa em Processos Enzimáticos e Microbiológicos (GPPEM) da Universidade Federal da Fronteira Sul campus Chapecó.

## **2.2. Caracterização da biomassa**

O teor de cinzas, extrativos, lignina solúvel em ácido, lignina insolúvel em ácido e carboidratos foram determinados a partir dos métodos analíticos descritos pela National Renewable Energy Laboratory (SLUITER et al., 2012).

### **2.2.1. Análise do teor de cinzas**

Para a quantificação de cinzas (material orgânico insolúvel ou solúvel como carbonatos e fosfatos de potássio, sódio, cálcio e magnésio bem como os óxidos de ferro e manganês) foram utilizados cadinhos de porcelana de 50 mL, enumerados adequadamente e pesados em balança analítica (M1). Pesou-se cerca de 1,50 g da biomassa seca, sem umidade, nos cadinhos previamente pesados (M2). Realizou-se a carbonização do mesmo em mufla a 800 °C por 2 horas. Repetiu-se a calcinação por mais 15 min para verificar a constância do peso. Os cadinhos contendo a amostra carbonizada são pesados e tem sua massa anotada (M3). Efetuaram-se análises em triplicatas. A concentração de cinzas obtém-se utilizando a Equação 1.

$$\% \text{ cinzas} = \left( \frac{M3 - M1}{M2 - M1} \right) \times 100 \%$$

Equação 1

M1: Massa do cadinho calcinado vazio, em g.

M2: Massa do cadinho + massa do material livre de umidade, em g.

M3: Massa do cadinho com cinzas, em g.

### **2.2.2. Análise do teor de extrativos**

A fim de quantificar os extrativos removendo seu material não estrutural (compostos fenólicos, corante e pigmentos), antes da quantificação da lignina e dos carboidratos, para que não haja interferência nestas etapas analíticas, pesou-se aproximadamente 4,00 g do resíduo,

isento de umidade, e adicionou-se ao cartucho de extração tendo sua massa devidamente anotada (M1).

O cartucho preenchido pelo resíduo foi introduzido no tubo de extração do Soxhlet. Após, adicionou-se 200 mL de água destilada em cada balão do extrator e ligou-se o aquecimento do mesmo para dar início ao processo de sifonação. A extração ocorreu até que o solvente em torno do cartucho se tornou incolor (aproximadamente 6 horas). Repetiu-se o mesmo processo utilizando 150 mL de álcool etílico.

Ao término da extração, colocou-se o cartucho em estufa a 105 °C e secou-se o resíduo até o peso constante, determinado em balança analítica (M2), a fim de determinar o peso do material sem extrativos. Para o cálculo do teor de extrativos utilizou-se a Equação 2.

$$\% \text{ extrativos} = \left( \frac{M1 - M2}{M1} \right) \times 100 \%$$

Equação 2

M1: Massa da biomassa livre de umidade, em g.

M2: Massa da biomassa livre de extrativos, em g.

### 2.2.3. Determinação do teor de carboidratos e lignina solúvel e insolúvel

Para execução do procedimento de quantificação do conteúdo de carboidratos e lignina (solúvel e insolúvel) na biomassa, inicialmente realizou-se uma hidrólise ácida concentrada, pesou-se aproximadamente 0,30 g de cada amostra, livre de umidade, em tubos de ensaio devidamente etiquetados. Adicionou-se 3,00 mL de ácido sulfúrico a 72 % (m/m) em cada tubo. Posteriormente, os tubos foram incubados em banho termostático a 30 °C por 1 h. Usou-se um bastão de vidro para agitar as amostras a cada 5-10 min, sem remover os tubos do banho.

Depois de decorrido o tempo da hidrólise ácida concentrada, removeu-se os tubos do banho e transferiu-se todo conteúdo para erlenmeyers de 250 mL, utilizando para isso, 84 mL de água destilada, sendo a concentração ácida do meio diluída para 4%, iniciando-se o processo de hidrólise diluída. Preparou-se um branco com ácido sulfúrico a 4%. Para a completa hidrólise, fecharam-se os erlenmeyers com papel alumínio e fita adesiva colocou-se em uma autoclave, por 1 h a 121 °C e pressão de 1,1 bar. Após a descompressão da autoclave, os frascos foram retirados e resfriados à temperatura ambiente antes de remover o papel alumínio.

Para fins de análise de lignina insolúvel, os hidrolisados ácidos foram filtrados em funil utilizando-se papéis de filtro, em seguida, o papel filtro juntamente com os sólidos retidos foram transferidos para placas de Petri e encaminhados para estufa a 40°C até massa constante. Para

que não haja uma superestimação dos dados de lignina insolúvel, o teor de cinzas será descontado nos cálculos, como demonstra a Equação 3.

$$\% \text{ lignina insolúvel} = \left( \frac{M2}{M1} \times 100 \% \right) - \% \text{ cinzas}$$

Equação 3

M1: Massa da biomassa utilizada na hidrólise livre de umidade, em g.

M2: Massa da lignina insolúvel seca, em g.

% cinzas: Teor de cinzas determinado segundo a Equação 1.

Em termos de lignina solúvel, determinou-se através da medida de absorbância em um espectrofotômetro UV-visível. Para isso, transferiu-se 1,00 mL de cada hidrolisado ácido para balões volumétricos de 100 mL, tendo seu volume aferido com água destilada. Realizou-se a leitura da solução a 280 nm utilizando celas de quartzo.

$$C \text{ lignina solúvel} = (41,87 \times (AT - APD) - 0,3279) \times 10^{-3}$$

$$APD = (C11 + C22)$$

$$\% \text{ lignina solúvel} = (C \text{ lignina solúvel} \times V_{\text{filtrado}} \times FDM1 \times 100 \%)$$

Equação 4

AT: Absorbância da solução de lignina junto com os produtos de degradação a 280 nm.

APD: Absorbância, a 280 nm, dos produtos de decomposição dos açúcares, cujas concentrações C1 e C2 serão determinadas previamente por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e  $\epsilon_1$  e  $\epsilon_2$  são as absorvidades da furfural e HMF (146,85 e 114,00 L g<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>).

C lignina insolúvel: Concentração de lignina solúvel.

Vfiltrado: Volume do hidrolisado filtrado, 0,087 L.

FD: Fator de diluição para leitura da absorbância, 100.

M1: Massa do resíduo utilizado na hidrólise, livre de umidade, em g.

Por fim, a lignina total compreende a soma dos valores encontrados na Equação 3 e Equação 4.

Após a etapa de filtração da hidrólise ácida, alíquotas de cada hidrolisado foram neutralizadas com carbonato de cálcio até atingir pH 5-6. O reagente foi adicionado lentamente, para assim, evitar a formação de espuma. Posteriormente, os hidrolisados neutralizados foram filtrados diretamente em vials utilizando filtros de membrana de 0,22 Millipore. As amostras e



padrões foram injetados no cromatógrafo, utilizando para análise a coluna Aminex HPX-87H. As áreas dos picos correspondentes às hexoses e as pentoses serão utilizados para calcular as massas de glicana e xilana, respectivamente. Os fatores usados para converter açúcares monoméricos em anidro monômeros são 0,90 para glicose e 0,95 para celobiose. De forma similar, xilose e arabinose terão suas concentrações efetuadas utilizando-se um fator de 0,88. Esses fatores são calculados baseados na adição de água nos polissacarídeos durante a hidrólise, conforme Equação 4.

$$\% \text{ açúcares} = \left( \frac{C_{CLAE} \times CA \times V_{filtrado}}{M1} \times 100 \% \right) - \% \text{ cinzas}$$

(Equação 4)

$C_{CLAE}$ : concentração do açúcar quantificado por CLAE, em g/L;

CA: anidro correção para calcular a concentração polimérica dos açúcares dada a concentração monomérica dos açúcares. Para a glicose, celobiose, xilose e arabinose temos, 0,90; 0,95; 0,88 e 0,88, respectivamente;

$V_{filtrado}$ : volume de hidrolisado filtrado, 0,087 L;

M1: massa de biomassa utilizada na hidrólise descontando o teor de umidade, em g.

### 2.3. Pré-tratamentos da biomassa

Dois métodos de pré-tratamento foram aplicados para a biomassa. O primeiro método de pré-tratamento foi realizado nas condições previamente definidas pelo grupo de pesquisa em trabalhos anteriores (BOHN et al., 2021; VARGAS et al., 2021). Dessa maneira, a biomassa foi tratada com hidróxido de sódio (NaOH), a uma concentração de 0,20 g de hidróxido de sódio/g de biomassa, razão sólido líquido 1:10 (m/v), incubação em agitador orbital a 35 °C e 200 rpm por um período de 24 horas.

O segundo método foi adaptado do tratamento descrito por Liu et al., (2018) para a remoção da lignina. Utilizou-se o tratamento alcalino combinado com os agentes hidróxido de sódio (NaOH) (4% m/v) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (1% v/v), com razão sólido líquido 1:10 (m/v). Dois ciclos foram conduzidos em um reator de vidro com agitação mecânica a 80 °C por 4 horas. Após o término de cada reação, a suspensão foi filtrada em bomba à vácuo utilizando tecido volta ao mundo, neutralizada com ácido acético (CH<sub>3</sub>COOH) (3% v/v) e lavada com excesso de água destilada para neutralização. Posteriormente, foi adicionado água destilada na proporção de 1:10 (m/v) (em relação à biomassa inicial) a fração sólida remanescente para a hidrólise enzimática.

## 2.4. Hidrólise enzimática

A etapa de hidrólise enzimática foi realizada nas condições previamente definidas pelo grupo de pesquisa em trabalhos anteriores (BOHN et al., 2021). Ajustou-se às amostras pré-tratadas com uma solução de ácido cítrico (1 M) até atingir a faixa de pH ótimo das enzimas, entre 5,0 - 5,5. Em seguida, diluiu-se as enzimas na proporção 1:10 (v/v) em tampão acetato (0,05 mol/L e pH: 5,0) e adicionou-se nas amostras porcentagens (em relação a biomassa seca) de 0,5 % (v/m) para Celic Htec2 e 2 % (v/m) para Cellic Ctec2. Posteriormente, os frascos foram novamente colocados em agitador orbital, a 50 °C e 200 rpm por um período de 24 horas.

## 2.5. Fermentação em batelada (SHF)

A fermentação em batelada seguiu o procedimento descrito por Tadioto et al., (2022) As células da levedura foram inicialmente pré-cultivadas em YPD (10 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 20 g L<sup>-1</sup> de peptona e 20 g L<sup>-1</sup> de glicose) até sua fase exponencial de crescimento. As células do pré-crescimento foram transferidas para os hidrolisados (1 centésimo do volume final), que tiveram seu meio ajustado para pH 5 e adição de YP (10 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura e 20 g L<sup>-1</sup> de peptona).

As fermentações foram realizadas a 30 °C, sob 145 rpm, durante 48 h com retirada de amostras para determinação do crescimento celular (por densidade óptica a 570 nm), consumo de açúcares e da produção de etanol. Os sobrenadantes foram filtrados em vials utilizando filtros de nylon com poros de 0,45 µm (Milipore) para quantificação dos açúcares e etanol em HPLC.

A partir dos dois mostos distintos, mosto provindo da metodologia de pré-tratamento de Bohn et al., (2021) e Vargas et al., (2021) e mosto provindo da metodologia de pré-tratamento adaptada Liu et al., (2018), foram realizadas três condições de fermentação para cada meio: (i) fermentação realizada pela cepa de levedura selvagem *M. caribbica* (CHAPE-096); (ii) fermentação realizada pela cepa industrial de *S. cerevisiae* (PE-02) e (iii) fermentação realizada por uma combinação das cepas *S. cerevisiae* (PE-02) e *M. caribbica* (CHAPE-096) na proporção 1:1 (v/v).

## 2.6. Quantificação de carboidratos e produtos de decomposição

Os açúcares totais (glicose, xilose e celobiose) e inibidores totais (ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural) da biomassa in natura, dos meios pré-tratados e dos meios hidrolisados foram quantificados através de curvas de calibração obtidas por meio da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Para a quantificação, utilizou-se o detector RID-10A (índice de refração) e as condições operacionais descritas por Rabelo et al., (2014).

## 2.7. Consumo de açúcares e produção de etanol

As concentrações de glicose, xilose e celobiose e etanol dos meios fermentados foram determinados usando cromatografia líquida de alta performance (HPLC; LCMS-2020, Shimadzu), com um índice de refração detector (RID-10, Shimadzu) e uma coluna para ácidos orgânicos (Aminex HPX-87H, Bio-Rad) sob condições operacionais descritas por Tadioto et al., (2022).

## 2.8. Análise dos dados experimentais

No estudo da biomassa lignocelulósica para a geração de etanol, todas as análises foram realizadas em três experimentos completamente independentes e com produtos químicos e solventes de grau analítico. Dessa maneira, os resultados obtidos são apresentados em termos de média de centralização (média aritmética amostral) e média de dispersão (desvio padrão amostral).

# 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

## 3.1. Caracterização da biomassa

A biomassa lignocelulósica teve a estrutura constituída principalmente por polímeros de celulose, hemicelulose e lignina, juntamente com pequenas quantidades de outros compostos como cinzas e extrativos, conforme é mostrado na Tabela 1.

Tabela 1 – Caracterização da biomassa in natura e em base seca

| Caracterização (%) |              |              |              |                |
|--------------------|--------------|--------------|--------------|----------------|
| Cinzas             | Extrativos   | Celulose     | Hemicelulose | Lignina Total* |
| 3,50 ± 0,23        | 17,86 ± 0,40 | 35,69 ± 3,01 | 15,26 ± 2,72 | 18,03 ± 1,03   |

\* Corresponde a soma dos valores de lignina solúvel em ácido e lignina insolúvel em ácido

Fonte: Autores (2022)

No estudo de Marafon et al., (2021) analisando variedades de capim elefante, o autor e colaboradores encontraram teores médios semelhantes de celulose (36,0 %) e valores superiores de hemicelulose (30,3 %). Outro estudo referente à caracterização da folha e caule da biomassa de capim elefante encontrou valores similares de celulose (34,2 %) e hemicelulose (24,3 %) (MOHAMMED et al., 2015).

O teor de lignina da biomassa de estudo é superior aos teores médios da literatura (LISTA et al., 2020; MARAFON et al., 2021; MOHAMMED et al., 2015). A quantidade de

cinzas encontrada para o capim elefante está de acordo com o valor obtido por outro trabalho, no qual obteve-se um teor médio para genótipos de capim elefante de 3,0 % (MORAIS et al., 2009). O teor de extrativos também é semelhante com o estudo de Nascimento e Rezende (2018) no qual obteve-se um teor de 12,3 % para a mesma biomassa.

### 3.2. Caracterização da biomassa após os métodos de pré-tratamento

Os teores de celulose e lignina antes dos pré-tratamentos correspondiam a 35,69 % e 18,03 % respectivamente. Conforme apresentado na Tabela 2, as duas metodologias de pré-tratamento foram eficientes para enriquecer os substratos em celulose e remover o teor de lignina. O teor de celulose na biomassa aumentou para 53,68 % com o primeiro método de tratamento e para 65,82 % após o segundo método de pré-tratamento.

Tabela 2 – Caracterização da biomassa em base seca após os dois métodos de pré-tratamentos

| Caracterização (%)   |             |              |              |                |
|--|-------------|--------------|--------------|----------------|
| Cinzas   | Extrativos  | Celulose     | Hemicelulose | Lignina Total* |
| Metodologia de pré-tratamento: Bohn et al., (2021) e Vargas et al., (2021) |             |              |              |                |
| 2,08 ± 0,30  | 4,30 ± 0,19 | 53,68 ± 1,01 | 16,93 ± 1,40 | 6,64 ± 0,61    |
| Metodologia de pré-tratamento: Adaptado de Liu et al., (2018)              |             |              |              |                |
| 0,86 ± 0,14  | 1,22 ± 0,21 | 65,82 ± 4,20 | 9,96 ± 0,47  | 9,52 ± 0,63    |

\* Corresponde a soma dos valores de lignina solúvel em ácido e lignina insolúvel em ácido

Fonte: Autores (2022)

O conteúdo de celulose remanescente após o pré-tratamento é semelhante ao trabalho de Lu et al., (2019) para o capim elefante, no qual a fração de celulose aumentou de 40,30 % para 60,01 % e 72,01 % após os pré-tratamentos alcalino e com solvente orgânico, respectivamente.

Os resultados da deslignificação obtidos no presente trabalho, são semelhantes aos resultados obtidos por Cardona et al., (2014), que estudaram os efeitos de diferentes métodos de pré-tratamento para a mesma biomassa, em todos os tratamentos realizados, a autora e colaboradores obtiveram conteúdos de lignina na faixa de 6,8 a 15,8 %. Nascimento e Rezende (2018) compararam três metodologias de pré-tratamento para o capim elefante e os três pré-tratamentos demonstram efeitos semelhantes, diminuindo o conteúdo final de lignina para teores entre 9 e 10 %.

Diante disso, destaca-se a satisfatória eficiência dos tratamentos realizados na remoção da lignina presente na biomassa de capim elefante, o que representa uma vantagem, visto que a lignina se constitui como uma “barreira” que impede a eficiência da hidrólise enzimática.

### 3.3. Caracterização dos hidrolisados após a hidrólise enzimática

As frações solúveis na forma de monossacarídeos (xilose e glicose), celobiose, ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural presentes nos hidrolisados após cada etapa de pré-tratamento e hidrólise enzimática são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Caracterização dos hidrolisados obtidos após o processo de hidrólise enzimática

| Caracterização (g/L)   |             |             |                 |               |                   |
|--|-------------|-------------|-----------------|---------------|-------------------|
| Glicose  | Xilose      | Celobiose   | Açúcares Totais | Ácido Acético | Inibidores Totais |
| Metodologia de pré-tratamento: Bohn et al., (2021) e Vargas et al., (2021) |             |             |                 |               |                   |
| 11,04 ± 0,74   | 8,20 ± 0,51 | 0,64 ± 0,31 | 19,88 ± 1,56    | 2,48 ± 0,05   | 2,48 ± 0,05       |
| Metodologia de pré-tratamento: Adaptado de Liu et al., (2018)              |             |             |                 |               |                   |
| 22,12 ± 0,02   | 3,50 ± 0,01 | 0,00 ± 0,00 | 25,61 ± 0,03    | 0,00 ± 0,00   | 0,00 ± 0,00       |

Furfural e hidroximetilfurfural não detectados.

Fonte: Autores (2022)

Por meio da Tabela 3 observa-se que os hidrolisados são compostos principalmente por glicose e xilose. Para o hidrolisado provindo de Bohn et al., (2021) e Vargas et al., (2021) outros açúcares e ácidos orgânicos como a celobiose e o ácido acético estão presentes em pequena quantidade. O hidrolisado provindo da metodologia de pré-tratamento adaptado de Liu et al., (2018) não apresentou nenhuma quantidade de ácido acético no hidrolisado, todavia, isso não significa que o pré-tratamento não tenha liberado ácido acético ao meio, apenas que o ácido foi removido pelas lavagens empregadas na metodologia de pré-tratamento. A presença de ácido acético em um dos meios pode comprometer o desempenho das leveduras visto que a espécie *M. caribbica* pode apresentar dificuldade em metabolizar a xilose na presença de ácido acético (TADIOTO et al., 2022). Furfural e hidroximetilfurfural, resultantes da decomposição de pentoses e hexoses, respectivamente, não foram detectados nas amostras, o que é um bom resultado pois os compostos são inibidores químicos na fermentação por leveduras (NASCIMENTO e REZENDE, 2018).

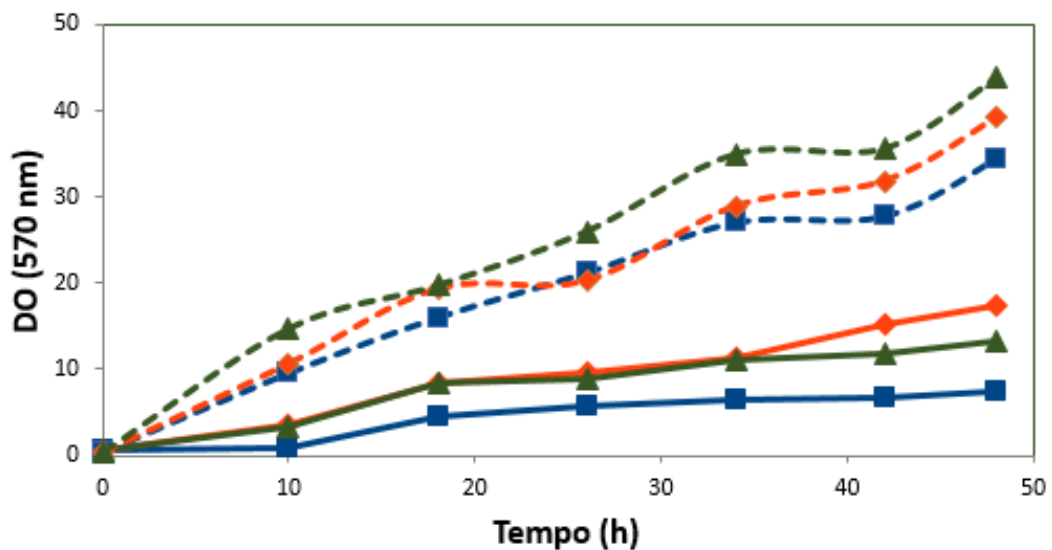
Os resultados de açúcares totais do segundo pré-tratamento são semelhantes aos obtidos por Bohn et al., (2021) no qual a autora e colaboradores obtiveram 31,04 g/L para a biomassa

de palha de milho em sua melhor condição de pré-tratamento. Os resultados estão de acordo com outros estudos que também utilizam biomassa lignocelulósica visando a produção de etanol, como a palha de arroz do trabalho dos autores Kolo, Wahyuningrum e Hertadi (2020) para a biomassa de capim elefante que obtiveram concentrações de glicose e xilose após hidrólise de 18,45 e 8,45 g/L, respectivamente.

### 3.4. Crescimento celular

As cepas de *M. caribbica* (CHAPE-096) e *S. cerevisiae* (PE-02) foram capazes de crescer no meio contendo glicose e xilose como fontes de carbono (Figura 1). O meio proveniente do hidrolisado após a hidrólise enzimática adaptado de Liu et al., (2018), no qual continha 22,12 g/L de glicose e 3,50 g/L de xilose, proporcionou um crescimento mais vigoroso das células em relação ao hidrolisado após a hidrólise de Bohn et al., (2021) e Vargas et al., (2021), com 11,04 g/L de glicose, 8,20 g/L de xilose e 0,64 g/L de celobiose.

Figura 1 – Crescimento celular das leveduras *M. caribbica*, *S. cerevisiae* e combinação de *M. caribbica*, *S. cerevisiae* nos meios de fermentação provindos da metodologia de Bohn et al., (2021) e Vargas et al., (2021) e adaptado de Liu et al., (2018).



Hidrolisado após a hidrólise enzimática de Bohn et al., (2021) e Vargas et al., (2021) (linhas contínuas), hidrolisado após a hidrólise enzimática adaptado de Liu et al., (2018) (linhas pontilhadas), CHAPE-096 (quadrado), PE-02(diamante), CHAPE-096 + PE-02(triângulo).

Fonte: Autores (2022)

Através da Figura 1 é possível perceber que tanto a levedura industrial, a levedura selvagem e a mistura de leveduras tiveram um maior crescimento no meio proveniente do hidrolisado adaptado de Liu et al., (2018) em comparação ao meio provindo do hidrolisado de

Bohn et al., (2021) e Vargas et al., (2021). Essa diferença de crescimento pode ser explicada pelo comprometimento do desempenho das leveduras pela presença de ácido acético, composto com efeito inibitório principalmente na assimilação da xilose, efeito que é acentuado em meio com pH ácido, como o caso do meio de fermentação de Bohn et al., (2021) e Vargas et al., (2021) (BELLISSIMI et al., 2009, BONATTO et al., 2020).

A curva de crescimento da cepa *M. caribbica* no hidrolisado contendo inicialmente 22,12 g/L de glicose assim como a fase lag de crescimento de 10 horas é equivalente ao descrito por Tadioto et al., (2022) para a mesma cepa em meio contendo 20 g/L de glicose livre de ácido acético. A curva de crescimento da *M. caribbica* no hidrolisado contendo inicialmente 11,04 g/L de glicose e 8,20 g/L de xilose apresentou resultados inferiores de crescimento, mesmo comprovado que a cepa *M. caribbica* (CHAPE-096) é capaz de crescer de forma semelhante tanto em meio contendo glicose como xilose. A fase lag de crescimento durou aproximadamente 15 horas para esse hidrolisado. Esses resultados de crescimento da cepa selvagem corroboram a hipótese da interferência do ácido acético no desempenho no crescimento das leveduras no meio provindo de Bohn et al., (2021) e Vargas et al., (2021).

O crescimento da cepa industrial *S. cerevisiae* (PE-02) foi semelhante ao perfil de crescimento perfil da levedura selvagem *M. caribbica* (CHAPE-096) e da combinação das cepas para ambos os meios.

### 3.5. Consumo de glicose e produção de etanol

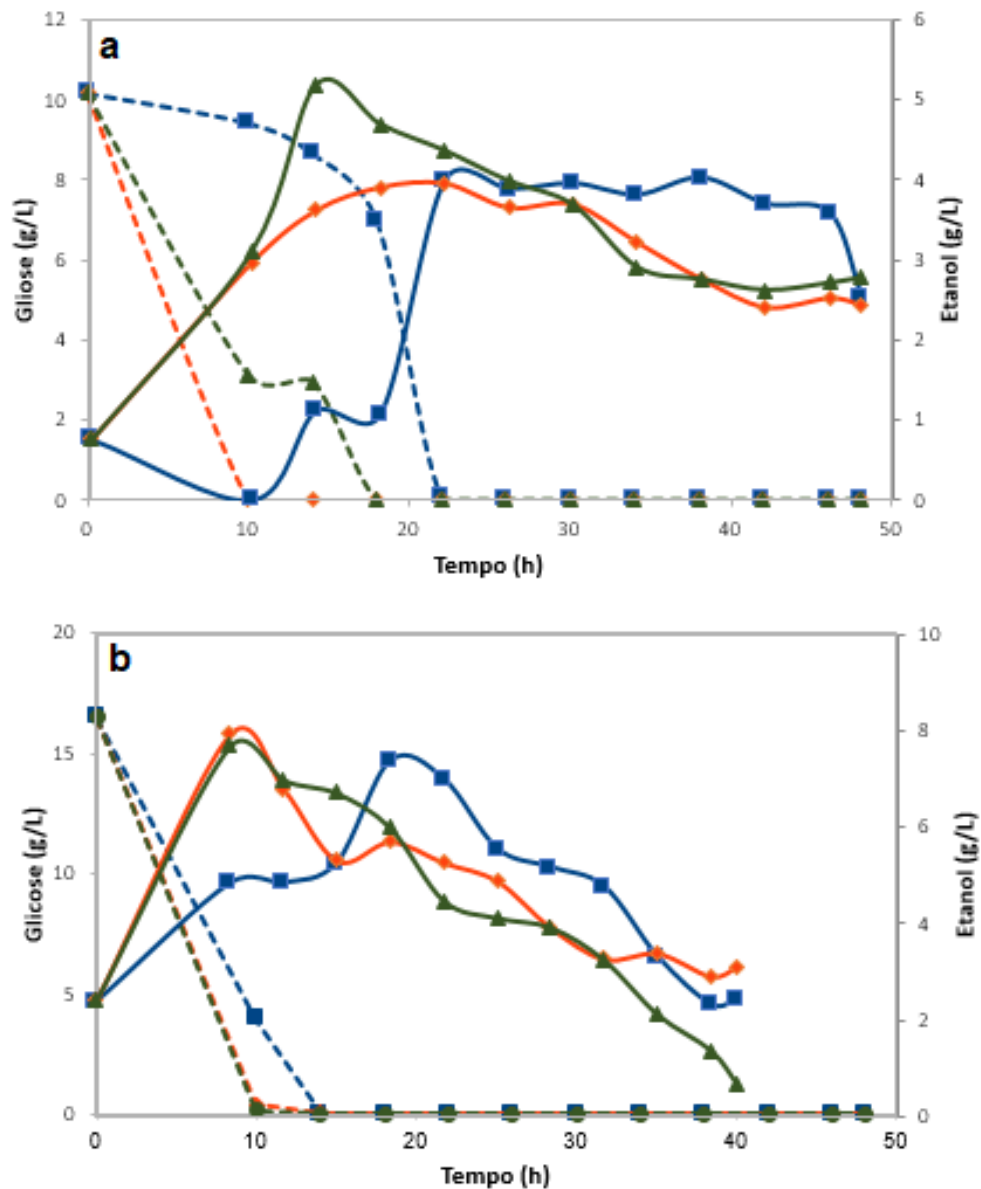
As leveduras analisadas no meio proveniente do hidrolisado com metodologia de pré-tratamento adaptado de Liu et al., (2018) conseguiram consumir toda a glicose nas primeiras 14 horas como primeira fonte de carbono. Para o hidrolisado de Bohn et al., (2021) e Vargas et al., (2021) as leveduras consumiram toda a glicose em 18 horas de incubação (Figura 2).

As leveduras geralmente têm a glicose como fonte de carbono preferida (SIMPSON-LAVY e KUPIEC, 2018), o que explica o consumo mais rápido desse açúcar, aqui observado. Contudo, tanto a cepa selvagem *M. caribbica* (CHAPE-096) industrial *S. cerevisiae* (PE-02) são capazes de consumir xilose; assim, a não metabolização desta pentose pela *M. caribbica* pode ser explicada pela presença do ácido acético (TADIOTO et al., 2022).

A produção de etanol atingiu concentrações de 0,36 g<sub>etanol</sub>/g<sub>glicose</sub> para a levedura selvagem, 0,36 g<sub>etanol</sub>/g<sub>glicose</sub> para a levedura industrial e 0,42 g<sub>etanol</sub>/g<sub>glicose</sub> para a combinação das leveduras em meio provindo do hidrolisado de Bohn et al., (2021) e Vargas et al., (2021), representando 70, 70 e 83 % de rendimento máximo teórico (0,511 g<sub>etanol</sub>/g<sub>glicose</sub>). Para o meio provindo do hidrolisado adaptado de Liu et al., (2018) as concentrações foram de 0,33, 0,36 e

0,35  $\text{g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{glicose}}$  para a levedura selvagem, levedura industrial e a combinação de leveduras respectivamente, representando 65, 70 e 68 % de rendimento máximo.

Figura 2 – Consumo de glicose e produção de etanol nos meios de fermentação providos da metodologia de Bohn et al., (2021) e Vargas et al., (2021) e adaptado de Liu et al., (2018).



Hidrolisado após a hidrólise enzimática provindo do pré-tratamento de Bohn et al., (2021) e Vargas et al., (2021) (a), hidrolisado após a hidrólise enzimática provindo do pré-tratamento adaptado de Liu et al., (2018) (b), consumo de glicose (linhas pontilhadas), produção de etanol (linhas contínuas), CHAPE-096 (quadrado), PE-02(diamante), CHAPE-096 + PE-02(triângulo).

Fonte: Autores (2022)

O resultado de maior rendimento máximo de etanol pela combinação das leveduras no meio provindo de Bohn et al., (2021) e Vargas et al., (2021) é semelhante ao resultado



encontrado por Goel e Wati (2016), no qual os autores investigaram a produção de etanol a partir da palha de arroz usando três cepas diferentes individualmente (*Saccharomyces cerevisiae* (HAU-1), *Pachysolen tannophilus* e *Candida sp.*) bem como a combinação das cepas. Os resultados encontrados foram o aumento de 15 % de etanol, bem como, a máxima produção de etanol no estudo pela cepa *S. cerevisiae* (fermentadora de hexoses) em combinação com *P. tannophilus* (fermentadora de pentoses).

Apesar de apresentar menor crescimento celular e a presença de ácido acético, o meio provindo do hidrolisado de Bohn et al., (2021) e Vargas et al., (2021) apresentou as melhores conversões de etanol para as três condições de fermentação. A principal presunção é que apesar da presença do ácido acético inibir o crescimento celular pela não assimilação da xilose, o ácido acético não inibiu de forma significativa a assimilação e a fermentação da glicose pelas leveduras.

Tadioto et al., (2022) e Bohn et al., (2021) obtiveram um rendimento semelhante para cepas *M. caribbica* e *S. cerevisiae* (PE-02) para a fermentação da palha de milho. O rendimento do etanol obtido foi semelhante também ao observado por Da Silva Martins et al., (2015) (79,30 %), no qual os autores utilizaram a *S. cerevisiae* para fermentar bagaço de cana-de-açúcar.

### 3.6. Consumo de xilose e produção de xilitol

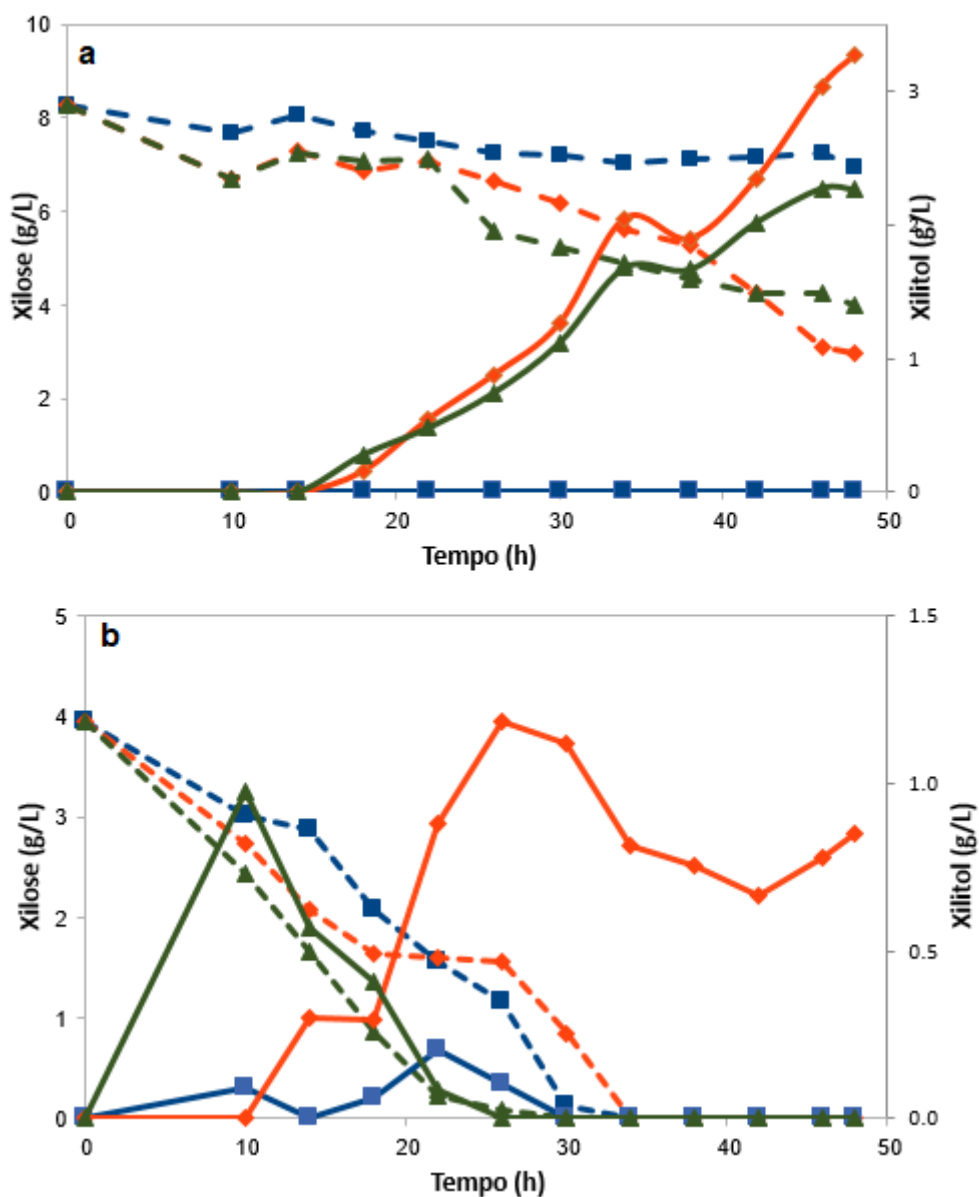
Em comparação com a glicose, para a xilose não houve qualquer produção de etanol. Em vez disso, as leveduras convertem parte da xilose disponível em xilitol e a liberaram no meio (Figura 3).

O consumo de xilose pelas leveduras em meio provindo do hidrolisado adaptado de Liu et al., (2018) foi de 100 % para as três leveduras empregadas. As concentrações de xilitol foram de 0,05, 0,30 e 0,25  $\text{g}_{\text{xilitol}}/\text{g}_{\text{xilose}}$ , a partir da xilose consumida, para a levedura selvagem, levedura industrial e a combinação de leveduras respectivamente. Para o meio provindo do hidrolisado de Bohn et al., (2021) e Vargas et al., (2021), o consumo de xilose foi cerca de 16, 64 e 52 % para a levedura selvagem, levedura industrial e a combinação de leveduras respectivamente. A partir dos consumos de xilose, a produção de xilitol, atingiu concentrações de 0,0  $\text{g}_{\text{xilitol}}/\text{g}_{\text{xilose}}$  para a levedura selvagem, 0,61  $\text{g}_{\text{xilitol}}/\text{g}_{\text{xilose}}$  para a levedura industrial e 0,53  $\text{g}_{\text{xilitol}}/\text{g}_{\text{xilose}}$  para a combinação das leveduras.

Por meio da Figura 3 observa-se que a levedura selvagem teve pouca capacidade de assimilação da xilose, em princípio pela interferência do ácido acético no meio de Bohn et al., (2021) e Vargas et al., (2021) e pelo melhor aproveitamento da xilose para crescimento celular, não a descartando em xilitol no meio de Liu et al., (2018).

Para a levedura industrial e para a combinação de leveduras no meio de Liu et al., (2018) a assimilação de toda a xilose que estava presente em baixas concentrações não foi problema, contudo, conversão de xilose em xilitol foi baixa, isso implica que as leveduras utilizaram a xilose como fonte de energia para crescer, e não a descartaram como xilitol. Para o meio de Bohn et al., (2021) e Vargas et al., (2021) a conversão de xilitol foi superior. A não assimilação de toda a xilose foi provavelmente em consequência da presença de ácido acético no meio.

Figura 3 – Consumo de xilose e produção de xilitol nos meios de fermentação providos da metodologia de Bohn et al., (2021) e Vargas et al., (2021) e adaptado de Liu et al., (2018).



Hidrolisado após a hidrólise enzimática provindo do pré-tratamento de Bohn et al., (2021) e Vargas et al., (2021) (a), hidrolisado após a hidrólise enzimática provindo do pré-tratamento adaptado de Liu et al., (2018) (b), consumo

de xilose (linhas pontilhadas), produção de xilitol (linhas contínuas), CHAPE-096 (quadrado), PE-02(diamante), CHAPE-096 + PE-02(triângulo).

Fonte: Autores (2022)

Em 2018, Baptista e colaboradores atingiram um rendimento de xilitol de 0,95  $\text{g}_{\text{xilitol}}/\text{g}_{\text{xilose}}$ , a partir da xilose consumida, em meio sintético com uma levedura *S. cerevisiae* modificada. Já para as leveduras nativas fermentadoras de xilose, *Candida sp.* tem sido amplamente relatado como o melhor produtor de xilitol com rendimentos em torno de 0,77 a 0,85  $\text{g}_{\text{xilitol}}/\text{g}_{\text{xilose}}$  a partir da xilose consumida (JIA et al., 2016; DASGUPTA et al., 2022). No trabalho de Tadioto et al., (2022), quatro cepas de *M. caribbica* (CHAPE) apresentaram resultados entre 0,20 e 0,32  $\text{g}_{\text{xilitol}}/\text{g}_{\text{xilose}}$  com consumo total da xilose no meio.

#### 4. CONCLUSÕES

A sólida demanda interna de etanol no país pode ter amparo pela diversificação da matriz energética. Ao realizar o pré-tratamento, a hidrólise enzimática e a fermentação em batelada da biomassa de capim elefante, em diferentes meios e condições de fermentação, obteve-se uma concentração máxima de etanol de 0,42  $\text{g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{glicose}}$  através da combinação das cepas *Saccharomyces cerevisiae* (PE-02) e *Meyerozyma caribbica* (CHAPE-096) na proporção 1:1 (v/v). Na fermentação dos hidrolisados, observou-se a dificuldade em metabolizar a xilose, por outro lado, verificou-se que as leveduras apesar de não produzirem etanol a partir da xilose a reduzem a outro componente importante na biorrefinaria: o xilitol. A concentração máxima de xilitol produzido neste estudo foi de 0,61  $\text{g}_{\text{xilitol}}/\text{g}_{\text{xilose}}$  pela cepa industrial *S. cerevisiae*.

Os dados aqui apresentados demonstram que a cepa *M. caribbica*, isolada de resíduos de milho em decomposição, fermenta glicose de maneira tão eficiente como a levedura industrial *S. cerevisiae* para os meios e condições de fermentação utilizados, todavia, a levedura selvagem não é capaz de converter xilose em xilitol com rendimento semelhante à levedura industrial. Os subprodutos aqui obtidos encontram-se entre os mais desejados na bioindústria, logo, esse estudo possibilita a diversificação de matéria prima e de levedura para a produção de etanol de segunda geração e a obtenção do xilitol por meio da levedura industrial PE-02.

## REFERÊNCIAS

- BAPTISTA, Sara L. et al. Xylitol production from lignocellulosic whole slurry corn cob by engineered industrial *Saccharomyces cerevisiae* PE-2. **Bioresource technology**, v. 267, p. 481-491, 2018.
- BASSO, L. C., AMORIM, H. V., OLIVEIRA, A. J. e LOPES, M. L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Res.** v. 8, p. 1155–1163. 2008.
- BOHN, L. R. et al. Alkaline pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover for bioethanol production Pré-tratamento alcalino e hidrólise enzimática de palha de milho para produção de bioetanol. **Research, Society and Development**, v. 2021, n. 2525–3409, p. 1–13, 2021.
- BONATTO, Charline et al. Experimental data and modelling of 2G ethanol production by *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1. 2. **Renewable Energy**, v. 145, p. 2445-2450, 2020.
- BRASIL. Lei nº 10.203, 22 de fevereiro de 2001. Dá nova redação aos arts. 9º e 12 da Lei nº 8.723, de 28 de outubro de 1993, que dispõe sobre a redução de emissão de poluentes por veículos automotores, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, Brasília, DF, 22 fev. 2001.
- CASEY, Elizabeth et al. Effect of acetic acid and pH on the cofermentation of glucose and xylose to ethanol by a genetically engineered strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS yeast research**, v. 10, n. 4, p. 385-393, 2010.
- CHOHAN, Naseeha A.; ARUWAJOYE, G.s.; SEWSYNKER-SUKAI, Y.; KANA, E.B. Gueguim. Valorisation of potato peel wastes for bioethanol production using simultaneous saccharification and fermentation: process optimization and kinetic assessment. **Renewable Energy**, [S.L.], v. 146, p. 1031-1040, fev. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2019.07.042>.
- DA SILVA MARTINS, Luiza Helena; RABELO, Sarita Cândida; DA COSTA, Aline Carvalho. Efeitos do método de pré-tratamento em hidrólise enzimática de sólidos elevados e fermentação de etanol da fração celulósica do bagaço de cana-de-açúcar. **Bioresource Technology**, v. 191, p. 312-321, 2015.

DASGUPTA, Diptarka et al. Process development for crystalline xylitol production from corncob biomass by *Pichia caribbica*. **Food and Bioproducts Processing**, 2022.

ELIANA, Cardona; JORGE, Rios; JUAN, Peña; LUIS, Rios. Effects of the pretreatment method on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentability of the cellulosic fraction from elephant grass. **Fuel**, [S.L.], v. 118, p. 41-47, fev. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2013.10.055>.

FERREIRA, Filipe Manoel et al. Optimal harvest number and genotypic evaluation of total dry biomass, stability, and adaptability of elephant grass clones for bioenergy purposes. **Biomass and Bioenergy**, v. 149, p. 106104, 2021. FERREIRA, Filipe Manoel et al. Optimal harvest number and genotypic evaluation of total dry biomass, stability, and adaptability of elephant grass clones for bioenergy purposes. **Biomass and Bioenergy**, v. 149, p. 106104, 2021.

GOEL, Annu; WATI, Leela. Ethanol production from Rice (*Oryza sativa*) straw by simultaneous saccharification and cofermentation. 2016.

JIA, Honghua et al. Evaluation of xylitol production using corncob hemicellulosic hydrolysate by combining tetrabutylammonium hydroxide extraction with dilute acid hydrolysis. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 676-683, 2016.

JÖNSSON, Leif J.; MARTÍN, Carlos. Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresource technology**, v. 199, p. 103-112, 2016.

KOLO, Sefrinus Maria Dolfi; WAHYUNINGRUM, Deana; HERTADI, Rukman. The Effects of Microwave-Assisted Pretreatment and Cofermentation on Bioethanol Production from Elephant Grass. **International Journal of Microbiology**, v. 2020, 2020.

KONGKEITKAJORN, Mallika Boonmee; SAE-KUAY, Chanpim; REUNGSANG, Alissara. Evaluation of Napier Grass for Bioethanol Production through a Fermentation Process. **Processes**, [S.L.], v. 8, n. 5, p. 567, 11 maio 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/pr8050567>.

KUPCZYK, Adam; MĄCZYŃSKA, Joanna; REDLARSKI, Grzegorz; TUCKI, Karol; BĄCZYK, Anna; RUTKOWSKI, Dominik. Selected Aspects of Biofuels Market and the Electromobility Development in Poland: current trends and forecasting changes. **Applied**

**Sciences**, [S.L.], v. 9, n. 2, p. 254, 11 jan. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/app9020254>.

LISTA, F. N.; EMERENCIANO NETO, J. V.; ALMEIDA, J. C. DE C.; DEMINICIS, B. B.; ROCHA, D. R. DA; DIFANTE, G. DOS S. Nutritive value and anatomical characterization from Pennisetum purpureum genotypes. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 42, n. 1, p. e53064, 27 ago. 2020.

LIU, Y. et al. Isolation and characterization of microcrystalline cellulose from pomelo peel. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 111, p. 717–721, 2018.

LIU, Y.; LIU, A.; IBRAHIM, S. A.; YANG, H.; HUANG, W. Isolation and characterization of microcrystalline cellulose from pomelo peel. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 111, p. 717–721, 2018

LOPES, Mario Lucio et al. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. **brazilian journal of microbiology**, v. 47, p. 64-76, 2016.

LU, Xianqin, et al. "Enzymatic sugar production from elephant grass and reed straw through pretreatments and hydrolysis with addition of thioredoxin-His-S." *Biotechnology for Biofuels*, vol. 12, no. 1, 27 Dec. 2019, p. NA. **Gale Academic OneFile**, [link.gale.com/apps/doc/A610282013/AONE?u=capes&sid=bookmark-AONE&xid=ee835d06](http://link.gale.com/apps/doc/A610282013/AONE?u=capes&sid=bookmark-AONE&xid=ee835d06). Accessed 8 Dec. 2021.

MARAFON, A.C et al. Chemical composition and calorific value of elephant grass varieties and other feedstocks intended for direct combustion. **Grassland Science**, vol. 67, p. 241-249, 2021. <https://doi-org.ez372.periodicos.capes.gov.br/10.1111/grs.12311>

MENEGOL, Daiane; SCHOLL, Angélica Luisi; FONTANA, Roselei Claudete; DILLON, Aldo José Pinheiro; CAMASSOLA, Marli. Increased release of fermentable sugars from elephant grass by enzymatic hydrolysis in the presence of surfactants. **Energy Conversion And Management**, [S.L.], v. 88, p. 1252-1256, dez. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enconman.2014.02.071>.

MOHAMMAD Taherzadeh, J.; NIKLASSON Claes; LIDÉN Gunnar. "Acetic Acid - friend or Foe in Anaerobic Batch Conversion of Glucose to Ethanol by *Saccharomyces Cerevisiae*?" **Chemical Engineering Science** 52.15 (1997): 2653-659. Web

MOHAMMED I. Y. et al. Comprehensive Characterization of Napier Grass as a Feedstock for Thermochemical Conversion. **Energies**, 8 (5), 3403-3417, 2015. <https://doi.org/10.3390/en8053403>

MORAIS, Rafael Fiusa de et al. Elephant grass genotypes for bioenergy production by direct biomass combustion. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** [online]. 2009, v. 44, n. 2 [Accessed 3 December 2021] , pp. 133-140. Available from: <<https://doi.org/10.1590/S0100-204X2009000200004>>. Epub 13 Apr 2009. ISSN 1678-3921.

OLIVA, Jose M. et al. Effect of binary combinations of selected toxic compounds on growth and fermentation of *Kluyveromyces marxianus*. **Biotechnology progress**, v. 20, n. 3, p. 715-720, 2004.

RABELO, S. C. et al. Alkaline hydrogen peroxide pretreatment, enzymatic hydrolysis and fermentation of sugarcane bagasse to ethanol. **Fuel**, v. 136, p. 349–357, 2014.

SAMSON, Roger et al. The potential of C4 perennial grasses for developing a global BIOHEAT industry. **Bpts**, v. 24, n. 5-6, p. 461-495, 2005.

SIMPSON-LAVY, Kobi; KUPIEC, Martin. A reversible liquid drop aggregation controls glucose response in yeast. **Current genetics**, v. 64, n. 4, p. 785-788, 2018.

SLUITER, A. et al. Determination of structural carbohydrates and lignin in Biomass - NREL/TP-510-42618. **Laboratory Analytical Procedure (LAP)**, n. April 2008, p. 17, 2012.

TADIOTO, V., MILANI, L.M., BARRILLI, É.T. et al. Analysis of glucose and xylose metabolism in new indigenous *Meyerozyma caribbica* strains isolated from corn residues. **World J Microbiol Biotechnol** 38, 35 (2022). <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03221-0>

VARGAS, A. C. G.; TIRONI, S. P.; MIBIELLI, G. M.; BENDER, J. P. Análise técnica de processos de pré-tratamentos da biomassa capim elefante (*Pennisetum purpureum*). **Anais da XI JIC**, Evento Online, v. 11, n. 1, 2021.

VASIĆ K, KNEZ Ž, LEITGEB M. 2021. "Bioethanol Production by Enzymatic Hydrolysis from Different Lignocellulosic Sources" **Molecules** 26, no. 3: 753. <https://doi.org/10.3390/molecules26030753>.